



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE
MAMMILLARIA COAHUILENSIS (Boed.) Moran
(Cactaceae), ESPECIE ENDÉMICA AMENAZADA
DEL ESTADO DE COAHUILA

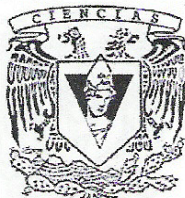
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DULCE YAAHID FLORES RENTERIA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA
DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica Amenazada del estado de Coahuila.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Propagación *in vitro* de Mammillaria coahuilensis (Boed.) Moran, (Cactaceae), especie endémica amenazada del Estado de Coahuila”

realizado por Flores Renteria Dulce Yaahid, con número de cuenta 099100832, quien opta por titularse en la opción de Tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	Guadalupe Judith Márquez Guzmán	
Propietario	Dra.	Margarita Collazo Ortega	
Tutor(a) Propietario	Dra.	Ana Laura López Escamilla	
Suplente	Dra.	Sonia Vázquez Santana	
Suplente	Biól	Laura Patricia Olguín Santos	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 16 de abril del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae),
especie endémica Amenazada del estado de Coahuila.

Esta tesis se realizó en el Taller de Biología del Desarrollo y Función de las Estructuras Reproductoras en Cactáceas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae),
especie endémica Amenazada del estado de Coahuila.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

Al proyecto CONAFOR-2003-CO3:9951, por la beca otorgada al participar como asistente por el periodo de octubre de 2005 a septiembre de 2006.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por la donación de las semillas.

A ECOCACTUS, S. A. de C. V. por la donación de plantas adultas de *Myrtillocactus geometrizans* para los injertos.

A la Biól. Laura Patricia Olguín Santos y a la Unidad de Ambientes Controlados por las facilidades otorgadas para la utilización de las cámaras de ambientes controladas y el invernadero de la Facultad de Ciencias de la UNAM, además de las constantes sugerencias y su infinito apoyo para la realización de esta tesis y el apoyo personal que siempre me brindó.

Al laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias UNAM por las facilidades y apoyo para desarrollar la fase experimental del trabajo, en especial a la Dra. G. Judith Márquez Guzmán y a la Dra. Margarita Collazo Ortega, por sus sugerencias y correcciones para este trabajo y durante el taller y sobre todo por su paciencia y su apoyo. A la Dra. Sonia Vázquez Santana, por sus comentarios y correcciones.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la toma de placas fotográficas de las semillas.

Y por último a la Dra. Ana Laura López Escamilla por haberme llevado a explorar el maravilloso mundo *in vitro* y por todo el apoyo brindado tanto académicamente como en lo personal, por la transmisión de sus experiencias y por ser un gran ejemplo a seguir, GRACIAS.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae),
especie endémica Amenazada del estado de Coahuila.

Personales

Agradezco primero a la Vida y a la Energía del Universo por permitirme estar aquí y por haberme dado la fuerza para realizar lo que deseo.

Agradezco a mi familia a mis hermanos, Ademir por ser un gran reservorio de conocimiento y por hacernos llegar a sus hijos que son nuestra inspiración, a Lluvia por enseñarme más de lo que se imagina y por guiarme siempre que la necesite, y a Aubanel por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas soportándome GRACIAS. A mi madre Yolanda Rentería Rodríguez por darme la vida y los medios, tanto económicos como morales para haber llegado hasta aquí y más allá. Y a mi padre Cesar Flores Olmos, por ser el pilar de esta familia a pesar de las circunstancias y por apoyarme siempre MIL GRACIAS.

Además agradezco a todos y cada uno de los maestros que he tenido en la vida en todos los aspectos pues sin alguno de ellos no sería lo que soy hoy.

A mis amigos y compañeros en la vida, Mariana, Daniel Alejandro, Christian, Carlos, Victor, Alma, Berenice, Ángela, Mariela, y muchos otros.

Y por último agradezco infinitamente con toda mi alma y mi corazón a Juan Manuel Hernández López por todo lo que me ha dado, que es tanto que no se puede expresar con palabras, pero que tú sabes amor, GRACIAS, TE AMO.

Tlazohkamachililia Ipalnemouani.

Gracias al dador de la vida

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	7
Abreviaturas utilizadas	8
I. Introducción	9
II. Antecedentes	
○ Distribución y problemática de las cactáceas en México	11
○ Características del género <i>Mammillaria</i>	13
○ Descripción de la especie	13
❖ Estrategias de conservación	14
○ Instituciones para conservar la biodiversidad	15
❖ Cultivo de Tejidos Vegetales	18
○ Etapas de la micropropagación	19
○ Problemas en la micropropagación	23
❖ Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas	25
○ Género <i>Mammillaria</i>	26
III. Justificación	30
IV. Objetivos	30
V. Materiales y Métodos	
❖ Material biológico	30
❖ Morfología de las semillas	31
❖ Desinfección superficial y siembra de semillas	31
❖ Siembra de explantes	31
❖ Inducción de brotes	32
❖ Elongación y enraizamiento	32
❖ Aclimatización	33
❖ Injertos	33
VI. Resultados y discusión	
❖ Descripción de las semillas	34
❖ Desinfección superficial	35

❖ Germinación	35
❖ Respuestas morfogénicas	40
❖ Subcultivo	47
❖ Enraizamiento	47
❖ Aclimatización	50
VII. Conclusiones	52
VIII. Referencias	53
IX. Anexos	60

RESUMEN

Mammillaria coahuilensis (Cactaceae), endémica del Estado de Coahuila, se encuentra en la categoría de Amenazada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001). En el presente trabajo se desarrollaron las técnicas *in vitro* para la propagación de esta especie. Semillas de *M. coahuilensis* se desinfectaron y sembraron en tres distintos medios de cultivo, para obtener plántulas: agua con agar, Murashige y Skoog (MS) al 50% de sus macro, micronutrientes y sacarosa (MS 50%); y MS 50% adicionado con 1.5 g L⁻¹ de carbón activado, registrándose un mayor porcentaje de germinación en el medio agua con agar (Lote 1: 60%; Lote 2: 100%). Las plántulas presentaron tres problemas en su desarrollo que provocaron pérdida de material biológico: contaminación, hiperhidratación y oxidación, siendo el agua con agar el medio que presentó menor frecuencia de las mismas. Las plántulas disponibles se utilizaron como fuente de explantes apicales y laterales que se sembraron en medio MS adicionado con Benciladenina (BA) (0-2 mg L⁻¹). Se obtuvo regeneración de brotes por activación de yemas (areólas) y por organogénesis indirecta (callo). El mayor número de brotes se presentó en el medio con 1 mg L⁻¹ de BA (21.25 brotes por explantes laterales y 7.5 brotes en los apicales). Algunos brotes lograron individualizarse y otros se transfirieron unidos al explante inicial y se subcultivaron en medio MS adicionado con carbón activado (1.5 g L⁻¹) para promover su elongación, y enraizamiento. Los brotes enraizados se aclimatizaron para su establecimiento en condiciones de invernadero, donde se obtuvo un 52.76% de sobrevivencia. Se realizaron injertos con 9 de los brotes que no presentaron enraizamiento y se obtuvo un 100% de sobrevivencia. Este es el primer reporte para la propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2iP	2 Isopentenil adenina
A/A	Agua con Agar
AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido Naftalenacético
BA o BAP	Benciladenina o Bencilaminopurina
CA	Carbón activado
CAM	Crassulacean Acid Metabolism (Metabolismo Ácido Crasuláceo)
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
K	Kinetina
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	Medio Murashige y Skoog al 50% de macronutrientos, micronutrientos y sacarosa
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
IUCN	International Union Conservation of Nature (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas han jugado un papel muy importante en el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que constituyen la fuente primaria de alimento de todas las cadenas tróficas y además son productoras de oxígeno. Su distribución está regulada por diversos factores, tales como: precipitación, temperatura, luz y contenido mineral del suelo que determinan el tipo de vegetación predominante en cada lugar (Strasburger *et al.*, 1986), dando como resultado una gran diversidad de plantas en el mundo.

La familia Cactaceae es una de las más fascinantes por su diversidad de formas de vida, las hay arbustivas o herbáceas, con tallos carnosos ya sean globosos, columnares, articulados, candelabrifórmes, o en forma de rosetas, etc., y por sus distintos tipos de espinas. Además de su importancia ecológica en el paisaje de zonas áridas, representan un valor económico como plantas de ornato, en la alimentación humana o animal, siendo utilizadas también en el reestablecimiento de suelos erosionados y en la medicina tradicional (León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994).

Entre las más conocidas se encuentran: nopales (*Opuntia*), biznagas (*Echinocactus* y *Ferocactus*), chilitos de biznaga (*Mammillaria*), órganos (*Pachycereus*, *Neobuxbaumia*), viejitos (*Cephalocereus*), peyotes (*Lophophora*), saguaros (*Carnegiea*), garambullos (*Myrtillocactus*) y jiotillas (*Escontria*), entre otras (Arias-Montes, 1997). Las cactáceas se encuentran sometidas a una gran presión por el desarrollo humano, así como por factores biológicos, ecológicos y fisiológicos como tasas de crecimiento muy bajas, ciclos de vida largos, reducidos niveles de reclutamiento y áreas de distribución limitadas; las condiciones edáficas especializadas en las que habitan motivan que haya un reestablecimiento lento de las poblaciones en caso de la perturbación de su hábitat (Hernández y Godínez, 1994).

Dentro de esta familia el género *Mammillaria* es el más diverso y popular debido a la enorme variedad de formas que posee, el color de sus flores, su pequeño tamaño, y su relativamente sencillo cultivo y mantenimiento, por lo que ha sido objeto de explotación por parte de coleccionistas nacionales e internacionales (Arias-Montes, 1997).

Mammillaria coahuilensis es una especie endémica del estado de Coahuila con una distribución muy restringida (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). La NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) la sitúan en la categoría de Amenazada, por lo que es urgente que se implementen medidas orientadas a su conservación, como la propagación *in vitro*.

Las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) resultan una alternativa viable de propagación, pues tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos y durante todo el año. Además de que con poco material vegetal es posible obtener en menor tiempo una cantidad mucho mayor de individuos que con la propagación convencional y libres de enfermedades (Pierik, 1993; Rubluo, 1997; Collin y Edwards, 1998, Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). El éxito de estas técnicas se han aplicado a varios miembros del género *Mammillaria* (Kolár *et al.*, 1976; Johnson y Emimo, 1981; Damiano *et al.*, 1986; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Corneanu *et al.*, 1990; Gratton y Fay, 1990; Fay y Gratton, 1992; Rubluo, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Papafotiou *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002; Poljuha *et al.*, 2003). Sin embargo no existen trabajos reportados para *Mammillaria coahuilensis*, por lo que el presente trabajo tuvo como propósito establecer las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de esta especie.

II. ANTECEDENTES

DISTRIBUCIÓN Y PROBLEMÁTICA DE LAS CACTÁCEAS EN MÉXICO

La familia Cactaceae es nativa del Continente Americano, la mayoría son plantas xerófilas, es decir que viven en climas áridos y semiáridos, aunque las podemos encontrar en casi todos los tipos de vegetación, a excepción de los acuáticos. Su distribución geográfica se presenta desde el Sur de Canadá hasta la Patagonia en Argentina (Bravo-Hollis, 1997). Algunas de las regiones de alta diversidad florística para las cactáceas en México son el Valle Tehuacán-Cuicatlán, en Puebla y Oaxaca; Tehuantepec en Oaxaca; la cuenca del Río Estorax, en Querétaro; la Barranca de Metztitlán, en Hidalgo; la zona del Altiplano Potosino, en San Luis Potosí y la Sierra de la Paila en Coahuila y el Sur de Nuevo León (Arias-Montes, 1997).

Por las regiones en las que se distribuyen las cactáceas necesitaron numerosas adaptaciones fisiológicas para sobrevivir, la más evidente es su capacidad de almacenar agua y hacer un uso eficiente de ésta en su desarrollo. La forma globosa o redondeada que por lo general presentan les permite reducir la superficie de exposición al medio e incrementa el volumen interno, espacio que se aprovecha para almacenar el líquido vital, además de que sus tallos son fotosintéticos y presentan gruesas cutículas para evitar la evapotranspiración. La característica distintiva de la familia es la presencia de aréolas, que son zonas meristemáticas que dan origen a nuevos tallos, flores, espinas y tricomas. Estos últimos protegen al tejido meristemático de los rayos solares y a la vez crean una microatmósfera aislante de las temperaturas extremas, y durante periodos de alta humedad relativa las gotas de agua se deslizan sobre su superficie y bajan por las costillas del tallo hasta el suelo inmediato (Hunt, 1992; León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994; Arreola, 1997).

En México la familia Cactaceae cuenta con aproximadamente 738 especies y de éstas 540 son endémicas, lo que significa que tres cuartas partes de la cactoflora de nuestro país es única, por lo que resulta preocupante que la mayoría de las especies mexicanas con algún grado de amenaza de extinción sean endémicas (Hernández y Godínez, 1994); la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales a través de la Norma Oficial Mexicana enlista 258 especies de cactáceas en alguna categoría de riesgo, de las cuales 118 pertenecen al género *Mammillaria* (SEMARNAT, 2002).

Esta amenaza de extinción a la que la familia se ve sujeta se debe a tres factores:

- 1) A factores biológicos y ecológicos como la pérdida de viabilidad de sus semillas, la baja sobrevivencia de las plántulas bajo condiciones de campo y la lentísima tasa de crecimiento de la mayoría de las especies, así como generalmente la necesidad de condiciones edáficas especializadas (Sánchez-Mejorada, 1982; León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994).
- 2) A que las poblaciones naturales de muchas de las especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, principalmente debido a la conversión de terrenos con vegetación natural para usos agrícolas y/o pecuarios (Corona y Chávez-Ávila, 1982; Sánchez-Mejorada, 1982; Hernández y Godínez, 1994).
- 3) A el atractivo estético, a la rareza de sus formas y a la belleza de sus flores, los cuales han provocado en el hombre gran fascinación por los cactus lo cual provoca actividades de extracción de las plantas de su hábitat para su venta como plantas de ornato en mercados nacionales e internacionales por la remuneración económica de su venta legal, pero sobre todo ilegal (Sánchez-Mejorada, 1982; León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994). El comercio ilegal de las especies de cactus es un síntoma de una combinación de problemas, incluyendo la falta de viveros que propaguen especies raras para cubrir la demanda internacional, las leyes mexicanas confusas y frecuentemente contradictorias que representan una barrera para el establecimiento de plantas comerciales para operaciones de reproducción de plantas. Los esfuerzos aplicados también han sido insuficientes para ofrecer información a los pueblos rurales y comunicarles el beneficio económico de la cosecha sostenible de cactus que puedan ser propagadas artificialmente sin que se vean afectadas las poblaciones naturales. También se necesita una aplicación más estricta de las leyes mexicanas existentes para desalentar a las personas, particularmente a los coleccionistas privados extranjeros, de recolectar y llevar a sus países cactus protegidos. Estos asuntos requieren de un enfoque multifacético, desde la inversión en la propagación comercial hasta la mejora de la aplicación de la ley y su monitoreo (Robbins, 2003).

A menos que se traten estos problemas, se continuará afectando la conservación de las poblaciones de cactus en disminución (Robbins, 2003).

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *MAMMILLARIA*

El género *Mammillaria* constituye uno de los géneros más numerosos de las Cactáceas, con alrededor de 300 especies. La enorme variedad de formas que posee, el color de sus flores, su pequeño tamaño, y su relativamente sencillo mantenimiento, han provocado que sea uno de los géneros más populares de la familia. Desafortunadamente estas características son las que tienen al borde de la extinción a dicho género (Rubluo, 1997).

Se caracteriza por sus tallos globosos que se ramifican por brotes basales o laterales y, a veces por dicotomía apical; presenta tubérculos dispuestos en series espiraladas, más o menos numerosos, cónicos, piramidales o poliédricos. Presenta aréolas dimórficas, las espiníferas situadas en el ápice de los tubérculos, provistas de lana cuando jóvenes, con o sin cerdas; y las floríferas situadas en la axila de los tubérculos, con lana, con cerdas o desnudas.

Las espinas se diferencian en centrales y radiales, dispuestas en las aréolas en formas diversas. Sus flores están generalmente dispuestas en corona cerca del ápice del tallo, y pueden ser infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura. El fruto es una baya pequeña, claviforme, de color rosado purpúreo hasta escarlata; las semillas son pequeñas, más o menos globosas con la testa de estructura reticulada, de color castaño rojizo hasta oscuro. Pueden crecer solitarias o de manera cespitosa (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Rubluo, 1997).

DESCRIPCIÓN DE *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran

Esta especie (Fig. 1) cuyos nombres comunes son “porfirita” en honor a Porfirio Díaz o biznaga de Coahuila (Anexo 1), es una especie endémica del estado de Coahuila (Villareal, 2001; SEMARNAT, 2002).

Posee una distribución muy restringida, la localidad tipo es San Pedro, cerca de la Laguna de Viesca (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991), ubicada en el suroeste del estado de Coahuila, (102° 58'58" longitud oeste y 25° 45'32" latitud norte, a 1,090 msnm). El clima en la localidad tipo es seco semicálido; la temperatura media anual es de 30 a 32°C y la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 200 a 300 mm. Esta localidad no forma parte de ningún área natural protegida ni reserva ecológica (INEGI, 1999).



Figura 1.- *Mammillaria coahuilensis*, en floración a la izquierda y con frutos a la derecha.

Mammillaria coahuilensis se encuentra en la categoría de Amenazada de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001, la IUCN le asignó la categoría de Vulnerable hasta 2004. Así mismo, la CITES la ubica en el Apéndice II, que señala un control en el tráfico de esta especie (SEMARNAT, 2002; Arias-Montes *et al.*, 2005). De acuerdo a la revisión bibliográfica, no hay estudios reportados sobre la germinación *in vivo*, ni estudios poblacionales que reflejen la problemática actual de la misma, es decir, las razones reales por la que se encuentra amenazada. Es posible que su restringida distribución sea su principal problema, aunado a su lento crecimiento, por lo que es necesario implementar medidas orientadas a su conservación para evitar que desaparezca de la vida silvestre.

ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE PLANTAS

Actualmente en México se está dando énfasis a distintas líneas de investigación para rescatar, preservar y conservar las cactáceas amenazadas y en vías de extinción. La propagación de cactáceas se ha desarrollado como una alternativa más para la conservación de su biodiversidad. Con esta actividad se pretende estudiar los requerimientos de cada una de las especies en la germinación, crecimiento, establecimiento y desarrollo; así como enriquecer los métodos de propagación y proponer nuevos modelos dependiendo de las especies y el área donde se esté trabajando (Reyes, 1997).

INSTITUCIONES PARA CONSERVAR LA BIODIVERSIDAD

Diversas instituciones de investigación científica y educación superior, asociaciones civiles, dependencias gubernamentales y no gubernamentales de todo el mundo, desarrollan estrategias encaminadas a la protección y conservación de las especies en sus hábitats (*in situ*) y fuera de las áreas donde crecen de forma natural (*ex situ*). En México, entre las estrategias de conservación *in situ* se hallan las Áreas Naturales Protegidas, las cuales son zonas destinadas esencialmente para actividades de carácter científico, educativo y de conservación. Para la conservación *ex situ* de plantas existen los Jardines Botánicos, las UMAS (Unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre), Viveros, Bancos de Germoplasma, Bancos de Semillas y el Cultivo *in vitro*; instituciones que propagan, cultivan y mantienen colecciones de plantas vivas con fines de investigación científica, conservación y educación (Franco, 1997).

IUCN

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, IUCN, por sus siglas en inglés (International Union Conservation of Nature), representada en México por el Comité Mesoamericano de la UICN, es la mayor alianza internacional conformada por diversas organizaciones e individuos que trabaja por asegurar el uso equitativo y sostenible de los recursos naturales en beneficio de los seres humanos; promoviendo así el desarrollo sostenible en todos los pueblos del mundo. Desde su creación, en 1948, ofrece asesoría experta sobre aspectos científicos y políticos relacionados con el medio ambiente, con el fin de promover acuerdos regionales, legislaciones e instituciones adecuadas y estrategias para la gestión sostenible de los recursos naturales (IUCN, 1994). Esta organización creó un listado de especies en distintas categorías de riesgo conocida como la lista roja, en la cual se agrupan las especies según su grado de riesgo en la naturaleza, estando representadas las principales características en el cuadro 1.

La IUCN reporta para México aproximadamente 300 especies de plantas amenazadas o vulnerables, de las cuales el 60% son cactáceas o suculentas (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2000).

Categoría	Abreviatura	Descripción
Extintas	EX	Son aquellas especies que no cuentan con algún representante sobreviviente.
Extintas en la naturaleza	EW	Son las especies que sobreviven en cautiverio, pero que no hay representantes en la naturaleza.
Críticamente amenazadas	CR	Especies que se encuentran frente un extremadamente alto riesgo de extinción en la naturaleza.
Amenazadas	EN	Especies que se encuentran en un muy alto riesgo de extinción en la naturaleza.
Vulnerables	VU	Especies que se encuentran en un alto riesgo de extinción en la naturaleza.

Cuadro 1.- Categorías de riesgo según la IUCN (IUCN, 1994)

Hasta el año 2004 la IUCN reportaba *M. coahuilensis* como Amenazada, pero para el 2005 ya no la ubica en sus listados sin presentar una razón aparente (Arias-Montes *et al.*, 2005).

SEMARNAT

En México, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales generó la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 con el título: “Protección ambiental a especies nativas de México de flora y fauna silvestres en categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo”, la cual es un listado que señala las categorías de riesgo de especies tanto vegetales como animales; establece que entre las especies y poblaciones en riesgo estarán comprendidas las que se identifiquen con lo que se expresa en el cuadro 2.

Para la familia Cactaceae esta Norma enlista 39 géneros en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2002).

Categoría	Abreviatura	Descripción
Probablemente extintas en el medio silvestre	E	Son las especies de las que no se han encontrado representantes en la naturaleza.
En peligro de extinción	P	Especies de distribución muy restringida, vulnerabilidad alta, con hábitat hostil y un alto impacto por actividad humana.
Amenazadas	A	Especies de distribución restringida, vulnerabilidad media, con hábitat limitante y un alto o mediano impacto humano.
Sujetas a protección especial	Pr	Enlista las especies “raras” de manera precautoria, dada la escasa información para determinar si dichas especies se encuentran realmente en riesgo, hasta contar con la información necesaria para reclasificarlas.

Cuadro 2.- Categorías de riesgo en México de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002)

CITES

Otro organismo internacional que intenta conservar la diversidad de flora y fauna regulando su comercio es la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, por sus siglas en inglés, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) la cual a través de un acuerdo internacional concertado entre los gobiernos, tiene por finalidad velar porque el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su sobrevivencia. La CITES somete al comercio internacional de determinadas especies a ciertos controles. Toda importación, exportación, reexportación o introducción de especies amparadas por la Convención debe autorizarse mediante un sistema de concesión de licencias (Benítez y Dávila, 2003).

Las especies amparadas por la CITES están incluidas en tres Apéndices, según el grado de protección que les asignen los listados. En el Apéndice I se incluyen todas las especies en peligro de extinción; de tal manera que el comercio de esas especies se autoriza solamente bajo circunstancias excepcionales, como el intercambio científico o ejemplares propagados artificialmente en viveros autorizados.

En el Apéndice II se incluyen especies que no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse a fin de evitar un uso incompatible con su sobrevivencia. En el Apéndice III se incluyen especies que están protegidas al menos en un país, el cual ha solicitado la asistencia de otros países para controlar su comercio. Alrededor de unas 28 000 especies de plantas están amparadas por la CITES contra la explotación excesiva debido al comercio internacional.

En el Apéndice I se encuentran varias especies de cactáceas mexicanas pertenecientes a los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphantha*, *Disocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus*, *Turbinicarpus* y *Uebelmannia*. En el Apéndice II quedan contempladas el resto de las cactáceas, incluyendo sus semillas (Benítez y Dávila, 2003).

No obstante la existencia de estas instituciones, existe la necesidad de actualizar la información disponible sobre las especies y aplicar un método general para determinar las categorías de riesgo a las que puede ser asignada cualquier especie silvestre, pues se ha afirmado que el éxito de la conservación de la biodiversidad depende en gran medida del conocimiento de las especies o sistemas que se requieren conservar (Hernández y Godínez, 1994, Arias-Montes *et al.*, 2005).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)

El CTV o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de la planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. Es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, homocigotas, para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal, en la producción de plantas en peligro de extinción, etc. (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Las técnicas de CTV se basan en la teoría celular o de totipotencialidad postulada por Schwann y Schleiden (1938; citado por Caponetti *et al.*, 2000) en la que establecen que las células son autosuficientes y capaces de regenerar una planta completa. En 1902 Haberlandt (citado por Caponetti *et al.*, 2000) retoma la anterior teoría y establece que “si el ambiente y la nutrición del cultivo celular es manipulado, estas células podrían recapitular la secuencia de desarrollo de una planta con un crecimiento normal”, marcando la pauta para la micropropagación de plantas. Kotte (1922; citado por Caponetti *et al.*, 2000) reportaron por primera vez el crecimiento de brotes aislados en un medio consistente en sales orgánicas. Dentro del CTV se han desarrollado diversas técnicas como el cultivo de meristemos, el cultivo de anteras, suspensiones celulares, protoplastos, y la micropropagación.

La micropropagación es una técnica biotecnológica que tiene como principal aplicación la reproducción vegetativa en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de pequeños segmentos iniciales de tejido (explantes) que pueden ser desde embriones, semillas, tallos, meristemos apicales, callos, células aisladas o granos de polen, es posible regenerar, en poco tiempo, un gran número de plantas genéticamente iguales a la planta madre cuando a éste tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo. A diferencia de las técnicas convencionales de propagación vegetativa, esta poderosa herramienta permite la producción de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. La técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, así como plantas homocigotas (Aceves y Hernández, 2000).

ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación consta de varias etapas (Pierik, 1993; Collin y Edwards, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999):

Fase 0: Selección de la planta madre. Se trata de una etapa preparativa, en la cual se seleccionan y preparan las plantas madre que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*. Aunque en muchas ocasiones es subestimada, se trata de una parte fundamental para el éxito de la micropropagación.

Fase I: Establecimiento de los cultivos. Esta etapa consiste básicamente en la selección del explante y la desinfección del mismo para iniciar un cultivo axénico. Dicha elección depende de la especie y su edad fisiológica, principalmente.

Rubluo (1997) afirmó que en cactáceas es recomendable usar fragmentos de plantas jóvenes de 2 o 3 años de edad, que no hayan formado tejido muy compacto, ya que esto puede influir negativamente en su capacidad regenerativa. Rubluo *et al.* (1993), recomiendan el uso de plántulas de semillas germinadas *in vitro* para prevenir la contaminación, pues el proceso de desinfección se complica por la presencia de las numerosas espinas, además de que puede ser muy agresivo para la planta y provocar la pérdida del material biológico.

Fase II: Proliferación. Los explantes se siembran en un medio con reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento vegetal son moléculas de activación presentes en un tejido dado que a ciertas concentraciones, solas o en combinación con otras sustancias, pueden controlar diversas actividades involucradas con el crecimiento y desarrollo vegetal. Para el cultivo *in vitro* son de especial interés las auxinas, quienes participan en el mecanismo de regulación de crecimiento desde la elongación celular hasta la formación de órganos y la dominancia apical y que en combinación con las citocininas inducen la formación de callo, raíces adventicias y la división celular en los brotes (Beyl, 2000; Taiz y Zeiger, 2002). Las citocininas regulan el crecimiento de las plantas, desde la división celular hasta la formación de órganos. La aplicación de citocininas propicia la formación de brotes en cultivo *in vitro* de cactáceas (Rubluo, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998). Tanto las citocininas como las auxinas regulan el ciclo celular de las plantas y son necesarias para la división celular *in vitro*. La relación auxina:citocinina determina la respuesta morfogénica del tejido. Una concentración alta de auxinas y baja de citocininas promueve la formación de raíces. Una concentración baja de auxinas, con una mayor concentración de citocininas da origen a brotes y una proporción 1:1 promueve callo indiferenciado.

La dominancia apical de los tallos está determinada primordialmente por las auxinas, sin embargo estudios fisiológicos demuestran que las citocininas juegan un papel importante en la ruptura de dicha dominancia y, por lo tanto, en el desarrollo de brotes laterales (Mauseth, 1979; Taiz y Zeiger, 2002).

Es en esta etapa de proliferación donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. Los explantes, el tejido inicial, pueden tener diversas respuestas morfogénicas, entre ellas (Pierik, 1993; Collin y Edwards, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999):

1. **Organogénesis**, que puede ser:

- a) **Indirecta**, en la cual existe una desorganización de las células del explante inicial (formación de callo) y posteriormente existe una reorganización del tejido para dar lugar a brotes adventicios. En este tipo de propagación clonal existe una gran probabilidad de que se produzca variación genética, también llamada variación somaclonal que es producto de diversos eventos cromosómicos como inversiones, deleciones y amplificación génica, entre otros.
- b) **Directa**, es la formación de brotes axilares y/o raíces directamente del explante inicial sin la previa formación de callo. La ausencia de callo en los explantes da la seguridad de que los brotes producidos sean idénticos a la planta madre, siendo por esto un medio de propagación comercial adecuado.

2. **Activación de yemas axilares**, se activan los meristemos axilares del explante por la acción de reguladores de crecimiento, con lo cual surgen brotes genéticamente iguales a la planta madre.

3. **Embriogénesis somática**, se presenta como la formación de embriones a partir de células somáticas del explante inicial o a través de callo. La embriogénesis tiene la ventaja de generar estructuras bipolares, de esta forma evitándose la fase de enraizamiento y disminuyendo los costos, además de que se producen individuos genéticamente distintos a la planta madre.

La temperatura influye en la respuesta morfogénica. Starling y Dodds (1983) señalan como favorable una temperatura hasta de 28° C, pero el rango más frecuente es de 23 a 27° C para una mejor propagación (Rubluo, 1997). El fotoperiodo más usado en cactáceas es de un ciclo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La importancia de la irradiación ha sido generalmente ignorada y se aceptan, de manera general, valores de alrededor de los 78 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la regeneración de plantas (Rubluo, 1997).

Fase III: Enraizamiento. Los brotes obtenidos durante la organogénesis (directa o indirecta) se incuban en medios de cultivo que promuevan la formación de un sistema radical, al mismo tiempo que se elongan para facilitar su manipulación, lo que le confiere una independencia del medio de cultivo por ser capaces de fotosintetizar y se vuelve más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. En cambio, los embriones somáticos sólo germinan, y continúan su crecimiento y por su naturaleza bipolar no requieren de una promoción de enraizamiento.

Fase IV: Aclimatización. La transferencia y aclimatización a un ambiente *ex vitro* es el paso final, pero frecuentemente el más difícil en un sistema de micropropagación satisfactorio. La aclimatización es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. En el ambiente *in vitro* con medio artificial adicionado con azúcares, los brotes cuentan con la materia prima para un mayor crecimiento, una humedad relativamente alta, un bajo o nulo intercambio gaseoso y por lo tanto un déficit de CO₂ durante casi todo el fotoperiodo, la producción de etileno y la relativa baja densidad de flujo de fotones, inducen una perturbación en el desarrollo de la planta y en el funcionamiento fotosintético. Después de la transferencia de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, los brotes tienen que corregir los problemas fisiológicos y se aclimatizan en este nuevo ambiente inicialmente en el invernadero y finalmente en el campo (Kadlecek *et al.*, 2001). Los brotes comienzan por presentar deshidratación porque no se cierran los estomas y por el cambio brusco a una humedad mucho más baja en el ambiente. Cuando crece nuevo tejido fotosintético, los estomas van siendo funcionales, además de contener cantidades normales de ceras epicuticulares (Malda *et al.*, 1999b). Para tener una aclimatización exitosa los brotes deben ser sometidos a cambios progresivos de menor humedad, temperatura e intensidad lumínica, y en condiciones lo más higiénicas posibles, para que puedan sobrevivir *ex vitro*. Una alternativa es el uso de plantas adultas sobre las cuales se desarrolla el brote que no ha enraizado, tomando los nutrientes de la misma, a esta técnica se le conoce como injerto y la planta que sostiene al brote se le llama pie o portainjerto. Se pueden utilizar injertos para permitir el crecimiento aprovechando la mayor resistencia del pie usado.

PROBLEMAS EN LA MICROPROPAGACIÓN

Durante el desarrollo de la micropropagación se pueden presentar distintos problemas, como:

Contaminación

La contaminación *in vitro* es un problema muy común y se presenta frecuentemente cuando no se maneja adecuadamente la técnica de desinfección o de inoculación. Los principales contaminantes son bacterias y hongos, siendo las primeras las más comunes y las más difíciles de erradicar. En el género *Mammillaria* la contaminación por bacterias es el mayor problema cuando se usan explantes obtenidos de plantas adultas, esto básicamente por el alto número de espinas que dificultan la penetración de los desinfectantes (Rubluo, 1997).

Necrosis

Una respuesta no deseable, pero que suele presentarse, es la necrosis del tejido, la cual es producto de una elección errónea del explante y/o del medio de cultivo, limita el crecimiento y hace imposible su uso para la micropropagación (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Hiperhidratación

Otro de los principales problemas que se ha presentado durante el cultivo *in vitro* es la hiperhidratación tanto de brotes como de callos. En el género *Mammillaria* ha sido reportada por varios autores (Fay y Gratton, 1992; Rubluo, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 2002; Poljuha *et al.*, 2003). Vitrificados, vidriosos o hiperhidratados se les llama a los brotes con apariencia turgente, con superficie acuosa e hipolignificada, en algunos casos pierden la coloración y son fácilmente quebradizos. La hiperhidratación no se restringe a los brotes, algunos callos se consideran vítreos si tienen una apariencia hiperhidratada y amarillenta (Kevers *et al.*, 2004).

Anatómicamente, la hiperhidratación se trata de una hipertrofia de las células del parénquima y de los espacios intercelulares. Se incrementa el espacio intercelular y el volumen de aire contenido en los espacios, lo cual se refleja en la vitrificación del tejido, además de que los vasos y traqueidas están pobremente lignificados.

Los tejidos hiperhidratados presentan diversas características bioquímicas, algunas veces relacionadas con las anomalías morfológicas, como la reducción del peso seco por el aumento de agua en el apoplasto, la disminución de lignina por la baja actividad de enzimas involucradas en su síntesis. Así mismo, la disminución de la cantidad de celulosa y del contenido de calcio y la disminución de la clorofila causan la apariencia translúcida y presumiblemente una disminución en la capacidad fotosintética (Gaspar, 1991, citado por Kevers *et al.*, 2004).

Se considera que este proceso es irreversible y para evitar la tendencia a la hiperhidratación Gratton y Fay (1990) proponen la incorporación de 1-3 g L⁻¹ de carbón activado, usar un medio con baja concentración iónica y una alta concentración de agar o cambiar el medio a uno parcialmente deshidratado. Gaspar (1991, citado por Kevers *et al.*, 2004) propone el subcultivo de brotes en medio no vitrificante, pero no especifica su composición. La incorporación de carbón activado en el cultivo *in vitro* tiene diversos efectos, absorbe sustancias indeseables o inhibitorias en el cultivo *in vitro* como polifenoles, altas concentraciones de reguladores de crecimiento y etileno (Pan y Van Staden, 1998); además de que promueve embriogénesis somática (Lou y Kako, 1994, citados por Pan y Van Staden, 1998). Sin embargo, el uso de carbón activado en cultivo *in vitro* como promotor o inhibidor de crecimiento depende de numerosos factores, y se requiere una mayor investigación en el mecanismo de absorción y la identificación de sustancias absorbidas por él (Pan y Van Staden, 1998).

Oxidación

Durante el cultivo *in vitro*, se puede presentar la oxidación de los tejidos, que está relacionada con la producción de fenoles (Garrido, 1998). La oxidación de tejidos ha sido reportada ampliamente como un problema serio en el cultivo *in vitro* de cactáceas (Vyskot y Jara, 1984; Rubluo, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Anicua y Rivas, 2000). Sin embargo es un fenómeno multifactorial y que no se ha estudiado ampliamente (Gratton y Fay, 1990).

Steinhart (1962) propone que la oxidación se debe a las polifenol oxidasas que en algunos tejidos se encuentran relacionadas con la tripsina, la caseína hidrolizada y los altos niveles de sacarosa, la oxidación en los tejidos es un indicador de sensibilidad al estrés físico (disección) y estrés químico (desinfección) que cada especie presenta, aunque también sugiere que este fenómeno es la respuesta al estrés causado por la persistencia de alguna infección fungal o bacterial

Mutaciones

Una de las barreras más importantes en la micropropagación de plantas es la inestabilidad cromosómica de las células. Ocurren cuando pasan por una fase de tejido desdiferenciado, llamado callo, y por lo tanto se obtienen plantas y tejidos genéticamente distintos al genotipo original (Pierik, 1993). Las mutaciones promueven variación genética adicionando nuevos genotipos a las reservas genéticas de una población, siendo una excelente oportunidad para cultivos perennes propagados asexualmente (Jayasankar, 2000). Sin embargo esto es discutible por su falta de estabilidad y debido a que los cambios genéticos (o epigenéticos) pueden influenciar negativamente en la variabilidad genética natural de las especies (Malda *et al.*, 1999b). Las causas de estas mutaciones *in vitro* no han sido estudiadas a fondo, pero pueden deberse a los reguladores de crecimiento que se utilizan, a la gran cantidad de nutrientes contenidos en el medio, la temperatura del cultivo y la irradiación, entre otros factores (Pierik, 1993).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN CACTÁCEAS

Malda *et al.* (1999a) compararon en condiciones *in vitro* y *ex vitro* la variación de la acidez y la fijación de CO₂ durante el día y la noche en plántulas de *Coryphanta minima*; encontrando que tanto la acidez como la tasa neta de toma de CO₂ ocurrieron en luz y oscuridad. De manera que en condiciones *in vitro* esta especie puede fijar CO₂ continuamente, indicando una alteración al patrón normal de CAM, provocando un continuo y rápido crecimiento, lo que sugiere que el CTV es un método ideal para la propagación vegetativa de cactáceas.

Se han realizados diversos trabajos sobre la propagación *in vitro* de cactáceas, con resultados variables. Se ha observado la formación de brotes en *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus spachianus* (Vyskot y Jara, 1984), *Sulcorebutia alba* (Dabekaussen *et al.*, 1991), *Ariocarpus retusus* (Olguín-Santos, 1994), *Cereus peruvianus* (Oliveira *et al.* 1995), *Coryphantha clavata*, *C. durangensis*, *C. radians*, *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocereus dubius*, *E. pectinatus*, *Echinofossulocactus sp.*, *Ferocactus hamatacactus*, *F. histrix*, *F. latispinus*, *F. pilosus*, *Nyctocereus serpentinus* y *Stenocactus coptonogonus* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), *Coryphantha elephantidens* (Bhau, 1999), *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima* (Malda *et al.*, 1999b), *Echinocactus grusonii* (Anicua y Rivas, 2000), *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001), *Escobaria minima* y *Pelecypora aselliformis* (Giusti *et al.*, 2002), *Cephalocereus senilis* (Tapia-Cruz, 2006). Se ha reportado la formación de embriones somáticos en *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín-Santos, 1994). De manera general se ha logrado una buena adaptación de los brotes en invernadero, reportándose más ampliamente en *Obregonia denegrii*, *Coryphantha minima* (Malda *et al.*, 1999a) y en 21 especies trabajadas por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998). El género *Mammillaria* ha sido uno de los más trabajados por CTV, los trabajos publicados se presentarán posteriormente.

El método propuesto por Fay y Gratton (1992) para la propagación vegetativa de cactáceas y otras suculentas *in vitro* se basa en la formación de brotes por el rompimiento de la latencia de meristemas en las aréolas de las cactáceas y en las yemas axilares de las suculentas, usando medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con citocininas solas o en combinación con distintas concentraciones de auxina. Este método ha sido ampliamente probado y comprobado su eficacia para la familia, utilizándose las citocininas (1-2 mg L⁻¹) siempre en mayor concentración que las auxinas (0.1-1 mg L⁻¹).

GÉNERO MAMMILLARIA

En el género *Mammillaria* se ha aplicado el cultivo *in vitro* con mayor amplitud. Dentro de los primeros intentos está el descrito por Minocha y Mehra (1974) en *Neomammillaria prolifera*, obteniendo la formación de callo, en presencia de kinetina (K) y la auxina 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) en altas concentraciones.

Sin embargo, el primer reporte de propagación vía cultivo de tejidos fue para *M. woodsii* (Kolár *et al.*, 1976), donde se obtuvieron callos y regeneración de brotes en medio MS con ácido indolacético (AIA) y K. A partir de estos trabajos se desarrollaron otros más, desde 1974 a la fecha se tienen por lo menos 30 especies de este género. En la Tabla 1, se mencionan los diferentes tipos de explante utilizados, por ejemplo yemas laterales (Fay y Gratton, 1990); plántulas germinadas *in vitro*, de las que se han obtenido explantes basales, apicales y laterales o longitudinales (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 2002; Poljuha *et al.*, 2003); brotes regenerados (Rubluo, 2002); algunos otros autores han recurrido a tejido haploide como las anteras en *M. elongata* (Cheema y Menhra, 1981) y óvulos sin fecundar en *Mammillaria sp.* (Corneanu *et al.*, 1990).

Tabla 1.- Estudios de propagación *in vitro* en algunas especies del género *Mammillaria*.

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	Respuesta morfogénica	Número de brotes por explante	Referencia
<i>Mammillaria prolifera</i>	Plántulas y brotes vegetativos	MS	K (1-2) + 2,4-D (10-20)	Callo	No reportado	Minocha y Mehra (1974)
<i>M. woodsii</i>	Meristemos apicales	MS	K (2) + AIA (2)	Callo y brotes	No reportado	Kolár <i>et al.</i> (1976)
<i>M. elongata</i>	Tubérculos	MS	2ip (10) + AIA (1)	Brotes	No reportado	Johnson y Emino (1979)
<i>M. sphaerica</i> <i>M. gracilis</i>	Tubérculos	MS	2ip (10) + IBA (2)	Callo	No reportado	
<i>M. elongata</i>	Anteras	Nitsch + 20% sacarosa	2,4-D (no específica concentración)	Callo	No reportado	Cheema y Mehra (1981)
<i>M. glassii</i>	Yemas axilares	No específica	BA (1)	Brotes	No reportado	Starling y Dodds (1983)
<i>M. carmenae</i> <i>M. prolifera</i>	Secciones de tallo	MS	BA (2) + ANA (1)	Brotes	Abundantes	Vyskot y Jara (1984)
<i>M. gummifera</i>	Secciones de tallo	MS	Auxinas + Citocininas (no específica)	Callo	No reportado	Ault y Blackmon (1985)
21 especies diferentes de <i>Mammillaria</i>	Plántulas	MS	BA + 2,4-D (no específica concentración)	Callo y brotes	No reportado	Damiano <i>et al.</i> (1986)
<i>M. san-angelensis</i>	Secciones de tallo	MS	BA (0.1)+ ANA(0.01)	Brotes a partir de callo	21-35	Martínez-Vázquez y Rubluo (1989)

Tabla 1 (Continuación)

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	Respuesta morfológica	Número de brotes por explante	Referencia
<i>Mammillaria spp.</i>	Óvulos sin fecundar con placenta	MS	BA (2.25) + AIA (0.18)	Callo y primordios de embriones	No reportado	Corneanu <i>et al.</i> (1990)
<i>M. gracilis</i> <i>Mammillaria spp.</i>	Yemas laterales	MS	BA (2)	Brotos a partir de callo	No reportado	Gratton y Fay (1990)
<i>M. albilanata</i> <i>M. lasiacantha</i> <i>M. mamillaris</i> <i>M. parkinsonii</i> <i>M. solisioides</i> <i>M. theresae</i> <i>M. viperina</i>	Yemas laterales	MS	No especificado	Micropropagación exitosa	No reportado	Fay y Gratton (1992)
<i>M. huitzilopochtli</i> <i>M. san-angelensis</i>	Secciones de tallo	MS	BA (1) BA (0.1)	Callo y brotes	No reportado	Rubluo <i>et al.</i> (1993)
<i>M. candida</i> <i>M. cragii</i> <i>M. uncinata</i>	Laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (1)	Brotos	13.25 4.65 5.25	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> (1998)
<i>M. formosa</i> <i>M. oscura</i> <i>M. sphacelata</i>		MS	BA (1) + ANA (0.1)	Brotos	4.42 4.78 17.50	
<i>M. bocasana</i> <i>M. carmenae</i>	Meristemos de plantas adultas	MS	BA (10) K (1)	Brotos	19.4 23.5	Anicua y Rivas (2000)
<i>M. elongata</i>	Secciones de tallo	MS	BA (no específica concentración) + ANA (0.2)	Callo y brotes	7.5	Papafotiou <i>et al.</i> (2001)
<i>M. pectinifera</i>	Basales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (5) + ANA (0.1)	Callo y brotes	4.38	Giusti <i>et al.</i> (2002)
<i>M. san-angelensis</i>	Brotos regenerados	MS	AIA (6)	Brotos	26.77	Rubluo <i>et al.</i> (2002)
<i>M. gracilis</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	No especificado	Callo	Abundantes	Poljuha <i>et al.</i> (2003)

MS = Medio Murashige y Skoog (1962)
2,4-D = ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
ANA = Ácido Naftalenacético

BA = Benciladenina
2iP = 2 Isopentenil adenina
AIA = Ácido Indolacético
K = Kinetina

En la mayoría de los casos se ha empleado el medio Murashige y Skoog (MS) como medio basal. Este medio se caracteriza por tener una alta concentración de Nitrógeno y para que haya un flujo de nutrientes es conveniente ajustar el pH entre 5.0 y 6.0 (Dabekaussen *et al.*, 1991), ya que altos valores de pH reducen el flujo de nutrientes y en el caso de las cactáceas el número de brotes decrece y si el pH es menor de 5.0 se presentan problemas de gelificación del medio de cultivo (Beyl, 2000).

Cheema y Mehra, (1981) utilizaron oros medios artificiales como el de Nitsch + 20% sacarosa en *M. elongata*. Clayton *et al.* (1990, citado por Rubluo, 1997) usaron distintos medios basales para la proliferación de brotes axiales en distintas especies de la familia Cactaceae. Un requisito indispensable que debe tener el medio basal de propagación de especies de esta familia es el calcio, ya que generalmente el suelo en el que crecen, a pesar de su bajo contenido de materia orgánica, contiene carbonato de calcio en abundancia. La forma más frecuente de éste en los medios de cultivo es el cloruro de calcio (Rubluo, 1997). Los reguladores de crecimiento más comúnmente utilizados son la Benciladenina (BA) y el Ácido Naftalenacético (ANA). Para el género *Mammillaria*, la concentración en que se ha tenido la mayor proliferación de brotes es BA 1 mg L⁻¹ sola o en combinación con ANA 0.1 mg L⁻¹, obteniendo brotes regenerados vía directa o indirecta. Para todas las cactáceas, cualquiera que sea la concentración empleada las citocininas siempre se utilizan en mayor cantidad que las auxinas.

Es importante señalar que para *M. coahuilensis* no se han encontrado reportes en la bibliografía sobre su cultivo *in vitro* o micropropagación, por lo que el presente trabajo se realizó para establecer las condiciones de cultivo adecuado para llevar a cabo su propagación masiva.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Mammillaria coahuilensis* es una especie endémica de limitada distribución geográfica, con poblaciones pequeñas y de crecimiento lento, se encuentra catalogada como Amenazada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001). Como una alternativa para su conservación *ex situ*, en esta trabajo se propone aplicar las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales para lograr su propagación *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.

PARTICULARES

- ❖ Establecer la técnica de desinfección y el medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de *M. coahuilensis*.
- ❖ Evaluar la concentración de citocinina que induzca la formación de brotes adventicios.
- ❖ Estimar el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de los brotes regenerados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron semillas de *M. coahuilensis* que fueron donadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM colectadas en el año 2000 (Lote 1); así como colectadas en la localidad El Amparo cerca de Viesca, Coahuila en el año 2005 (Lote 2), se utilizaron para iniciar los cultivos y para la toma de placas fotográficas con el Microscopio Electrónico de Barrido.

También se utilizaron plantas adultas de *Myrtillocactus geometrizans* donadas por Ecocactus como portainjertos de los brotes no enraizados.

MORFOLOGÍA DE LAS SEMILLAS

Para la descripción de la semilla se utilizaron semillas deshidratadas, las cuales se procesaron de acuerdo a López-Curto *et al.* (2005) y se les tomaron placas fotográficas con el Microscopio Electrónico de Barrido.

DESINFECCIÓN SUPERFICIAL Y SIEMBRA DE SEMILLAS

Debido a su tamaño pequeño (1.5 mm) de las semillas y para facilitar su manejo, éstas se colocaron dentro de un paquete de papel filtro (Whatman No. 1) tal como se reporta para orquídeas (Anónimo, 1997) y posteriormente se sometieron al tren de desinfección. Se lavaron en 50 mL de agua destilada con 3 gotas de detergente líquido Dawn[®], durante 20 min. Posteriormente se desinfectaron con OH al 70% (v/v) 1 min, y 30 min en NaOCl al 30% (v/v) (6% cloro activo, comercial) más 3 gotas de Tween-80 por cada 50 mL de agua destilada. Todo el proceso se realizó en agitación continua. En la campana de flujo laminar se efectuaron cuatro enjuagues con agua destilada esterilizada (1 min c/u). Las semillas de ambos lotes se sembraron en tres diferentes medios de cultivo: agua con agar (A/A); en medio Murashige y Skoog (MS) (Anexo 2) al 50% de macro, micronutrientos y sacarosa (MS 50%); y MS 50% adicionado con 1.5 g L⁻¹ de carbón activado (CA) (MS 50%CA) distribuyéndose cinco semillas por frasco. Todos los medios se ajustaron con HCl y KOH 1N a un pH 5.7-5.8 y se gelificaron con agar bacteriológico Bioxon[®] 8g L⁻¹. El medio se distribuyó en frascos Gerber[®] (25 mL) y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg/cm² durante 18 min. Los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25±2 °C, fotoperiodo 16/8 h e intensidad luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹. El porcentaje de germinación se evaluó diariamente, hasta alcanzar el máximo de germinación, es decir, cuando fue constante.

SIEMBRA DE EXPLANTES

Las plántulas de 0.5 a 1 cm de longitud, con una edad de aproximadamente 5 meses después de la germinación procedentes de los tres medios de germinación, se disectaron para obtener los explantes, primeramente se les eliminó la raíz con un corte transversal y posteriormente se realizaron dos cortes, uno transversal en la parte apical de la plántula y uno longitudinal para obtener un explante apical y dos laterales (Fig. 2).

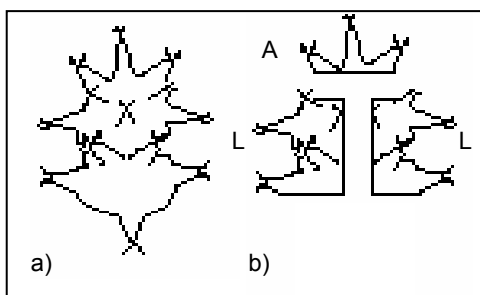


Figura 2.- Disección de los explantes de plántulas de *Mammillaria coahuilensis*. a) Plántula; b) Explante apical (A), explantes laterales (L) y eliminación de la raíz.

INDUCCIÓN DE BROTES

Para la inducción de brotes solo se utilizaron plántulas del lote 1, en el lote 2 solo se ensayó la germinación. Los explantes fueron sembrados en medio MS adicionado con BA 0, 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹. Se utilizaron 4 plántulas por tratamiento, colocando 8 explantes laterales y 4 apicales por concentración de BA. Se realizó una repetición para la concentración BA 0.5 mg L⁻¹, en la que se sembraron 12 plántulas, obteniéndose 24 explantes laterales y 12 apicales.

Los explantes se incubaron bajo las mismas condiciones que para la germinación de semillas. Las respuestas morfogénicas fueron evaluadas semanalmente. Se determinó el mejor tratamiento para la formación de brotes en esta especie, tomando en cuenta el número de brotes por explante de cada tratamiento, así como el origen de los brotes y el tipo de explante del cual regeneraron.

ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO

Para promover la elongación de los brotes estos fueron subcultivados cada 2 meses en medio MS CA 1.5 g L⁻¹. Aquellos brotes con longitud de 1-1.5 cm y que se pudieron separar mecánicamente del resto del tejido fueron transferidos al mismo medio para promover su enraizamiento.

ACLIMATIZACIÓN

Brotos de 1.5 cm con raíces o aún unidos al explante inicial fueron aclimatizados *ex vitro*. Las raíces de los brotes fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada para eliminar los restos de agar. Se sembraron en macetas con sustrato esterilizado constituido por una mezcla de tierra hoja, tierra negra y tepojal (1:1:1), las macetas se colocaron en una charola con tapa de plástico transparente para evitar su rápida deshidratación.

Se mantuvieron en cámara de ambiente controlado con poco riego y después de 4 semanas se trasladaron a condiciones de invernadero con un riego semanal, conservando la tapa hasta por 2 meses para evitar la pérdida de humedad. En este tiempo la tapa fue retirada paulatinamente para una aclimatización gradual.

INJERTOS

Aquellos brotes que tenían de 3 a 3.5 cm de longitud pero que no formaron raíces *in vitro*, fueron utilizados como injertos. Como portainjertos se utilizaron plantas adultas de *Myrtillocactus geometrizans* (Fig. 3). El ápice de la planta se eliminó con una navaja previamente desinfectada con alcohol al 96% (Fig. 3), y se biseló el tallo del portainjertos, de forma piramidal de 1.5-2 cm más o menos (Fig. 3). Los brotes se sacaron directamente de los frascos de cultivo, se les lavó la base y se les eliminó el callo, se realizó el injerto procurando que los haces vasculares de ambas plantas estuvieran en contacto, se sujetó el injerto con una liga (Fig. 3) y todo se cubrió con una bolsa de plástico amarrada con una liga. Después de 1 semana, la liga que sujetaba al injerto se retiró y a las 2 semanas se le hicieron orificios a la bolsa y se quitó la liga que la sujetaba. Después de 6 semanas fue retirada la bolsa. Estos brotes se trasladaron al invernadero directamente.

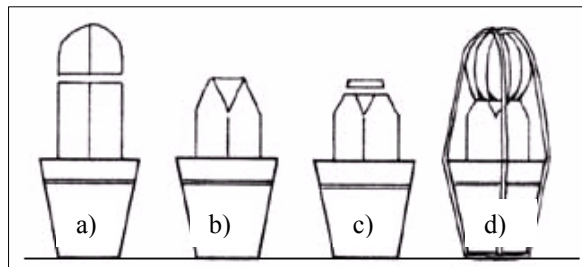


Figura 3.- Procedimiento para injertar brotes no enraizados de *Mammillaria coahuilensis* utilizando como portainjertos plantas de *Myrtillocactus geometrizans*

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESCRIPCIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas de *Mammillaria coahuilensis* poseen una cubierta seminal reticulada. Las semillas del lote 1 no muestran diferencias morfológicas ni en el tamaño con las semillas del lote 2 (Fig. 4). Su tamaño oscila entre los 1500 y los 1750 μm

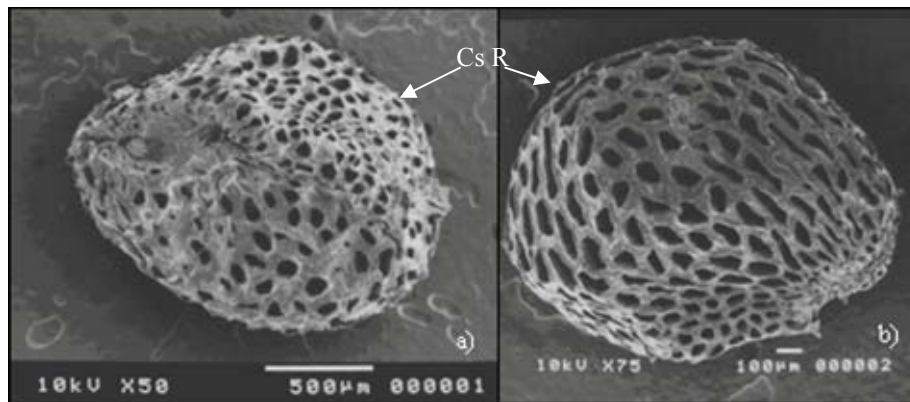


Figura 4.- Semillas de *Mammillaria coahuilensis* a) Lote 1, con 4 años de almacenamiento y b) Lote 2 con 6 meses de almacenamiento. Cubierta seminal Reticulada (Cs R).

El micrópilo y el hilo se encuentran cercanos entre sí formando una zona de células no escleróticas, que en conjunto se denomina como zona hilo-micropilar, la que aparece hundida por ruptura del funículo de la placenta (Fig. 5) (Bregman y Bouman, 1983).

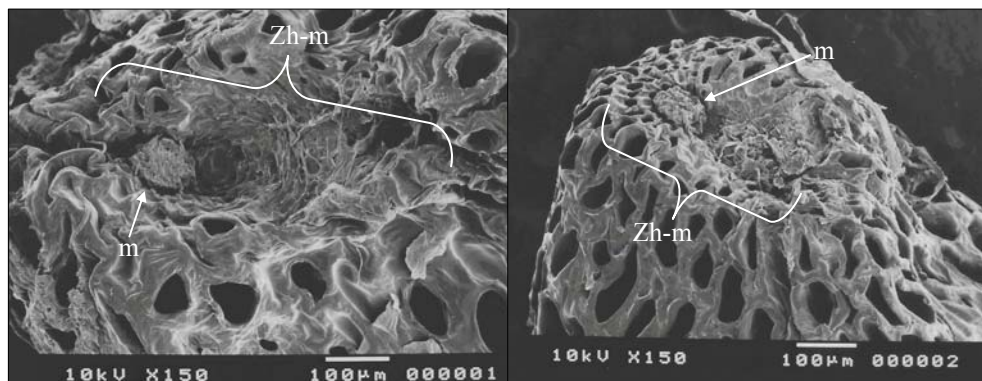


Figura 5.- Zona hilo-micropilar (Zh-m) de semillas de *M. coahuilensis* a) Lote 1 con 4 años de almacenamiento y b) Lote 2, con 6 meses de almacenamiento; micrópilo (m).

DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS SEMILLAS

Se presentó contaminación por hongos en semillas del lote 2 en los distintos medios: 10 semillas en A/A (33.3 %), 9 semillas en MS 50% + CA (8.6 %), y 2 semillas en MS 50% (1.9 %). La contaminación pudo deberse a errores en la manipulación pues la misma técnica en el lote 1 fue exitosa.

GERMINACIÓN

Como criterio de germinación se tomó en cuenta el rompimiento de la cubierta seminal de la semilla y la emergencia de la radícula (Moreno, 1984). El rompimiento de la cubierta seminal ocurrió entre el cuarto y sexto día a partir de la siembra y se presentó en el lomo de la semilla (Fig. 6) a lo largo de la zona hilo-micropilar, emergiendo la radícula, la cual se elongó y se introdujo en el medio nutritivo al octavo o noveno día; en ese mismo lapso surgió un embrión con forma globular, un buen desarrollo del hipocótilo con cotiledones reducidos. Después de 10 días de la siembra el hipocótilo presentó una coloración verde oscuro. A los 14 días el hipocótilo alcanzó una forma cilíndrica, mientras que la radícula continuó su crecimiento. Aproximadamente a los 15 días de la siembra inició el surgimiento del epicótilo marcado por la aparición de las primeras espinas en el meristemo apical. Conforme la plántula se desarrolló (25-30 días), se fueron diferenciando los tubérculos con aréolas bien definidas en su ápice (Fig. 6). Una vez que las plántulas alcanzaron 0.5-1 cm de longitud y que presentaron varias aréolas en el tallo, éstas fueron utilizadas como fuente de explantes, mediante los cortes señalados en la Fig. 2.

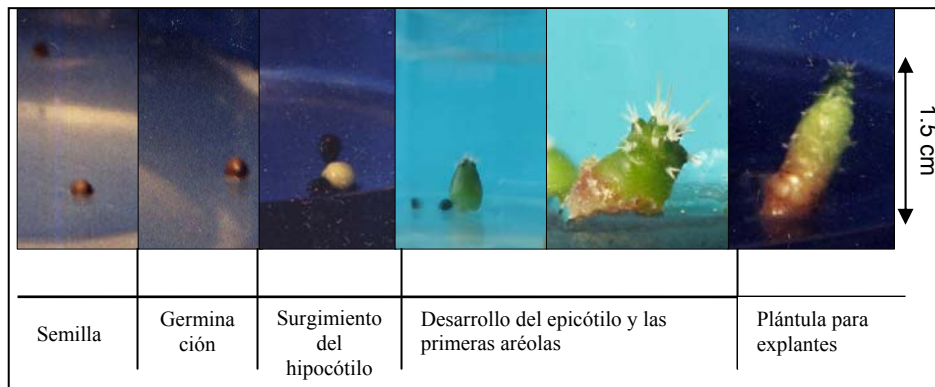


Figura 6.- Secuencia de germinación de *Mammillaria coahuilensis* a partir de la germinación.

Debido a que no se contaba con suficientes semillas en el primer lote y no se tenía la técnica de desinfección establecida, se realizó un ensayo preliminar con 5 semillas que se sembraron en Agua con Agar para determinar si aún eran viables después de cuatro años de almacenamiento. Al ser superada esta etapa se sembraron 153 semillas que se distribuyeron 75 en MS50% y 78 en MS50% CA. En el segundo lote se repartieron 30 semillas en cada uno de los tres medios, un total de 90 semillas.

El porcentaje de germinación varió dependiendo del medio de cultivo utilizado y el tiempo de almacenamiento de las semillas. En promedio, para los dos lotes, la germinación inició alrededor de los 7 días, alcanzando el máximo en promedio a los 27 días para el lote 1 y a los 23 días para el lote 2. Para las semillas del lote 1 (año de colecta: 2000) el mejor medio para la germinación fue agua con agar (A/A) obteniéndose el 60%, sin embargo este dato no fue representativo debido al bajo número de semillas que se utilizaron en el ensayo. Para los otros dos medios los valores fueron similares siendo ligeramente mayor para el MS 50% (38.7%) seguido por MS 50% CA (34.6%).

Los resultados del lote 2 corroboraron que el mejor medio fue A/A (100%), siendo también elevado el porcentaje en MS 50% (90%) y en MS 50% CA (83.3%) (Tabla 2).

Tabla 2. Germinación de semillas de *M. coahuilensis* en los distintos medios, de ambos lotes.

	MEDIO	SEMILLAS GERMINADAS/ SEMBRADAS	GERMINACIÓN %
L1	A/A	3/5	60
	MS 50%	29/75	38.7
	MS 50% + CA	27/78	34.6
L2	A/A	30/30	100
	MS 50%	27/30	90
	MS 50% + CA	25/30	83.3

L1 = lote 1 Tiempo de almacenamiento 4 años

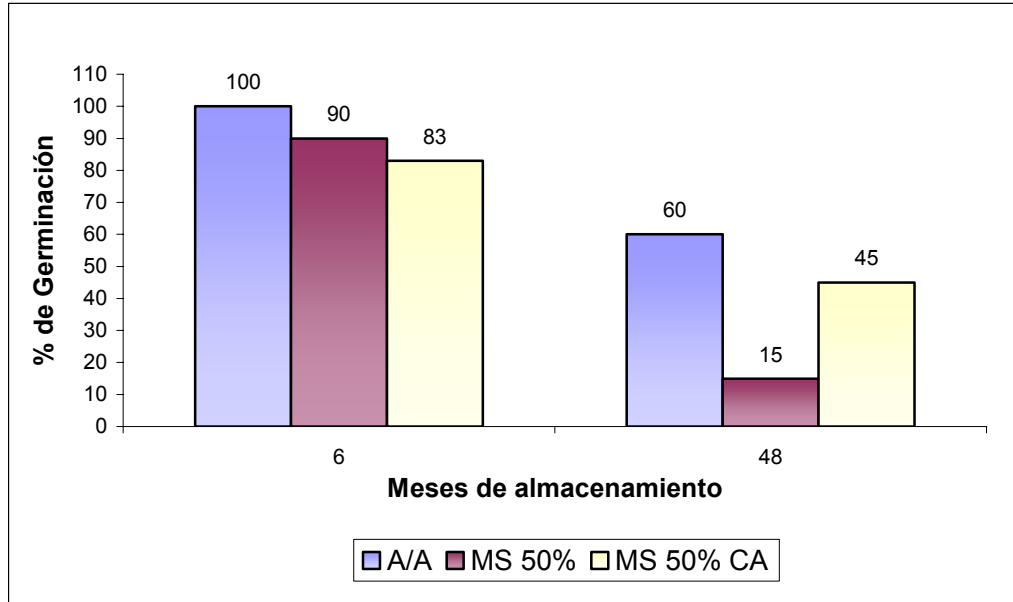
L2 = lote 2 Tiempo de almacenamiento 6 meses

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en *Eriosyce aurata* (Garcés, 2003), en los que se obtuvo un 97% de germinación en agua con agar, contra un 85% en MS al 25% de sus componentes y un 36% en MS completo; al igual que en *Astrophytum myriostigma* (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2000) que presentó 70% de germinación en agua con agar, y 60% en MS al 50%. En ambos reportes esto se explica porque la presencia de sales en un medio compuesto provoca una mayor presión osmótica, limitando la cantidad de agua disponible y por lo tanto existe una lenta imbibición de las semillas, retrasando y limitando la germinación. Una mayor cantidad de agua disponible en el medio permite la entrada rápida de ésta a la semilla, promoviendo la activación de enzimas y la degradación de reservas, la respiración de la misma y por lo tanto su germinación.

La desventaja que presenta utilizar medio A/A como medio de cultivo es que las plántulas se tienen que subcultivar después de la germinación en un medio con nutrimentos para su desarrollo, lo cual podría provocar su contaminación y el estrés o el daño por manipulación, sin embargo con el manejo adecuado de las plántulas se pueden evitar estos problemas.

En la tabla 2 se observa que el lote 2 presentó mayores porcentajes de germinación en todos los tratamientos, lo cual refleja que el tiempo de almacenamiento de las semillas fue también un factor determinante en la germinación de *M. coahuilensis*, entre más tiempo transcurrió entre la fecha de colecta y la siembra de las semillas disminuyó el porcentaje de germinación, casi en un 80%, lo que se puede interpretar como la pérdida de viabilidad de las mismas con el paso del tiempo (Gráfica 1).

La diferencia de germinación de semillas de *M. coahuilensis* a 42 meses más de almacenamiento fue más notoria el MS 50%, con un 75% menos de germinación, la germinación en A/A disminuyó un 40%, mientras que MS 50% CA presentó solo un 38% de decremento.



Gráfica 1.- Porcentaje de germinación en los tres distintos medios a 6 y a 48 meses de almacenamiento.

A lo largo de la germinación y durante el desarrollo de las plántulas se presentaron desórdenes fisiológicos que limitaron la disponibilidad de material biológico como fuente de explantes:

OXIDACIÓN

Las plántulas oxidadas se tornaron de rojizas hasta negras y detuvieron su crecimiento, por lo que no pudieron ser utilizadas como fuente de explantes. La oxidación de las plántulas se presentó en ambos lotes en todos los medios de germinación (Fig. 7).



Figura 7.- Plántula de *M. coahuilensis* con síntomas de oxidación en medio MS 50%, 40 días después de la germinación.

El medio que presentó mayor frecuencia de este fenómeno fue el MS 50% del lote 1 con 11 plántulas oxidadas (38%), seguido por el MS 50% CA del lote 1 con 6 plántulas (22.2%), y el mismo medio con semillas del lote 2 con 2 (7.4%), mientras que el medio MS 50% y A/A del lote 2 sólo presentaron 1 plántula oxidada (3.7 y 3.3% respectivamente) (Tabla 3).

HIPERHIDRATACIÓN



En nueve plántulas de *M. coahuilensis* el tejido comenzó a hincharse presentando una apariencia turgente, acuosa y vitrificada, posteriormente todo el tejido se desdiferenció, aclarando su color e incluso llegando a ser translúcido en algunos casos. Estos tejidos sólo se elongaron y no dieron origen a ningún tipo de órgano (Fig. 8).

Figura 8.- Hipocótilo de *M. coahuilensis* hiperhidratado en medio MS 50% CA, 12 días después de la germinación.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, ya que la hiperhidratación es uno de los principales problemas que el género *Mammillaria* ha presentado durante el cultivo *in vitro*. Los brotes o plántulas hiperhidratados poseen apariencia turgente, con superficie acuosa e hipolignificada, translúcidos y son fácilmente fragmentables (Kevers *et al.*, 2004). En otras 10 plántulas, el tejido desdiferenciado fue de apariencia menos translúcida y vitrificada, su coloración se tornó amarillenta y mostraron organogénesis indirecta, la que posteriormente se describirá.

La hiperhidratación según Fay y Gratton (1992), es un fenómeno que se puede evitar utilizando carbón activado, sin embargo en *M. coahuilensis* el medio que contenía carbón activado fue precisamente el que tuvo el mayor número de plántulas hiperhidratadas (9 en total, contra 7 de MS 50% y 3 en A/A). En todo caso, se tendrían que utilizar otros métodos para evitar este fenómeno, como un medio con mayor cantidad de agar, lo cual reduce la cantidad de agua disponible.

La tabla 3 resume los problemas que se presentaron para obtener material biológico para la micropropagación de *M. coahuilensis*. Se observa que los principales problemas fueron la oxidación de las plántulas en el lote 1, seguida de la contaminación de las semillas del lote 2 y el menor problema fue la hiperhidratación.

El medio de agua con agar presentó el menor número de plántulas tanto hiperhidratadas como oxidadas, el factor que provocó la mayor pérdida de material fue la contaminación. Se observa que las plántulas del lote 2, es decir las que provenían de semillas de solo 6 meses de almacenamiento, son las que presentaron con menor frecuencia oxidación e hiperhidratación.

Tabla 3.-Pérdida de material biológico (semillas y plántulas) de *M. coahuilensis* en los distintos medios debido a contaminación, hiperhidratación y oxidación.

	Semillas germinadas/ sembradas	Semillas contaminadas	Hiperhidratadas	Oxidadas	Disponibles
Lote 1					
A/A	3/5	0	1	0	2
MS 50%	29/75	0	6	11	12
MS 50% CA	27/78	0	6	7	14
Lote 2					
A/A	30/30	10	2	1	17
MS 50%	27/30	2	1	1	23
MS 50% CA	25/30	9	3	2	11
Total	141/248	21	19	22	79

L1 = lote 1 Tiempo de almacenamiento 4 años

L2 = lote 2 Tiempo de almacenamiento 6 meses

RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS

Después de 5 meses de incubación en los tres medios nutritivos utilizados para la germinación, las plántulas del lote 1 de *M. coahuilensis* que alcanzaron 0.5-1 cm se seccionaron para obtener explantes. Se observó la regeneración de brotes por activación de yemas axilares (aréolas) y por organogénesis indirecta, en todos los explantes sembrados.

ACTIVACIÓN AREOLAR

Durante la cuarta y sexta semanas de incubación los dos tipos de explantes (apicales y laterales) incrementaron su volumen, triplicando su tamaño, provocando que los tubérculos se separaran entre sí.

EXPLANTES APICALES

Los explantes apicales conservaron su forma globosa, aún con el incremento de tamaño. Entre la cuarta y quinta semana de incubación, en medio con hormonas, aparecieron pequeños abultamientos esféricos en las axilas o base de los tubérculos, en lo que probablemente corresponde a las areólas florales (Fig. 9a), pues el género *Mammillaria* se caracteriza por la presencia de aréolas dimórficas. A los 5 días de su aparición, se manifestaron espinas en el centro del abultamiento. En la siguiente semana se desarrollaron tubérculos en dichos abultamientos con las espinas que fueron evidentes con anterioridad; en 7-8 semanas de incubación se diferenciaron los brotes globosos de color verde oscuro con espinas blancas (Fig. 9b). Con el paso del tiempo estos brotes se elongaron y presentaron un mayor número de espinas a las 10 semanas (Fig. 9c).

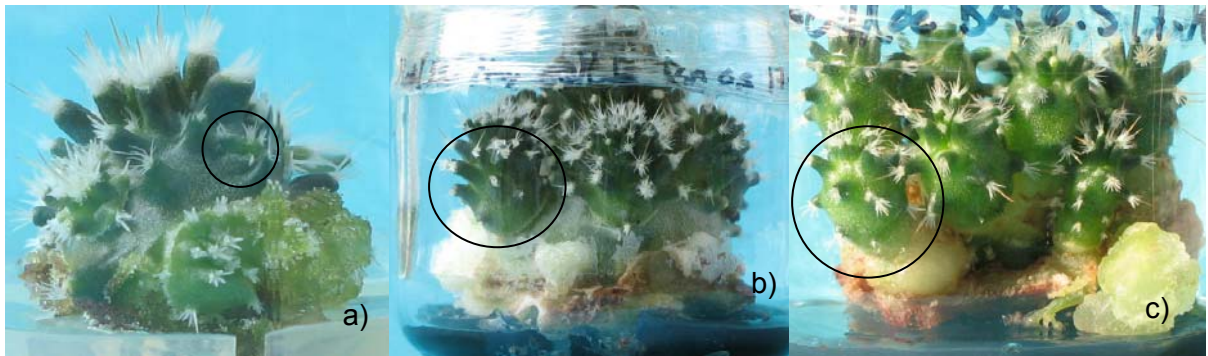


Figura 9.- Organogénesis directa en explantes apicales de *M. coahuilensis*. Se observa el desarrollo de brotes entre las axilas de los tubérculos, posiblemente de las aréolas florales; a) aparición de brotes a la 5a semana; b) elongación de los brotes y tubérculos de 7-8 semanas; c) brotes diferenciados de 10 semanas.

EXPLANTES LATERALES

Entre la cuarta y sexta semanas de incubación en el medio con hormonas el incremento en el volumen de los explantes laterales provocó que los tubérculos se separaran entre sí. En la zona de los meristemas florales en la axila de los tubérculos, donde se manifestaron pequeños abultamientos esféricos (Fig. 10a), en el centro de estos abultamientos se evidenciaron espinas blancas a los 5 días de su aparición, los abultamientos formaron un cono y del ápice del mismo surgieron los tubérculos con espinas (Fig. 10a). En la siguiente semana los abultamientos incrementaron de tamaño y de estos surgieron los brotes con tubérculos (Fig. 10b). En una semana más se observaron brotes diferenciados ligeramente globosos de color verde oscuro (Fig. 10c).

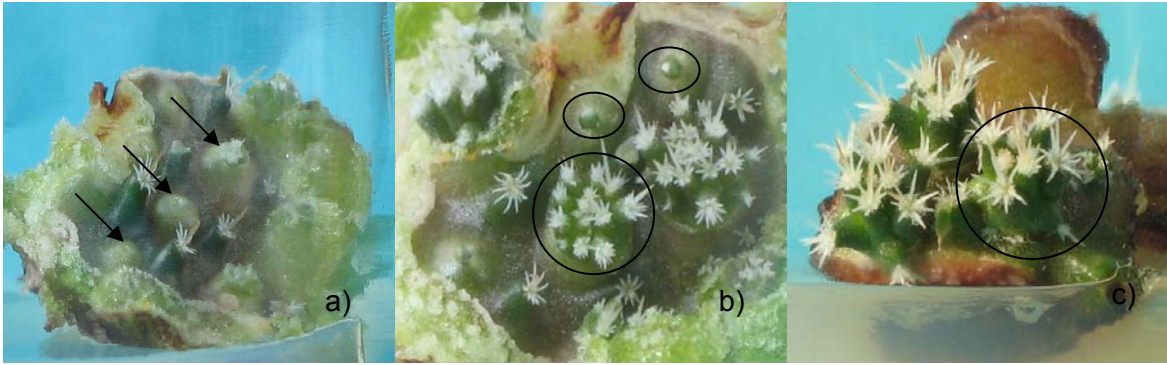


Figura 10.- Organogénesis directa en explantes laterales de *M. coahuilensis*. Se observa la secuencia del desarrollo de brotes adventicios en la zona de las aréolas florales, entre las axilas de los tubérculos; a) aparición de abultamientos a las 4 semanas de incubación, se observa el surgimiento de las primeras espinas y tricomas del brote; b) desarrollo de brotes a las 7 semanas y la aparición de otros en fase inicial en la parte superior; c) elongación de los brotes.

Estos brotes al elongarse perdieron su forma globosa y fueron cilíndricos, los tubérculos fueron más pequeños y separados entre sí, con una coloración menos verde, ligeramente amarilla a las 8 semanas de incubación (Fig. 11).



Figura 11.- Brotes elongados de explantes laterales de *M. coahuilensis*, de BA 0.5 mg L⁻¹.

El mayor número de brotes se presentó en el tratamiento BA 1 mg L⁻¹, con 21.25 brotes en promedio por explante lateral, seguido de 9.8 en BA 0.5 mg L⁻¹. En los explantes apicales la mayor cantidad de brotes se presentó en BA 1 mg L⁻¹ (7.5) seguido de BA 0.5 mg L⁻¹ (7) (Tabla 4). El número de brotes obtenidos a partir de explantes laterales fue mayor que en los apicales, siendo notoria la diferencia en las concentraciones en BA 0.5 y 1 mg L⁻¹, probablemente por la dominancia apical que siguió teniendo el ápice y que impidió el desarrollo de nuevos brotes, además de que los explantes laterales incrementaron su tamaño más que los apicales, proveyendo de más espacio para el desarrollo de los brotes, siendo una ventaja remover el ápice de las plántulas al obtener los explantes, pues se rompe la dominancia apical, lo cual repercute en una mayor regeneración de brotes.

Tabla 4.- Número de brotes en explantes cultivados *in vitro* de *M. coahuilensis* en medio MS adicionado con BA.

Número de brotes por explante*				
BA mg L ⁻¹				
	0	0,5	1	2
E. Apical	1 ± 0	7 ± 4.24	9.8 ± 11.14	4.75 ± 0.35
E. Lateral	1.75 ± 1.98	8.86 ± 8.07	21.25 ± 0.35	5.1 ± 3.36

* El número de brotes por explante fue calculado dividiendo el número total de brotes entre el número total de explantes.

± Desviación estándar.

El número de brotes en ambos explantes disminuyó considerablemente al incrementarse la concentración de BA, probablemente concentraciones mayores a 2 mg L⁻¹ podrían actuar como inhibidoras de la activación de los meristemas, como comprobaron para *M. san-angelensis* Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) quienes reportaron de 25-30 brotes por explante en medio MS con concentraciones muy bajas de reguladores de crecimiento, BA 0.1mg L⁻¹ y ANA 0.01 mg L⁻¹. La cantidad de brotes regenerados en *M. coahuilensis* fue mayor en comparación con los reportados en el género, en explantes laterales en medio nutritivo con BA 1 mg L⁻¹, en *M. cragii* se reportaron 4.65 brotes por explante, 5.25 en *M. uncinata* y 13.25 en *M. candida* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), probablemente el efecto de la citocinina fue mayor en *M. coahuilensis*, tal vez por la presencia de reguladores de crecimiento endógenos.

A pesar de obtener un mayor número de brotes por explante en medio BA 1 mg L⁻¹, los brotes de BA 0.5 mg L⁻¹ presentaron una apariencia más vigorosa con respecto a los brotes de BA 1 mg L⁻¹, es decir, una coloración más oscura, una mayor longitud y en apariencia una mayor cantidad de espinas, además se encontraban menos agrupados facilitando su individualización, además de que presentaron enraizamiento espontáneo. Por lo anterior se realizó una repetición en BA 0.5 mg L⁻¹ sembrándose 12 plántulas, de las que se obtuvieron 4.83 brotes por explante apical y 6.83 brotes por explante lateral; a pesar de ser brotes más grandes no se obtiene un número mayor de explante y no se confirma como la mejor concentración. Los brotes de BA 1 mg L⁻¹ presentaron menor longitud, un color menor oscuro y aparentemente un menor número de espinas que las de BA 0.5 mg L⁻¹.

Mientras que los brotes de ambos tipos de explante en medio BA 2 mg L⁻¹ presentaron una coloración amarillo-verdosa, así como un menor número de espinas, forma más globosa, no elongada y permanecieron unidos al explante inicial, impidiendo su individualización.

FORMACIÓN DE CALLO

A la semana de incubación en todos los tratamientos los explantes tanto apicales como laterales, comenzaron a desarrollar callo en la base de los mismos. Sólo el 15 % de los explantes (12) se desdiferenciaron por completo dando origen a callos de color verde claro y una consistencia desmenuzable que regeneraron brotes por organogénesis indirecta después de 8 semanas de incubación.

A las 4 semanas se distinguieron dos tipos de callo, uno caracterizado por ser de color verde claro, algunas veces completamente blanco y desmenuzable, y el otro de consistencia más compacta y rojiza, esta coloración se atribuye posiblemente a la presencia de betalaínas como lo reportaron Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) para la familia Cactaceae (Fig. 12).

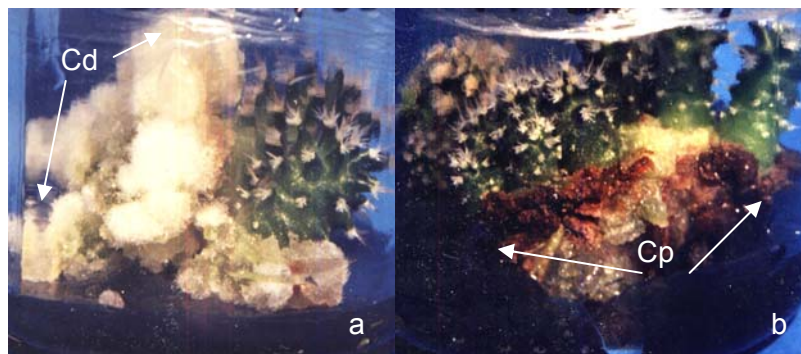


Figura 12.- Explantes laterales de *M. coahuilensis* mostrando dos tipos de callo: a) callo desmenuzable (Cd) y b) callo compacto (Cp) a las 12 semanas de incubación.

Por lo general las altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo favorecen la consistencia desmenuzable del tejido, mientras que la presencia de citocininas tiende a producir tejidos de consistencia más dura (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Sin embargo, en *M. coahuilensis* se desarrolló callo desmenuzable en ausencia de hormonas, en el caso de las plántulas hiperhidratadas, lo cual se puede deber a las hormonas endógenas de las plántulas, y en presencia de BA, en el caso de los dos tipos de explantes, se desarrolló callo tanto desmenuzable como compacto.

ORGANOGENESIS INDIRECTA

A las 8 semanas de incubación en medio con la citocinina, tanto explantes apicales como laterales desarrollaron callo de apariencia desmenuzable de color verde claro con trazas de color blanco, a las 9 semanas la coloración se intensificó en algunas zonas y el tejido comenzó a compactarse, y después de 10 semanas el tejido se compactó aún más tomando una forma globosa, e iniciando la diferenciación de brotes adventicios. A las 11 semanas se presentaron las primeras espinas en los brotes, los cuales se elongaron y posteriormente se pudieron separar del callo (Fig. 13).

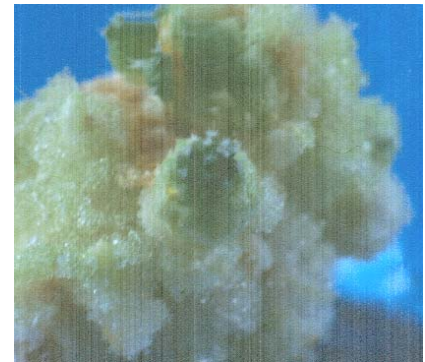


Figura 13.- Regeneración de brotes a partir de callo de *M. coahuilensis* de explante lateral en BA 0.5 mg L⁻¹, a las 11 semanas de incubación.

Se generaron 8.5 brotes en promedio a partir de 2 explantes apicales en el tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹, y fue más frecuente en todos los tratamientos con los explantes laterales, aunque el número de brotes regenerados fue menor, en las otras concentraciones de BA, entre 1 y 5 callos formando de 1 a 8.2 brotes en promedio por callo (Tabla 5). Estos resultados contrastan con los reportados por Mata *et al.* (2001) para *Turbinicarpus laui* que en BA 0.5 mg L⁻¹ presentó formación de callo en el 50% de los explantes y una regeneración de 88.4 ± 77.4 brotes por explante después de 13 semanas de incubación, mostrando mayor capacidad regenerativa.

Tabla 5.- Regeneración promedio de brotes por explante que formó callo (organogénesis indirecta) en *M. coahuilensis*

		BA mg L ⁻¹			
		0	0.5	1	2
Apicales	Callo de explante	-	2	-	-
	Brotes por explante	-	8.5	-	-
Laterales	Callo de explante	1	5	2	1
	Brotes por explante	1	8.2	4	2

Los callos que se desarrollaron en BA 0.5 mg L⁻¹ fueron los más regenerativos. Aparentemente, los brotes regenerados por esta vía tienen un aspecto morfológico similar a la planta original, esta observación coincide con la de Anicua y Rivas (2000) en la propagación *in vitro* de *M. bocasana*.

Plántulas de los tres medios de germinación que se hiperhidrataron, dieron origen, sin reguladores de crecimiento, a callos desmenuzables, y se presentó organogénesis indirecta a los 25-35 días a partir de su hiperhidratación. A partir de una plántula hiperhidratada en A/A se formaron 5 brotes, en MS 50% de tres plántulas, 24 brotes, y de MS 50% CA a partir de 2 plántulas se regeneraron 17 brotes. Estos brotes se desarrollaron de manera normal, sin presentar signos de hiperhidratación y se subcultivaron en medio MS adicionado con 1.5 mg L⁻¹ de carbón activado para promover su enraizamiento.

ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE FORMAS CRESTADAS

Las formas crestadas son un mecanismo genético que puede operar a través de un desbalance hormonal, restringido a los meristemas y sus proximidades (Papafotiou *et al.*, 2001). En *M. coahuilensis* se presentaron formas crestadas, vía organogénesis indirecta. Una forma crestada surgió de una plántula desdiferenciada que formó callo desmenuzable sin reguladores de crecimiento, que mostró 5 ápices en 2 meses de cultivo a partir de que se regeneró el brote (Figura 14a); y otra forma crestada se regeneró de un explante lateral en el tratamiento BA 1 mg L⁻¹ que presentó 8 ápices en el primer mes de cultivo, los cuales conservó a lo largo de su desarrolló hasta su aclimatización (Figura 14b).

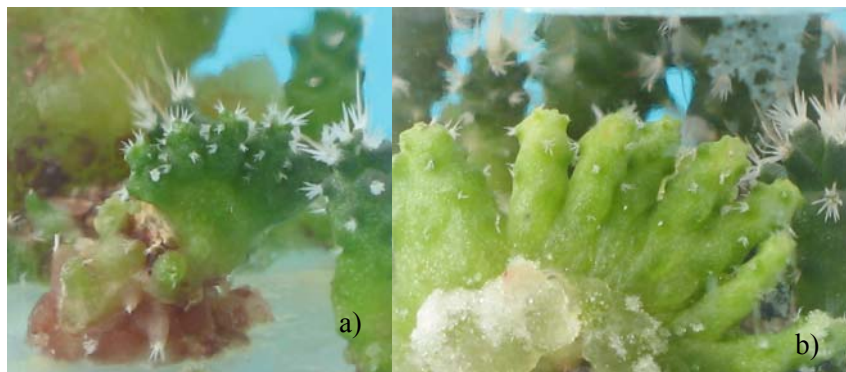


Figura 14.- Organogénesis indirecta de formas crestadas de *M. coahuilensis* regeneradas a partir de: a) plántula sin inducción de reguladores de crecimiento; y b) explante en tratamiento de BA 1 mg L⁻¹.

Este fenómeno puede deberse a los reguladores de crecimiento, tanto endógenos como exógenos de la planta, que provocan un desbalance en condiciones de estrés provocadas por la desinfección, en el caso de la plántula y la disección en el otro caso, además de la condiciones de cultivo. Estas formas crestadas no formaron raíces y sólo callo en la base del explante.

SUBCULTIVO DE BROTES

Los brotes regenerados por activación de yemas axilares de los distintos tratamientos se subcultivaron a las 10 semanas de incubación en medio MS+CA. Los brotes que permanecieron de forma agrupada no se individualizaron para evitar mayor estrés físico por la disección y se subcultivaron de manera agrupada, aún unidos al explante. En todos los casos presentaron callo en la base del explante, desarrollando algunos de ellos raíces a partir del callo a las 18 semanas de incubación; mientras que los brotes que fue posible individualizar subcultivaron en el mismo medio MS+CA, desarrollando raíces a las 5 semanas del subcultivo. Los brotes agrupados presentaron un crecimiento más limitado que los brotes individualizados, probablemente por la competencia de espacio y nutrientes a la que se vieron sujetos.

Los brotes de BA 0 mg L⁻¹ a las 8 semanas del subcultivo presentaron un color verde oscuro, con numerosas espinas blancas, tallo de forma cilíndrica ligeramente alargados de 1.7 a 2.3 cm y tubérculos elongados. Los brotes de BA 0.5 mg L⁻¹ mostraron la coloración y forma de los anteriores, pero con una altura de entre 2 y 4.2 cm con tubérculos más grandes. Al incrementar la concentración de BA disminuyó la coloración y tamaño de los brotes; así para BA 1 mg L⁻¹ el color varió desde verde claro a amarillo verdoso con un tamaño promedio de 1 a 1.6 cm con tubérculos poco elongados, espinas blancas no muy numerosas y para BA 2 mg L⁻¹ una coloración amarillo verdosa y un tamaño entre 0.8 y 1 cm, con tubérculos no elongados y pocas espinas blancas.

Los brotes regenerados a partir de callo no presentaron diferencias morfológicas entre tratamientos, ni tipo de explante, se individualizaron retirando el callo adyacente y se subcultivaron en medio MS+CA a la 5ª semana de incubación. Presentaron forma globosa con una altura entre 0.8 y 1.8 cm de longitud a las 8 semanas de incubación, de color verde claro, espinas blancas y espaciadas, con tubérculos en apariencia poco numerosos.

ENRAIZAMIENTO DE BROTES

El enraizamiento de los brotes no necesitó de la adición de auxinas exógenas, ya que ocurrió de manera espontánea en el medio con carbón activado.

Se ha reportado que el carbón activado tiene la capacidad de absorber algunos fitorreguladores promoviendo de esta forma el enraizamiento (Pan y Van Staden, 1998), además de exudados que pueden inhibir el crecimiento de los tejidos permitiendo así la elongación de los brotes, tal y como se observó en *M. coahuilensis* donde los brotes alcanzaron tallas entre 3-4 cm de longitud después de ser individualizados.

El enraizamiento *in vitro* de *Mammillaria* es considerado de manera general una tarea sencilla y Hubstenberger *et al.* (1992, citado por Rubluo, 1997) reportaron 8 especies de *Mammillaria* de las cuales 6 enraizaron de manera espontánea sin la presencia de auxinas. Las demás especies fueron tratadas con AIB o AIA, sin embargo, su eficiencia en el enraizamiento no ha sido comprobada. Rubluo *et al.* (1993) reportó que para *M. san-angelensis* se obtuvo de manera sencilla un sistema radicular, los brotes se individualizaron y subcultivaron en medio MS libre de hormonas, obteniendo un 100% de enraizamiento. *M. coahuilensis* presentó dos tipos de enraizamiento espontáneo:

1. Rizogénesis directa.- las raíces surgieron entre 6-8 semanas después después del subcultivo en MS+CA en la base del brote individualizado y éste no presentó desarrollo de callo (Fig. 15a). Las raíces se elongaron más de 2 cm a las 10 semanas de subcultivo.
2. Rizogénesis con callo.- los brotes individualizados o que se subcultivaron aún con el explante desarrollaron callo en la base y a las 12-14 semanas de subcultivo se desarrollaron raíces que surgían entre el callo, el cual se retiró en el trasplante y las raíces permanecieron elongadas (Fig. 15b).

Los brotes que no presentaron enraizamiento desarrollaron callo desmenuzable en la base (Fig. 15c). De los 304 brotes regenerados por activación areolar del explante el 32.5% de los brotes (99) presentó rizogénesis directa, 34.5% rizogénesis indirecta, y el restante 33% presentaron callo en la base (Tabla 6). De los 69 brotes regenerados a partir de organogénesis indirecta, 29% presentó rizogénesis directa, 42% rizogénesis indirecta y el restante 29% de brotes callo en la base (Tabla 7).

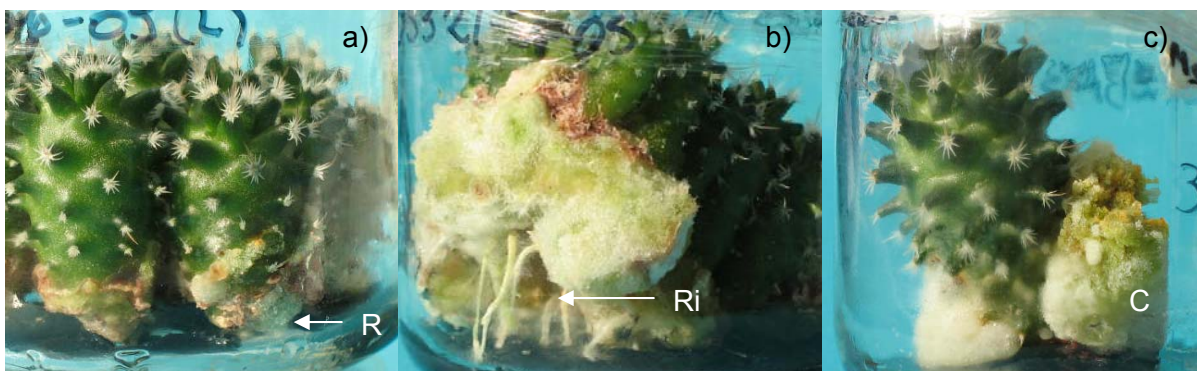


Figura 15- Brotes de *M. coahuilensis*, a) brotes con rizogénesis directa (R), b) rizogénesis indirecta (Ri), y c) callo desmenuzable en la base del brote (C).

Tabla 6.- Número de brotes enraizados de *M. coahuilensis* regenerados por activación areolar en los distintos tratamientos.

BA mg L ⁻¹	Explante	Rizogénesis directa	Rizogénesis indirecta	Callo en la base (No. de brotes)
0	Apical	3	2	-
	Lateral	3	5	3
0.5	Apical	17	6	5
	Lateral	46	22	15
1	Apical	5	10	15
	Lateral	25	48	34
2	Apical	-	6	8
	Lateral	-	6	20

Tabla 7.- Número de brotes enraizados de *M. coahuilensis* regenerados por organogénesis indirecta de los distintos tratamientos.

BA mg L ⁻¹	Explante	Rizogénesis directa	Rizogénesis indirecta	Callo en la base (No. de brotes)
0	Apical	-	-	-
	Lateral	-	1	-
0.5	Apical	5	8	4
	Lateral	15	14	12
1	Apical	-	-	-
	Lateral	-	6	2
2	Apical	-	-	-
	Lateral	-	1	1

El mayor número de brotes con rizogénesis directa lo presentó BA 0.5 mg L⁻¹ en los explantes laterales (46 brotes, 55%) un porcentaje mayor al que presentó *Obregonia denegrii* (28%), pero ligeramente menor que el presentado en *Coryphantha minima* (59%) en el trabajo de Malda *et al.* (1999).

Típicamente las citocininas se observan como inhibidores del proceso de enraizamiento (Van y Harty, 1988), lo cual explicaría la falta de formación; sin embargo en las investigaciones de Llano (1989), el autor observó que las citocininas también inducen la formación de raíces. Esto por que se desconocen los diversos factores de las citocininas en el metabolismo de la planta.

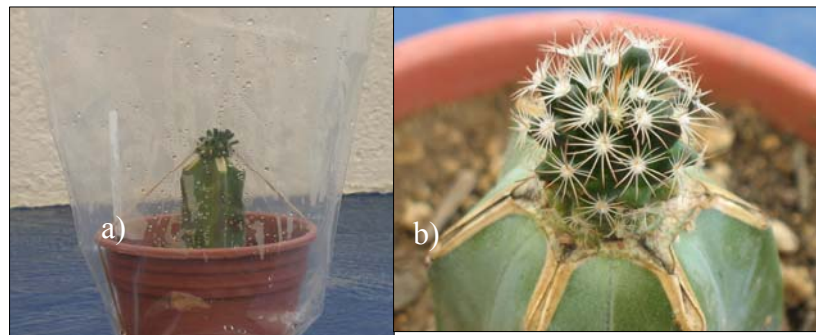
ACLIMATIZACIÓN

Durante la aclimatización los brotes se comportaron homogéneamente, sin mostrar diferencias morfológicas entre tratamientos ni tipo de explante del que provenían o vía de regeneración. Los brotes presentaron una apariencia rugosa de la epidermis y una disminución de tamaño, ambos son síntomas de deshidratación que son explicados por Malda *et al.* (1999b) por la permanencia de los estomas abiertos no funcionales, además de que los brotes son sometidos a una humedad relativa menor que la que experimentaban en condiciones *in vitro*. También se pudo observar una disminución en la coloración de los brotes debido a la pérdida de pigmentos por el aumento de la intensidad luminosa que afecta el funcionamiento del aparato fotosintético, pues en un principio no es funcional (Malda *et al.*, 1999b). A las tres semanas después del trasplante los brotes presentaban nuevas aréolas con espinas rojizas en el ápice, como resultado de su crecimiento, lo que hace suponer que los sistemas estomáticos y fotosintéticos ya eran funcionales, lo cual se hace evidente por una apariencia más sana, menos deshidratada y mayor pigmentación de los brotes (Fig. 16). Después de dos meses en condiciones de invernadero de 254 brotes en aclimatización, se registró una sobrevivencia del 52.76%. El resto de los brotes presentaron deshidratación extrema por lo cual colapsaron.



Figura 16.- Brotes de *M. coahuilensis* de dos meses de aclimatización. Se observan sin síntomas de deshidratación.

Para 9 brotes que no formaron raíces se realizaron injertos. Se utilizaron 7 brotes del tratamiento BA 0.5 mg L⁻¹ y 2 del tratamiento control, todos de explantes laterales, usando como portainjertos plantas adultas de *Myrtillocactus geometrizans*. Después de una semana, los brotes injertados presentaron el ápice seco debido al estrés físico provocado por la liga con la que se sujetaron. La bolsa que se les colocó evitó una deshidratación más severa, aún así los brotes presentaron una mayor deshidratación que los brotes trasplantados en sustrato (Fig. 17a), pues no tuvieron aclimatización previa en la cámara de ambiente controlado. En la semana 4 se desarrollaron nuevas aréolas con espinas rojizas que denotan el crecimiento de los brotes con el consecuente desarrollo de tejido fotosintético funcional (Fig. 17b). A pesar de ser más evidentes los síntomas de deshidratación, se obtuvo un 100% de sobrevivencia *ex vitro* de los brotes injertados, teniendo una aclimatización exitosa, convirtiéndose este método en una opción exitosa para el rescate de brotes sin raíces.



Del mismo modo, los injertos pueden utilizarse para cultivar variedades con requerimientos relativamente estrictos en materia de nutrición sobre pies más rústicos, y permite acelerar la madurez reproductora de plántulas seleccionadas, aprovechando la madurez del pie.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró establecer la técnica de desinfección de semillas de *Mammillaria coahuilensis*.
- El mayor porcentaje de germinación de semillas se registró en el medio agua con agar. La viabilidad de las semillas se perdió con el tiempo de almacenamiento.
- La contaminación, la oxidación y la hiperhidratación constituyeron problemas para el desarrollo de las plántulas y limitó la disponibilidad de explantes. El medio Agua con Agar fue el que presentó menos problemas en el desarrollo de las plántulas, pero mayor contaminación.
- Las respuestas morfogénicas observadas fueron la formación de callo, la regeneración de brotes en forma indirecta y la activación de yemas axilares (aréolas florales), siendo un evento poco común, pues en *Mammillaria* solo se había registrado para aréolas espiníferas.
- La organogénesis directa se presentó en los dos tipos de explantes, siendo superior en los laterales que en los apicales.
- El mayor número de brotes generados de *M. coahuilensis* fue en BA 1 mg L⁻¹.
- Los brotes más vigorosos, con color más oscuro, mayor elongación, mayor número de espinas y tubérculos elongados, se presentaron en el tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹.
- La rizogénesis fue directa e indirecta de manera espontánea.
- Se obtuvo el 52.76 % de sobrevivencia de 254 brotes aclimatizados, con lo que se obtuvieron 134 brotes en invernadero.
- Los brotes injertados registraron un 100% de sobrevivencia hasta 7 meses después de injertados.
- **Se establecieron las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.**

VIII. REFERENCIAS

- Aceves J. y J. Hernández. 2000. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. *Revista Ciencia Administrativa del Colegio Profesional de Biólogos del Estado de Veracruz*. Pp. 64-69.
- Anicua F. J. y V. B. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de Cactáceas Endémicas y Amenazadas o en Peligro de Extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM, ENEP-Iztacala, México. 70 p.
- Anónimo. 1997. Técnicas de micropropagación: un ejemplo las orquídeas. Manual del curso Latinoamericano y del caribe. BUAP-UNAM.
- Arias-Montes S. 1997. Distribución General. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 17-25.
- Arias-Montes S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto, y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción: una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), la lista roja (UICN) y CITES. *Cac. Suc. Mex.* 50(4): 100-125.
- Arreola H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 27-35.
- Ault J. R. y W. J. Blackmon. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species (Abst). *Hortic. Sci.* 20: 541.
- Becerra R. 2000. Las Cactáceas. *Biodiversitas* 32 (6): 1-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2003. Las cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 40(6): 8-11.
- Beyl C. 2000. Getting started with tissue culture –media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 21-38.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. I. 2ª ed. UNAM. México D. F. p. 107.

- , 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México D. F. 164-165 p.
- Bravo-Hollis H. 1997. Introducción. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 10-12.
- Bregman R. y F. Bouman. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Bot. Jour. Linnean Soc.* 86: 357-374.
- Bhau B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. *Hortic. Sci.* 81: 337-344
- Caponetti J., D. Gray y R. Trigiano. 2000. History of plant tissue and cell culture. In: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 11-17.
- Cheema G. y P. Mehra. 1981. Anther culture of a cactus. *Nat. Cactus Succulent J.* 36(1): 8-11.
- Collin H. y S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers. New York. 310 pp.
- Corneanu M., G. Corneanu y S. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. En: Abstracts of the VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Abstract A3-66: 99.
- Corona N. V. y Chávez-Ávila V. 1982. Cultivo de Cactáceas en medios asépticos. *Cac. Suc. Mex.* 27:17-23
- Dabekaussen M., R. Pierik, J. van der Laken y H. Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Hort. Sci.* 46:283-294.
- Damiano C., P. Curir, T. Cosmi y B. Ruffoni. 1986. Tissue culture of *Mammillaria* spp. *Hortic. Sci.* 2(3):804 (Abstr).
- Fay M. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and others succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Franco S. 1997. Legislación y conservación. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 101-111.
- Garcés M. 2003. Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (Cactaceae), una especie en estado de conservación vulnerable endémica de Chile. Tesis Magíster en Ciencias

- Agropecuarias. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería forestal. 54 pp.
- Garrido G. M. 1998. Evaluación del Metabolismo Ácido de Crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatización a suelo. Tesis de Licenciatura de Biología. UNAM, ENEP-Iztacala, México. 138 p.
- Giusti P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Horti. Sci.* 95(4):319-332.
- Gratton J. y Fay M. 1990. Vegetative Propagation of Cacti and Other Succulents *in vitro*. En: Pollard J. y M. Walker (Eds.), *Plant Cell and Tissue Culture Methods in Molecular Biology*. Ohio University Press. Columbia. 6:219-225.
- Guzmán V., S. Arias-Montes y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM. CONABIO. México. p. 119.
- Hernández H. y H. Godínez. 1994. Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Hunt D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens. Kew, Surrey. 190 pp.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 1999. Superficie de la República Mexicana por Estados.
- IUCN (International Union Conservation of Nature). 1994. Rare, threatened and insufficiently known endemic cacti of Mexico. Botanic Gardens Conservation-Coordinating Body. Threatened Plants Unit. Threatened Plants Committee. July 83. 9 pp.
- Jayasankar S. 2000. Variation in tissue culture. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 387-395
- Johnson L. y R. Emino. 1981. Axillary Meristem Development in *Mammillaria elongata*. J. Amer. Soc. *Hort. Sci.* 106(1):110-113.
- Kadlecek P., I. Tichá, D. Haisel, V. Capkova y C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pre-treatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161:695-701.
- Kevers C., F. Thierry, R. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:181-191.

- Kolár Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue culture. *Experientia* 32: 668-669.
- León de la Luz J., L. y A. Valiente-Banuet. 1994. Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominantemente mexicano. *Ciencia y Desarrollo*. 20(117): 58-65
- Llano A. 1989. Efecto de citocininas y auxinas en embriones de aguacate (*Persea americana* Mill. Raza mexicana) cultivados *in vitro*. Tesis Maestría en Ciencias, especialidad Fruticultura, Universidad de Chapingo. México. 197 p.
- López-Curto M., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas: Libro de Laboratorio. 2ª ed. Coordinación de Servicios Editoriales, Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F. 178 p.
- Lozoya S. H. 1985. Micropropagación vegetal. *Ciencia y Desarrollo*. 65:63-70
- Malda G., R. Backhaus y C. Martín. 1999a. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 1-9.
- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999b. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Hort. Sci.* 81:71-87.
- Martínez-Vázquez O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hortic. Sci.* 64(1):99-105.
- Mata M., M. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:400-404.
- Mauseth J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. Suc. J. (US)*. 51:186-187.
- Minocha S. C. y P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2): 168-173.
- Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, México. p 103-106.
- Murashige T. y F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

- Olguín-Santos L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85 p.
- Oliveira S., M. Machado, A. Prioli y C. Mangolin. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 31:47-50.
- Papafotiou M., G. Balotis, P. Louka y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:163-167.
- Pan M. y J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture –A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pérez-Molphe-Balch E., R. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E., R. Ramírez-Malagón, H. Núñez-Palmeras y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. Pp. 9-14, 71-80.
- Pierik R. 1993. Micropropagation: Technology and Opportunities. En: Prakash J. y R. Pierik (Eds.). *Plant Biotechnology. Commercial prospects and problems. International Science Publisher. New York.* Pp 9-22.
- Poljuha D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubescic y M. Kirsnik-Rasol. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:117-123.
- Reyes J. 1997. Cultivo y propagación como plantas de ornato. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas.* CONABIO. México. p 69-77.
- Robbins C. (Ed.). 2003. Comercio Espinoso. Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. TRAFFIC Norteamérica. Fondo Mundial para la Naturaleza. Washington DC. 143 pp.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol. Conserv.* 63:163-169.

- Rubluo A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). En: Bajaj Y. P.S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation. 40: 193-205.
- Rubluo A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Hort. Sci.* 95:341-349.
- Salisbury F. B. y V. W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano. México. p. 267-270.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de Marzo de 2002, México, D. F.
- Sánchez-Mejorada H. 1982. Problemas en el control del comercio de cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 27:27-30.
- Starling R. y H. Dodds. 1983. Tissue culture propagation of cacti and others succulents. *Bradleya* 1:84-90.
- Steinhart C. R. 1962. Tissue culture of a cactus. *Science* 137(3529): 545-546.
- Stuppy W. y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88
- Strasburger E., F. Noll, H. Schenck, y A. Schimper. 1986. Tratado de Botánica. 7ª Edición. Ed. Marin. 430 pp.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3th Edition. Sinaver Associates, Inc. Massachusetts. USA. 683 p.
- Tapia-Cruz D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haworth.) Pfeiffer (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Van Staden J., y A. Harty. 1988. Cytokinins and adventitious root formation. En: Davies, T. D., B. E. Haissig y N. Sankhla (Eds.) Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press. p.185-201.

- Villarreal Q. 2001. Listados florísticos de México XXIII. Flora de Coahuila. Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. 139 pp.
- Villavicencio-Gutiérrez E., J. J. López-González, O. U. Martínez-Burciaga y A. Cano-Pineda. 2000. Micropropagación de cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción del desierto Chihuahuense. Universidad Autónoma de Chihuahua INIFAP. Pág. 44-56.
- Vyskot B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Hortic. Sci.* 59(3):449-452.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Mammillaria coahuilensis (Boed.) Moran, Gentes Herb. 8:324,1953

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

Tallo simple, pequeño, de unos 4 cm de diámetro, con una parte del tallo subterránea, con el ápice aplanado.

Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, flojamente dispuestos, con jugo lechoso, prominentes, hasta 12 mm de longitud, de sección triangular.

Axilas con algo de lana. **Aréolas** elípticas, al principio lanosas, después desnudas. **Espinas radiales**

normalmente 16, de 6 mm de longitud, las de la parte superior de la areóla más cortas, delgadas, algo suaves, de color blanco grisáceo, extendidas horizontalmente, radiales en forma de estrella. **Espina central** 1, de unos 6 cm de longitud, recta, acicular, de color



castaño, ligeramente pubescente. **Flores** campanulado-infundibuliformes, de 3 cm de diámetro; segmentos exteriores del perianto de color rosa claro, con la línea media de color café; segmentos interiores del perianto casi blancos, con la línea media de color rosa, lanceolados, agudos; estilo rosado; lóbulos del estigma 5, de color amarillo verdoso claro.

Fruto claviforme. **Semillas** de color café claro, algo rojizo, de 1 mm de diámetro, gruesamente foveoladas; hilo basal pequeño. Esta especie se distribuye en el Estado de Coahuila. Localidad tipo: San Pedro, cerca de la laguna de Viesca, donde crece junto con *Ariocarpus kotschoubeyanus* var. *macdowellii* y *Coryphantha borwigii*.

ANEXO 2

MEDIO DE CULTIVO MS (Murashige y Skoog, 1962)

Macronutrientes

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	220

Micronutrientes

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
KI	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
(MnSO ₄ .H ₂ O)	16.89	8.445
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	4.3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125

Sacarosa

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
3000	1500

Solución Fe-EDTA

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Na ₂ EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8

Inositol

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
100	100

Vitaminas

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.5	0.5
Tiamina-HCl (B ₁)	0.1	0.1

Glicina

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
2.0	2.0

El pH se ajusta antes de la incorporación del agar y, por lo tanto, antes de la esterilización en autoclave, en un rango de 5.7-5.8

Agar bacteriológico Bioxon ® 8 g L⁻¹