



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus*
(Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los
regenerantes por RAPDs

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

OCTAVIO GONZÁLEZ CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA

MÉXICO, D.F.

Febrero, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas, al CONACYT, DGEP y a DGAPA-PAPIIT Proyectos IN227805 y IN227805-2 por las becas otorgadas para realizar este estudio.

Agradezco a los integrantes del Comité Tutorial y del Jurado por su disposición y valiosas aportaciones en la revisión de este estudio y durante toda la maestría.

Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Instituto de Ecología, UNAM

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, Instituto de Biología, UNAM

Dr. Mario Rocha Sosa, Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Salvador Arias Montes, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

Agradecimientos

Al Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, al Lab. de Biología Molecular del IB-UNAM y al Lab. de Dinámica de Poblaciones y Evolución de Historias de Vida, Instituto de Ecología, UNAM por facilitarme el uso de las instalaciones durante el desarrollo de este estudio.

A la Dra. Rocío Cruz por sus consejos, asesoría y valiosas aportaciones durante todo el desarrollo de mi maestría.

Al Biól. Jerónimo Reyes por la donación de las plantas para este estudio.

Al Dr. Martín Mata y al Dr. Alejandro Martínez por su valiosa ayuda en los análisis estadísticos.

Al Dr. Robert Bye por su valiosa contribución en la revisión del escrito.

Al Dr. Abraham Rubluo (†) por permitirme iniciado en el conocimiento del cultivo *in vitro* y por su apoyo en mi formación profesional.

A los Bióls. Bárbara Estrada y Gabriel Olalde y a la Dra. Estela Sandoval por animarme siempre y por todas sus atenciones.

A mis amigos del Lab. de CTV y del Jardín Botánico (*Claudia, Neri, Miguel, Vicente, Isabel, Lupita, Ingrid, Marco, Dalia, Sergio, Joaquín, Jesús, Rosa, Julio, Luis, Javier, Paulina, Horacio, Isaac, Fernando, Allan*) por brindarme su amistad y apoyo durante todo este tiempo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer académica y personalmente, realmente ha sido mi segunda casa.

Dedicatoria:

Muy especialmente y con gran respeto y admiración al Dr. Víctor Chávez por su valiosa asesoría y por la paciencia, amistad y apoyo incondicional que me ha brindado siempre.

Gracias por todo Doctor.

Dedicatoria:

A Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones, sin Él no estaría aquí hoy.

A mis padres Emilio González y Silvia Caballero, porque siempre creyeron en mí soy afortunado por contar siempre con su amor y comprensión. Esta tesis es suya.

A mi hermana Lorena por todo su apoyo y por ser un ejemplo para mí. Además de mi hermana eres mi mejor amiga.

A mis abuelitos Gregorio (†) y Virginia, por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante. Sé que sus oraciones fueron escuchadas.

A mis tíos y primos por su amor, cariño, por sus consejos y enseñanzas, por ser la familia más unida del mundo.

A Nashelly, por ser una amiga increíble con quien compartí muchos momentos que siempre llevaré en el corazón.

A ti Wendy Rocío por tu apoyo, comprensión y amor que me permite sentir que puedo lograr lo que me proponga. Gracias por escucharme y por tus consejos. Gracias por ser parte de mi vida; eres lo mejor que me ha pasado.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	3
INTRODUCCIÓN	4
A. Antecedentes	
1. Biodiversidad	7
2. Generalidades de la Familia Cactaceae	9
2a. Importancia de las cactáceas	11
2b. Conservación	12
2c. Características y descripción botánica del género <i>Turbinicarpus</i>	17
2d. Clasificación taxonómica	18
2e. Distribución	19
2f. Situación actual del género <i>Turbinicarpus</i> y de <i>T.</i> <i>pseudopectinatus</i>	20
3. Métodos convencionales de propagación de cactáceas	24
3a. Cultivo de Tejidos Vegetales	25
3b. Cultivo de Tejidos en la Familia Cactaceae	26
3c. Reguladores de crecimiento empleados en el cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas	28
3d. Cultivo de Tejidos en el género <i>Turbinicarpus</i>	29
4. Variación somaclonal en el Cultivo de Tejidos Vegetales	29
5. Detección de polimorfismos de DNA	31
5a. Marcadores moleculares	33
5b. Técnicas basadas en hibridación	34
5c. Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa	35
5d. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico	36
6. Marcadores moleculares aplicados al Cultivo de Tejidos Vegetales	38
6a. Fidelidad genética de los regenerantes	39

B. Justificación	42
C. Objetivos	43
Objetivo general	
Objetivos particulares	
MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. Propagación <i>in vitro</i>	
1a. Material vegetal	44
1b. Cultivo de ápices y bases de tallos	44
1c. Cultivo de bases de tallos	45
1d. Individualización de brotes	46
1e. Aclimatización	46
1f. Análisis estadístico	46
2. Evaluación de la variación genética	
2a. Selección de regenerantes y primers para los RAPDs	47
2b. Aislamiento de DNA	47
2c. Determinación de la concentración de DNA	48
2d. Evaluación de la integridad del DNA	49
2e. Amplificación del DNA	49
2f. Separación e identificación de los productos amplificados	51
2g. Análisis de los geles	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
1. Propagación <i>in vitro</i>	
1a. Cultivo de ápices y bases de tallos. Crecimiento de callo	52
2b. Cultivo de bases de tallos. Crecimiento de callo	55
3c. Cultivo de ápices y bases de tallos. Organogénesis	58
4d. Cultivo de bases de tallos. Organogénesis	62
5e. Individualización de brotes	70
6f. Aclimatización	72

2. Evaluación de la variación genética	
2a. Aislamiento y determinación de la concentración de DNA	74
2b. Evaluación de la integridad del DNA	75
3c. Amplificación de DNA	76
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	91
APÉNDICES	103

Resumen

Turbinicarpus pseudopectinatus es una cactácea endémica de México que se distribuye en Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí, su estatus de conservación es “sujeta a protección especial” según la NOM-059-ECOL-2001 y como vulnerable según la UICN, debido principalmente a la destrucción de su hábitat y la colecta ilegal. El Cultivo de Tejidos se ha empleado con éxito en la propagación de especies de interés ornamental, agrícola, medicinal, entre otras, por lo que resulta una alternativa viable para regenerar especies que se encuentran en peligro de extinción. Sin embargo, las condiciones particulares de cultivo pueden generar desviaciones del genotipo original, por lo que realizar un análisis de su genotipo sería muy importante para conocer y constatar el genotipo que se está multiplicando y tratando de conservar. En este estudio se integró el desarrollo de un procedimiento de propagación *in vitro*, así como la determinación de la variación genética de los regenerantes obtenidos. A partir de cultivos *in vitro* los brotes de 0.5-1.0 cm de altura fueron disectados transversalmente en ápices y bases de tallos y se sembraron en medio de inducción MS con combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento ANA/BA y 2,4-D/K. Se seleccionaron 6 primers que sirvieron para evaluar la variación genética en los tratamientos, control y los de mayor potencial de regeneración además de 6 plantas adultas silvestres madre de los cultivos. Hubo diferencias en el potencial de regeneración en cuanto al tipo de explante inicial empleado, ya que fueron los explantes basales de tallo los que generaron mayor cantidad de brotes que los ápices después de 4 meses de cultivo. Los tratamientos en los que se obtuvo mayor número de brotes fueron ANA/BAP (0.5/2.0 y 0/3.0 mg/l) con 262 y 207 respectivamente y 2,4-D/K (0/2.0 mg/l) con 193 brotes después de 7 meses de cultivo. Se encontró variación genética en las plantas regeneradas de los diferentes tratamientos, sin embargo ésta se le atribuye a la variabilidad genética del explante inicial (semillas) a partir del cual se iniciaron los cultivos *in vitro*, por tanto se considera que la variación en los cultivos no fue debida al proceso de regeneración. Las plantas fueron establecidas en invernadero, con una sobrevivencia del 60%. El conocimiento derivado del presente estudio tiene implicaciones directas en la conservación y en el aprovechamiento sustentable de *T. pseudopectinatus* y de otras especies en riesgo de extinción.

Abstract

Turbinicarpus pseudopectinatus is a cactus endemic to Mexico, distributed in the states of Nuevo León, Tamaulipas and San Luis Potosí. Because of the destruction of its habitat and illegal gathering, its status in the Mexican NOM-059-ECOL-2001 is “under special protection” and in the IUCN Red List is “vulnerable”. Plant Tissue Culture has been used successfully to propagate species with ornamental, agricultural and medicinal – among other – values; hence, it is a viable alternative to regenerate endangered species. Nevertheless, *in vitro* culture conditions can cause deviations in the original genotype; therefore, it is very important to document the plant’s genotype and verify the genotype of the subsequently multiplied plants to be used in conservation. This research integrated the development of an *in vitro* propagation procedure, as well as the determination of the genetic variability of the resulting regenerants.

Buds, 0.5-1.0 cm high, obtained from *in vitro* culture, were transversally dissected into stem apices and bases, and sown in MS induction-media with combinations and concentrations of NAA/BA and 2,4-D/K growth regulators. Six (out of 20) primers were selected and used to evaluate genetic variability in: a) the treatments with the highest regeneration, b) the controls, and c) six wild mother plants.

Differences in regeneration potential depended upon the initial explant used; after 4 months under culture, the basal stem explants regenerated more shoots than those from the apex. After 7 months, the treatments with the greatest number of shoots were NAA/BA (0.5/2.0 and 0/3.0 mg/l), with 262 and 207, respectively, and 2,4-D/K (0/2.0 mg/l) with 193 shoots. Genetic variation was found in plants regenerated under different treatments; nevertheless, this variation can be attributed to the genetic variability of the initial explant source (seeds) from which the *in vitro* cultures were obtained. We consider, therefore, that variation under *in vitro* culture was not caused by the regeneration process, but as a consequence of open pollination. The plants were established in soil achieved a 60% survival rate. Knowledge derived from this research has direct implications for the conservation and sustainable use of *T. pseudopectinatus* and other endangered species.

INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad se ha convertido en uno de los mayores problemas que enfrenta la humanidad actualmente, su solución no solo es de crucial importancia para la existencia de miles de organismos con los que compartimos el planeta sino para la supervivencia de nuestra especie.

El término biodiversidad se refiere al rango de variación o diferencias exhibidas por los organismos y su ambiente. La biodiversidad es esencial para la adaptación a ambientes específicos y para la continua evolución de las especies. Cuanto mayor sea la diversidad vegetal en el mundo, más seres vivos se pueden valer de ella, de ahí que de la conservación de las floras regionales y de cada país dependa la supervivencia de todas las formas de vida animal, incluyendo la especie humana (Neyra y Durand, 1998).

México ostenta el privilegio de poseer un universo vegetal de excepcional diversificación. Aunque la cuantía del acervo florístico de muchas partes de la Tierra no se conoce aún con precisión, se ha reconocido que México con alrededor de 30,000 especies de plantas está entre los primeros lugares en el mundo en cuanto a riqueza se refiere y al aporte a nivel global de los beneficios ecológicos que representa (Rzedowski, 1992).

Se estima que la población humana mundial alcanzará 8 billones para el año 2020, y por lo tanto, para enfrentar la necesidad de más alimentos será necesario un mejor uso de una amplia gama de plantas, las cuales representan recursos genéticos vegetales, medicinales, industriales, estabilizadores del clima y generadores vitales del oxígeno que respiramos.

Los recursos genéticos vegetales incluyen la diversidad del material genético contenido en las variedades vegetales tradicionales así como en los cultivos modernos y en las especies silvestres (Rao, 2004).

Sin embargo, los recursos genéticos vegetales silvestres y cultivados están desapareciendo a tasas sin precedentes y las causas de esto son, entre otros

factores la deforestación, la urbanización, pero también la globalización y las políticas económicas que se aplican actualmente.

Esta pérdida de diversidad de flora demanda pronta acción internacional y por esto se han implementado bancos de germoplasma en los que el principal objetivo es coleccionar y mantener la diversidad genética para asegurar su continua disponibilidad.

El concepto de conservación de germoplasma exige que los métodos de colecta inicialmente capturen la máxima variación y subsecuentemente, las técnicas de conservación y propagación minimicen las pérdidas a través del tiempo (Rao, 2004).

Los avances en el área de la biotecnología, especialmente en el área de cultivo *in vitro* y biología molecular proveen herramientas para mejorar la conservación y manejo de los recursos genéticos (Rao, 2004).

Enmarcada en la diversidad florística de México, la Familia Cactaceae destaca por su amplia representatividad a nivel genérico y específico. Su mayor significancia se alcanza en las regiones áridas y semiáridas, ampliamente representadas en México. Sin embargo, las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal, principalmente por la destrucción de sus hábitats naturales y la colecta ilegal, por tanto, la familia completa se encuentra en el Apéndice II de CITES (Hernández y Godínez, 1994; Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005).

La mayoría de las especies de la Familia Cactaceae poseen una combinación de características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen más vulnerables a factores de perturbación, y esto, aunado a la sobrecolecta de las poblaciones silvestres, las ponen en una situación extremadamente vulnerable por lo que son requeridas estrategias que permitan la propagación de plantas suficientes y en corto tiempo para su conservación, reforestación y para el abasto a distintos mercados. Hoy la realidad es que la aplicación de métodos tradicionales de propagación por semillas y por vía vegetativa resulta ineficiente para la propagación masiva de cactáceas que logre cubrir las demandas.

A nivel mundial, las técnicas de Cultivos de Tejidos Vegetales han permitido propagar con mucho éxito especies agrícolas (*Capsicum annuum* Vlz., *Solanum tuberosum* L., *Carica papaya* L., *Vitis vinifera* L., *Crassula argentea* Thung., *Zea*

mays L., *Daucus carota* L., entre otras); debido a los resultados obtenidos con estas especies y en otros grupos vegetales, el Cultivo de Tejidos Vegetales ofrece una rápida e importante ayuda para la propagación del material vegetal, resultando en la producción de un gran número de individuos en un periodo corto de tiempo con un mínimo de impacto para las poblaciones naturales amenazadas, por lo que se plantea como una alternativa viable para la conservación de especies y su rescate del riesgo de extinción (Rubluo, 1990). Sin embargo, las condiciones del cultivo pueden involucrar importantes riesgos para los objetivos de conservación. En algunos casos las condiciones particulares de cultivo pueden generar cambios del genotipo original, por tanto, es necesario evaluar la variación genética del material que ha sido propagado *in vitro*.

En los últimos años se ha incrementado el uso de marcadores moleculares como una herramienta más en la caracterización de los individuos. Los marcadores moleculares considerados como un carácter adicional en los diferentes estudios sobre variabilidad genética no están influenciados por el ambiente, y proporcionan un número ilimitado de caracteres moleculares que pueden ser de gran valor en la diferenciación de especies.

Turbinicarpus pseudopectinatus es una especie mexicana de gran importancia ecológica, ornamental y económica que se encuentra bajo protección especial (NOM-059-ECOI-2001), y que no se cultiva, por lo que el objetivo del presente estudio fue lograr su regeneración *in vitro*, establecer bases para su propagación, así como determinar la variación genética entre los regenerantes y en relación a plantas madre de los cultivos para de esta manera integrar acciones de conservación y plantear su aprovechamiento sustentable.

A. ANTECEDENTES

1. Biodiversidad

Biodiversidad es la riqueza, la variedad de organismos que existen, enormes constelaciones de plantas, animales y microorganismos sostenidos como entes vivientes por una cantidad de información genética aún mayor, y acomodados en forma compleja en los biomas o ecosistemas que caracterizan al planeta, pero también implica la distribución de los organismos, en muchos casos de sus interacciones, de su conservación, su uso y de su estudio (Dirzo, 1990).

La biodiversidad contribuye a la regulación del equilibrio ecológico del planeta y nos proporciona múltiples componentes ambientales, como la regulación del clima, la formación y conservación de suelos, la captación del agua, la generación de oxígeno, la mitigación y la absorción de gases, la fijación y regulación de ciclos biogeoquímicos, además de que genera distintos tipos de energía, entre otros. La biodiversidad es esencial para la adaptación a ambientes específicos y para la continua evolución de las especies. Cuanto mayor sea la diversidad vegetal en el mundo, más seres vivos se pueden valer de ella (Neyra y Durand, 1998).

Sin embargo, el estudio de la biodiversidad ha revelado que las actividades humanas ejercen una marcada influencia en la disminución del número de especies, en el tamaño y la variabilidad genética de las poblaciones silvestres y en la pérdida irreversible de hábitats y ecosistemas. Así, mientras muchas especies disminuyen en abundancia y distribución, otras incrementan su población de forma explosiva hasta constituirse, en algunos casos, en plagas (Peña *et al.*, 1998).

Esta situación mundial es parte de lo que se ha denominado la *crisis de la biodiversidad* (Dirzo, 1990). La manera más simple de percibir la crisis de la biodiversidad es mediante la reducción del tamaño de las poblaciones silvestres ocasionada por: (1) sobreexplotación por parte del hombre, incluyendo actividades legales (como la pesca) e ilegales (como el tráfico de especies amenazadas); (2) destrucción de hábitats causada por diversas actividades productivas, que incluyen principalmente la deforestación; (3) los efectos negativos de las

interacciones con enemigos naturales introducidos o favorecidos por las actividades humanas (como depredadores, patógenos y competidores); (4) la influencia de compuestos químicos y tecnologías utilizadas en la fertilización de suelos, fumigación de cultivos y la construcción de grandes obras de ingeniería (contaminación); (5) por catástrofes naturales tales como incendios, erupciones, inundaciones y terremotos (Ehrlich y Ehrlich, 1992; WCMC, 1992).

De acuerdo con la categoría de países megadiversos, México ocupa uno de los primeros cinco lugares con mayor biodiversidad en el mundo por su alto grado de riqueza, entre 10 y 12 % de las especies del planeta se encuentran en nuestro país y, en particular, por su alto índice de endemismos (63 % de la flora y 30 % de los vertebrados). Además, es el centro de origen de muchas especies. A ello han contribuido lo accidentado de su fisiografía, la numerosa variedad de tipos de suelos, los amplios litorales, los altiplanos, cuencas fluviales, etc., además su posición geográfica entre el norte y el sur del continente ha permitido la entrada y diferenciación de especies del Norte y del Sur, en ambos sentidos (Semarnat, 2003; Neyra y Durand, 1998).

Dentro de la enorme diversidad florística de México, existe una familia que destaca por su amplia representatividad a nivel genérico y específico, la Familia Cactaceae, que ocupa el quinto lugar en diversidad en el ámbito nacional (Tabla 1) además de tener una importancia cultural trascendente para nuestro país (Arias, 1993; Rzedowski, 1983).

Tabla 1. Familias mejor representadas en la flora fanerogámica de México
(Rzedowski, 1998)

Familia	No. de géneros	No. de especies
Compositae	314	2400
Leguminosae	130	1800
Gramineae	170	950
Orchidaceae	140	920
Cactaceae	60	600
Rubiaceae	80	510

2. Generalidades de la Familia Cactaceae

La región norte de Sudamérica es considerada como la posible zona de origen de la Familia Cactaceae, Axelrod (1950, 1958 citado por Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995) mencionó que los desiertos son considerados geológicamente recientes, así, las cactáceas que en ellos se han diferenciado son igualmente recientes, pero las de la subfamilia Pereskioideae, son probablemente las más antiguas, tal hipótesis toma en cuenta la tectónica de placas y el lugar donde se encuentra el género más primitivo de la familia (*Pereskia*) (Arias, 1993), sin embargo no se conoce en qué época se originaron las cactáceas puesto que hasta la fecha no se han encontrado fósiles (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

La Familia Cactaceae es endémica de América y se distribuye a lo largo del continente americano, desde Columbia Británica y Alberta, Canadá, hasta Patagonia, cerca del extremo sur de Sudamérica, además de las Islas Galápagos y las Antillas (Arias, 1993; Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2004).

Apoyándose en el sistema de clasificación genérica se estima en forma conservadora que la Familia Cactaceae incluye cerca de 110 géneros y 2000 especies. Un recuento del número de géneros y especies conocido para 9 países americanos revela que a nivel genérico son México, Perú, Bolivia, Brasil y Argentina donde se encuentran el mayor número de taxa y a nivel específico: México, Bolivia, Brasil, Argentina y Perú son los más importantes (Arias, 1993).

En el caso de México encontramos un total de 48 géneros y 563 especies y del total de géneros y especies, 18 (35%) y 715 (84%) respectivamente, están estrictamente restringidos a sus límites territoriales y 20 géneros más son casi endémicos, es decir, que una o varias de las especies de un género determinado extienden su distribución a áreas adyacentes al territorio mexicano, especialmente en el suroeste de Estados Unidos, como ejemplo *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Echinocactus*, *Carnegiea*, entre otros. (Tabla 2) (Arias, 1993; Hernández y Godínez, 1994).

Tabla 2. Algunos géneros de cactáceas en México (Hernández y Godínez, 1994; Anderson, 2001)

Género	Endémico	Casi endémico	No. total de especies	No. de spp. en México	No. spp. endémicas
<i>Aporocactus</i>	X		2	2	2
<i>Ariocarpus</i>		X	7	7	6
<i>Astrophytum</i>		X	4	4	3
<i>Aztekium</i>	X		2	2	2
<i>Cephalocereus</i>	X		3	3	3
<i>Coryphantha</i>		X	41	39	34
<i>Echinocereus</i>		X	49	48	29
<i>Ferocactus</i>		X	24	24	19
<i>Geohintonia</i>	X		1	1	1
<i>Leuchtenbergia</i>	X		1	1	1
<i>Mammillaria</i>		X	166	160	150
<i>Neobuxbaumia</i>	X		8	8	8
<i>Obregonia</i>	X		1	1	1
<i>Pelecyphora</i>	X		2	2	2
<i>Turbinicarpus</i>	X		24	24	24

Esto lleva a reconocer en forma más o menos amplia dos grandes centros de diversidad florística, uno en Norteamérica particularmente en México y otro en Sudamérica, involucrando a Bolivia, Brasil, Argentina y Perú. Dada la enorme riqueza de especies en nuestro país, las cactáceas han tenido una gran importancia desde épocas prehispánicas hasta nuestros días.

2a. Importancia de las cactáceas

Las cactáceas han representado un símbolo para nuestro país, desde antes de la Conquista, las cactáceas no pasaron desapercibidas para las civilizaciones como los mexicas, ya que fueron usadas ampliamente en su vida cotidiana como alimento, medicina, economía doméstica y prácticas religiosas y políticas, y que aún actualmente siguen siendo empleadas por distintos grupos étnicos en ceremonias religiosas; además de que se utilizan para la obtención de una gran cantidad de productos químicos, fibras, bebidas, y como plantas de ornato (Tabla 3) (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

Tabla 3. Diferentes usos de algunos géneros de cactáceas (Casas, 2002)

Género	Parte empleada	Usos	Manejo
<i>Acanthocereus</i>	tallos jóvenes	alimenticio, forraje	s
<i>Opuntia</i>	tallos jóvenes, flores, frutos y semillas	alimento, forraje, cercas vivas, leña, medicina, ornamental, abono verde, colorantes, adhesivos	c, m
<i>Nopalea</i>	tallos jóvenes, flores	alimenticio, ornamental	s, m
<i>Myrtillocactus</i>	tallos, flores, frutos	alimento, forraje, bebida alcohólica, cercas vivas, ornamental	s, m
<i>Mammillaria</i>	frutos, tallos	alimenticio, ornamental	s
<i>Cephalocereus</i>	frutos, tallo	alimento, forraje, construcción, ornamental	s
<i>Ferocactus</i>	tallos, frutos, espinas	alimento, espinas usadas para recoger frutos de los árboles	s
<i>Pachycereus</i>	frutos, semillas, tallos,	alimento, forraje, bebida alcohólica, construcción, cercas vivas, medicina	s, m, c
<i>Stenocereus</i>	tallos, frutos, semillas	Alimento, forraje, cercas vivas, leña	s, m, c
<i>Echinocactus</i>	tallos	alimento, ornamental	s

Estatus cultural: s= silvestre recolectada; m= manejada *in situ*; c= cultivada

Así mismo las cactáceas tienen grandes implicaciones ecológicas debido a que brindan oxígeno, como fijadoras de suelo son un excelente medio para evitar la erosión eólica y pluvial gracias a que tienen un sistema radical muy desarrollado que compacta el sustrato, además de que los pelos radicales son caducos y constituyen una fuente importante de materia orgánica que constantemente se incorpora al suelo. Además, las diferentes especies de cactáceas les proporcionan alimento y resguardo a múltiples organismos asociados (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

2b. Conservación

No obstante la importancia económica, ecológica y cultural de las cactáceas, y que México sea uno de los centros de concentración más importantes, en términos absolutos, nuestro país es el lugar con más especies amenazadas (197 especies) las cuales representan 35 % del total de las especies mexicanas (Tabla 4) (Fig. 1) (Hernández y Godínez, 1994).

Por tanto la familia completa se encuentra en el Apéndice II de CITES y específicamente 40 especies de la región del Desierto Chihuahuense aparecen en el Apéndice I (el más restrictivo). Un total de 285 de cactáceas mexicanas están incluidas en la lista oficial de especies amenazadas (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005; Semarnat, 2002) y muchas especies de cactáceas están siendo reevaluadas por la UICN para una posible inclusión en las Categorías de la nueva Lista Roja.

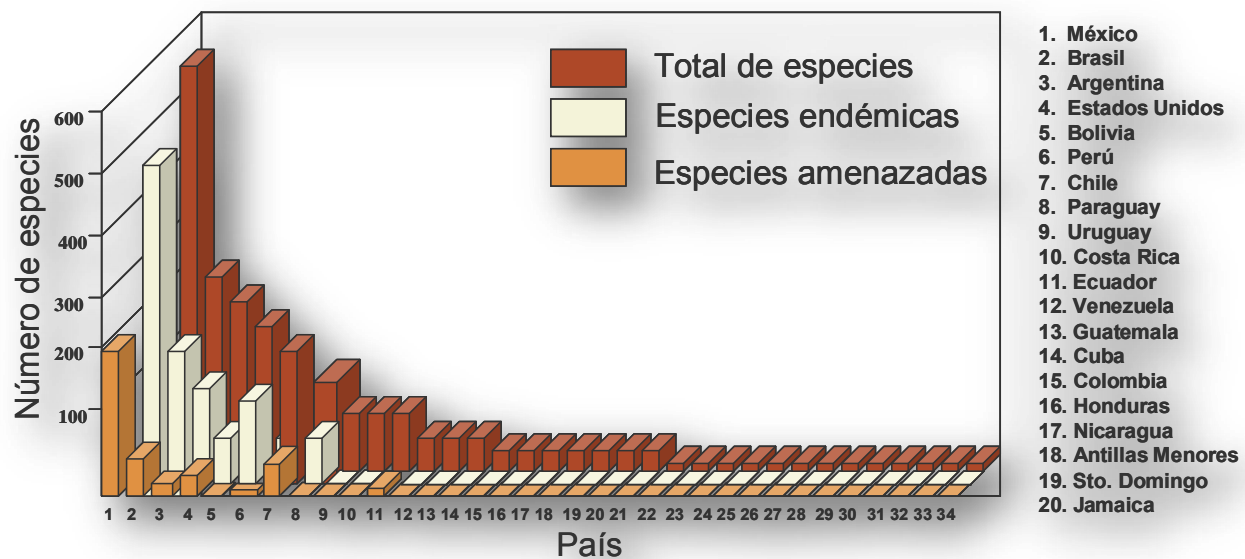


Fig. 1. Abundancia de especies de cactáceas, número de especies endémicas y número de especies amenazadas en algunos países de América (tomado de Hernández y Godínez, 1994).

El Desierto Chihuahuense, es una región de gran importancia como zona de conservación pues en sus hábitats restringidos y muy específicos se encuentran reportados 329 especies que representan 59.8% de todas las cactáceas en México, no obstante que esta región sólo representa el 25% del territorio nacional; entre algunos de los géneros que se localizan en el Desierto Chihuahuense están: *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Epithelantha*, *Geohintonia*, *Leuchtenbergia*, *Lophophora*, *Obregonia*, *Pelecycphora*, *Strombocactus* y *Turbinicarpus*, caracterizados por su endemismo y su lento crecimiento como sucede con *Echinocactus grusonii*, *Ferocactus latispinus*, *Obregonia denegrii*, *Ariocarpus agavoides* y *Aztekium ritteri*. Esta última especie, Barthlott (1979) la señaló como la especie más lenta en su crecimiento en toda la familia ya que después de germinar, las plántulas de 4 años de edad apenas alcanzan 5 mm de longitud o incluso menos en su hábitat (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1978).

Tabla 4. Distribución del número total de especies, especies endémicas y amenazadas de algunos países del Continente Americano (Hernández y Godínez, 1994)

País	No de spp.	% endémicas	% amenazadas
Canadá	4	0	0
Estados Unidos	143	28.0	13.3
México	563	77.9	35
Guatemala	30	13.3	6.7
Honduras	19	0	10.5
Costa Rica	32	37.5	6.3
Cuba	25	24	24
Puerto Rico	13	7.7	7.7
Brasil	198	73.2	20.2
Paraguay	48	16.7	0
Colombia	22	4.5	0
Venezuela	31	16.1	0
Ecuador	31	35.4	29
Perú	84	54.8	10.7
Bolivia	122	50.8	0.8
Argentina	161	53.4	5
Chile	55	74.5	67.3

Entre las causas principales de la reducción continua de las poblaciones silvestres de cactáceas están la modificación de su hábitat que incluye la agricultura, la ganadería (caprino y bovino), los asentamientos humanos, el desarrollo industrial, la construcción de caminos y carreteras, los tendidos de líneas eléctricas y telefónicas, la extracción de materiales de construcción y la construcción de presas (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005; Sotomayor *et al.*, 2004).

La recomendación general es proteger los hábitats naturales y conservar *in situ* la vida silvestre. La CONABIO, a través de su Sistema de Información Geográfica, ha calculado que son poco más de ocho mil hectáreas las protegidas por la Federación, lo que representa apenas 4.32% del territorio nacional. De acuerdo con un análisis realizado con la información existente en las bases de datos de la CONABIO, se ha determinado que los estados con mayor superficie protegida por la Federación son: Baja California, Baja California Sur, Chiapas y Campeche. De los diez estados más importantes en cuanto a biodiversidad en el país, cuatro (Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Guerrero) representan sólo 8% del total protegido en el país (Peña *et al.*, 1998).

No obstante que la mayor significancia de las cactáceas se alcanza en las regiones áridas y semiáridas, donde constituyen en varias de ellas elementos dominantes de la vegetación, muchas de estas regiones aún no se encuentran protegidas por la Federación, como es el caso del estado de Oaxaca, que es el estado con mayor diversidad de flora en el país (Flores y Geréz, 1995) y tan sólo tiene los parques nacionales: Lagunas de Chacahua y Benito Juárez, los cuales cubren una superficie cercana a 170 km², o 0.2% de la extensión del estado. Lo mismo sucede en el caso de Guerrero, que aunque es el cuarto estado con mayor diversidad, tiene decretados en su territorio sólo dos parques nacionales, mientras que los estados que no cuentan con superficie protegida por la Federación son: Guanajuato, Tamaulipas y Zacatecas (Flores y Geréz, 1995).

Otro factor importante que afecta a las poblaciones silvestres es la colecta ilegal de ejemplares para el comercio nacional e internacional (Reyes y Terrazas, 1991). El mercado internacional se ha abastecido en gran parte por medio de la extracción de ejemplares de su hábitat natural, variando sus costos según la rareza de la especie y el éxito de su propagación (Arias, 1993).

Como un indicador de lo antes mencionado, se ha estimado que en el periodo de 1977-1984 se exportaron a los Estados Unidos de América cerca de 289 mil ejemplares de cactáceas en forma ilegal incluyendo a las especies colocadas en el Apéndice I de CITES (Arias, 1993).

Finalmente, se estima que más de 50,000 ejemplares de cactáceas son exportadas cada año de nuestro país y menos del 1% son reportadas como propagadas, es decir, prácticamente todas son extraídas de manera ilegal de las poblaciones silvestres (Oldfield, 1997).

Así mismo, la mayoría de las especies de la Familia Cactaceae poseen una combinación de características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen más vulnerables a factores de perturbación. En efecto, en condiciones naturales las cactáceas generalmente tienen tasas de crecimiento muy bajas y sus ciclos de vida son frecuentemente muy largos como sucede con *Aztekium ritteri* (Gibson y Nobel, 1986). Por otra parte, el reclutamiento de nuevos individuos en las poblaciones es por lo general muy escaso, por ejemplo Jordan y Nobel (1981) indicaron que para *Ferocactus acanthodes*, en un periodo de 18 años sólo hubo nuevas plantas en 8 años y el total de individuos reclutados fue de 30, en una hectárea de terreno.

Además, otro atributo de muchas cactáceas es que sus áreas de distribución son extremadamente restringidas y en ocasiones viven en condiciones edáficas muy específicas (Hernández y Godínez, 1994). Aunado a esto, las bajas tasas de crecimiento de muchas de ellas, así como sus reducidos niveles de reclutamiento, determinan por lo común que las poblaciones se restablezcan demográficamente de manera extremadamente lenta después de un episodio de perturbación; además de que sus patrones particulares de distribución geográfica representan un enorme riesgo de supervivencia a cualquier forma de perturbación local (Hernández y Godínez, 1994).

Un género representativo de nuestro país es *Turbiniacarpus*, donde *T. pseudopectinatus* es una especie endémica de gran importancia ecológica que se encuentra bajo protección especial bajo la Norma Oficial Mexicana (059-ECOL-2001).

3c. Características y descripción botánica del género *Turbinicarpus*

El género es endémico de México e incluye 24 especies y varias subespecies, se distribuye en la parte sur del Desierto Chihuahuense, de acuerdo con la delimitación hecha por Henrickson y Straw (1976) para este desierto, que incluye el Altiplano y parte de la Zona Media Potosinos (Anderson, 2001).

Algunas especies se encuentran fuera de los límites del Desierto Chihuahuense, en Río Verde y al norte de Las Tablas en San Luis Potosí, en el Valle Jaumave en Tamaulipas, en el área de Aramberri en Nuevo León y en algunas zonas áridas de los estados de Hidalgo y Querétaro y en una pequeña área del Estado de Guanajuato (Sotomayor *et al.*, 2004).

El nombre del género *Turbinicarpus* proviene del latín **Turbo**, **turbinis** que significa trompo y del griego **Karpós** que significa fruto.

Este género contiene plantas pequeñas, mas o menos globosas, tuberculadas o muy raramente con costillas tuberculadas con espinas escasas, muy afiladas. Flores blancas o ligeramente rosadas, producidas por areolas superiores, estambres numerosos, ovario glabro, desnudo o rara vez con la presencia de pequeñas escamas en la parte superior. Fruto con la forma de una baya, con dehiscencia irregular; las semillas varían de 1 a 1.6 mm de longitud dependiendo de la especie, son de color negro sin arilo y con una testa rugosa (Sotomayor *et al.*, 2004).

Una característica importante es la presencia de diversos alcaloides que aunque se han encontrado en otros géneros de cactáceas son novedosos en el género *Turbinicarpus*, lo cual representa un valor potencial para determinar los perfiles de alcaloides útiles en la taxonomía de *Turbinicarpus* a nivel infragenérico (Starha *et al.*, 1999).

***Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R. A. Foster**

Son plantas que presentan un tallo solitario de 25 a 45 mm de diámetro, subgloboso que se encuentra parcialmente enterrado en el suelo, pero que algunas veces alcanza 60 mm de altura, el ápice está hundido.

Las costillas están completamente divididas en tubérculos arreglados en espirales de 13-21 y 21-34, de color verde glauco y con forma de hacha, comprimidas lateralmente de 3 a 4 mm de altura. Las areolas son lineares, de 3.5 a 4 mm de largo con 44 a 56 espinas de color blanco arregladas en dos filas una a cada lado de la areola elongada, pectinadas y adpresas (Fig. 2a).

Las flores presentan un diámetro de 30 mm y de 20 a 24 mm de largo, emergen de un surco muy corto con lana blanca en el borde superior de la areola, los segmentos interiores presentan una franja central de color rosa pálido o rojizo (Fig. 2b). El estilo es de color amarillo pálido con un estigma con 6 o 7 lóbulos. Se desconoce la edad en la que la planta florece por primera vez.

El periodo de floración es de enero a febrero. El fruto es de color verde olivo con matices rojos y mide entre 8 y 10 mm de largo. Las semillas son de color negro y miden 1.6 mm de longitud y 1.2 mm de diámetro (Sotomayor *et al.*, 2004).

3d. Clasificación taxonómica (Sotomayor *et al.*, 2004).

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
SUBDIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
GÉNERO	<i>Turbincarpus</i> Buxbaum & Backeberg
ESPECIE	<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i> (Backeb.) Glass & R. A. Foster



Fig. 2. *Turbinicarpus pseudopectinatus*; a) Tallo, espinas pectinadas adpresas; b) Planta en floración

3e. Distribución

Turbinicarpus pseudopectinatus se distribuye de norte a sur desde el Municipio de Galeana en el Estado de Nuevo León hasta unos pocos kilómetros cerca del Municipio de Cerritos en San Luis Potosí.

Hacia el Este se le localiza en Jaumave (Palmillas, Miquihuana y Bustamante) en el Estado de Tamaulipas.

Las localidades intermedias son Santa Rita del Rucio (San Luis Potosí), Mier, Noriega y Dr. Arroyo hasta La Escondida en Nuevo León (Sotomayor *et al.*, 2004).



3f. Situación actual del género *Turbinicarpus* y de *T. pseudopectinatus*

Las especies del género *Turbinicarpus* son muy populares entre los coleccionistas debido a su alto valor ornamental y pequeño tamaño, lo que los hace relativamente fáciles de mantener y que por tanto el comercio involucra la colección de plantas nativas en un 80%. Desafortunadamente el deseo de poseer estas plantas ha resultado en la depredación de muchas poblaciones mediante colecta ilegal por lo que el género completo está incluido en el Apéndice I de CITES (Anderson, 2001).

Incluso en Internet se pueden encontrar anunciadas para venta, semillas y plantas de muchas especies de cactáceas incluidas las del género *Turbinicarpus* (Tablas 5 y 6), además Bárcenas (2003) señala que de acuerdo con los estudios de mercado nacional en 13 estados de la República Mexicana, el 53% de las especies comercializadas corresponden a los géneros *Mammillaria*, *Ferocactus* y *Turbinicarpus*.

Tabla 5. Algunas especies de cactáceas que son más frecuentemente anunciadas para venta en Internet. Frecuencia = número de registros de venta encontrados en Internet

Especie	Frecuencia
<i>Ariocarpus retusus</i>	79
<i>Echinocereus triglochidiatus</i>	68
<i>Turbinicarpus schmiedickeanus</i>	63
<i>Opuntia polyacantha</i>	61
<i>Astrophytum myriostigma</i>	43
<i>Astrophytum capricorne</i>	41
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	29
<i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i>	20

Tabla 6. Algunas especies de cactáceas, por género, en los mercados y comercio internacionales (Bárceñas, 2003)

Género	Especies en el género	Especies en el comercio	MRP
<i>Ariocarpus</i>	6	6	100.0
<i>Astrophytum</i>	4	4	100.0
<i>Aztekium</i>	2	2	100.0
<i>Epithelantha</i>	2	2	100.0
<i>Leuchtenbergia</i>	1	1	100.0
<i>Lophophora</i>	2	2	100.0
<i>Obregonia</i>	1	1	100.0
<i>Pelecyphora</i>	2	2	100.0
<i>Sclerocactus</i>	20	19	95.0
<i>Escobaria</i>	25	23	92.0
<i>Turbinicarpus</i>	23	20	87.0

El MRP (market representation percentage) mide el número de especies (diversidad de especies) de los géneros ofrecidos en el mercado, un MRP del 100 por ciento representa todas las especies de un género hallado en el mercado, y un MRP de cero significa que ninguna especie de un género es ofrecido en el mercado.

Tabla 7. Valores SAI y precios de algunas cactáceas incluidas en CITES (Apéndice I) (Bárceñas, 2003)

Especie	SAI	Tamaño de la planta (cm)		Precio de la planta (US \$)		Número de semillas (por paquete)		Precio de paquetes de semillas (US \$)	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
<i>Ariocarpus agavoides</i>	0.69	5.0	8.0	2.50	111.60	5	75	0.86	2.50
<i>A. kotschoubeyanus</i>	0.71	1.0	6.0	4.00	67.50	-	500	0.86	11.00
<i>A. retusus</i>	0.63	1.51	0.2	4.00	56.00	10	500	0.95	20.00
<i>Aztekium hintonii</i>	0.26	2.0	3.0	6.00	17.50	5.50	0.70	5.50	
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	0.26	2.5	5.0	4.00	11.70	-	10	-	1.50
<i>P. strobiliformis</i>	0.34	1.3	5.0	5.50	37.20	10.75	1.40	10.00	
<i>Turbinicarpus alonsoi</i>	0.17	-	-	-	10.00	10.75	0.73	2.10	
<i>T. bonatzii</i>	0.14	-	-	-	2.50	10	75	0.73	2.10
<i>T. laui</i>	0.31	4.0	6.0	9.30	14.00	10	100	0.73	4.40
<i>T. pseudopectinatus</i>	0.49	1.0	4.0	1.50	16.30	10	500	0.73	8.00

El SAI (species availability index)= suma del número de países en los que un taxón está disponible para su venta y el número de viveros anunciando ese taxón dividido entre el número total de países y de viveros que ofrecen ese taxón (normalmente un valor entre 0 y 1)

Tabla 8. Estatus de conservación de algunas especies del género *Turbinicarpus*

Especie	Subespecie	Estatus			Distribución en México
		NOM-059-ECOL-2001	UICN (2004)	CITES (2003)	
<i>T. gielsdorffianus</i>		P	CR	I	SLP
<i>T. dickinsoniae</i>		-	NT	I	
<i>T. laui</i>		Pr	VU	I	SLP
<i>T. lophophoroides</i>		Pr	VU	I	SLP
<i>T. bonatzii</i>		-	EN	I	SLP
<i>T. pseudomacrochele</i>	<i>pseudomacrochele</i>	-	-	I	Qro., Hgo., SLP
<i>T. pseudomacrochele</i>	<i>krainzianus</i>	-	-	I	Hgo.
<i>T. jauernigii</i>		P	CR	I	SLP
<i>T. rioverdensis</i>		-	CR	I	SLP
<i>T. pseudopectinatus</i>		Pr	VU	I	Tamps., N.L., SLP

CR- en peligro crítico; P- en peligro de extinción; EN- en peligro; NT- casi amenazado; Pr-sujeta a protección especial; VU- vulnerable

El estado actual de la especie no es considerado como crítico (Tabla 8) pese a los saqueos con fines comerciales hechos durante las décadas de los sesenta y setenta según Glass (1997), ya que se encuentra distribuido en varias poblaciones de tres estados del norte de México. Se tienen reportes de que las plantas de *T. pseudopectinatus* son muy inconspicuas por lo que las plantas son colectadas principalmente cuando se encuentran en floración provocando un severo daño a las poblaciones silvestres al impedir que ocurra la fecundación de los individuos y más aún porque las plantas de *Turbinicarpus* no se auto-fecundan por lo que se ve críticamente afectada la producción de semillas. Además, Sotomayor *et al.* (2004) mencionaron que debido al tipo de vegetación asociada a las poblaciones silvestres del municipio de Cerritos, en San Luis Potosí, los individuos son propensos a ser destruidos por incendios o alterados por el sobrepastoreo (Tabla 9).

Tabla 9. Impacto y estatus de conservación de algunas especies de *Turbinicarpus* en San Luis Potosí (Sotomayor *et al.*, 2004).

Especie	Colecta ilegal	Alteración del hábitat						Estatus (UICN, 2004)
		Agricultura	Carreteras	Minas	Sobrepastoreo	Incendios	Desarrollo urbano	
<i>T. bonatzii</i>	++++	----	+++	----	si	P+++	----	NT
<i>T. gielsdorfianus</i>	++++	----	----	----	si	P++	----	CR
<i>T. laui</i>	+++	----	----	----	si	P++	----	VU
<i>T. lophophoroides</i>	++	++	+	----	si	P+	+	VU
<i>T. valdezianus</i>	+++	----	----	----	no	P+	----	VU
<i>T. pseudopectinatus</i>	++	----	----	----	si	P++	----	VU

CR- en peligro crítico; NT- casi amenazado; VU- vulnerable. (-----) no existe; (+) pequeña; (++) media; (+++) grande; (++++) severa. (P+) poca probabilidad en el futuro; (P++) media probabilidad en el futuro; (P+++) alta probabilidad en el futuro

Por lo anterior, las técnicas de propagación representan unas de las acciones más deseables para resguardar las especies amenazadas y esto puede formar parte de un programa mayor que también regule la colecta.

Se han efectuado pruebas de germinación y se ha determinado que en promedio para las diferentes especies de *Turbinicarpus* se tiene un porcentaje de germinación de alrededor del 60% lo cual resulta ser bajo en comparación con ensayos de especies como *Ferocactus recurvus* en el que se ha obtenido 99 % de germinación, *Pachycereus hollianus* con 80%, *Ferocactus latispinus var. spiralis* con 80 % y *Strombocactus disciformis* con 82% (Flores *et al.*, 2000; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Álvarez *et al.*, 2004).

Aunque en condiciones naturales no se conoce con exactitud el porcentaje de germinación de *T. pseudopectinatus* una baja tasa de germinación aunada a una baja supervivencia podrían disminuir el reclutamiento de nuevos individuos (Sotomayor *et al.*, 2004).

Sánchez-Martínez y Hernández (2002) reportaron que ocho diferentes especies de *Turbinicarpus* (no indicaron cuales especies, solo mencionaron a *T. pseudomacrochele*) han sido propagadas en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro, a partir de semillas y de esquejes, sin embargo Dávila-Figueroa *et al.* (2005) mencionan que usualmente las plantas del género *Turbinicarpus* producen muy pocos brotes laterales.

3. Métodos convencionales de propagación de cactáceas

La propagación de cactáceas puede efectuarse mediante métodos convencionales como son a partir de semillas, por vástagos (hijuelos) y por injertos.

La propagación por vástagos aprovecha los brotes que proliferan en ciertas cactáceas globosas como algunas especies de *Mammillaria*, *Epithelantha*, *Echinocereus*, entre otras; la propagación por esquejes consiste en fragmentar los tallos para después inducir su enraizamiento, sin embargo, muchas especies producen muy pocos brotes laterales, pocas semillas o presentan bajos porcentajes de germinación, por lo que la propagación por semillas o vástagos resultan poco efectivas.

Los métodos de propagación y almacenamiento *in vitro* pueden ser empleados como herramientas muy poderosas en programas de conservación *ex situ* de diferentes especies incluyendo las que se encuentran en peligro de extinción.

Durante los últimos años, el cultivo de tejidos ha emergido como una poderosa herramienta para la propagación de numerosas especies vegetales, esto en ciertos casos permite la producción masiva de individuos a partir de solo un pequeño fragmento de tejido, al aprovechar la totipotencialidad de las células vegetales, por tanto el potencial de estas técnicas en la recuperación de especies amenazadas resulta trascendente (Rubluo *et al.*, 1993).

3a. Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una rama de la Biología que basada en la totipotencialidad celular ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro*: protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, atmósfera, pH, reguladores de crecimiento, etc.), permitiendo al investigador variar las condiciones de cultivo y/o el tipo de explante y llegar a dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células, pudiendo lograr una gran variedad de objetivos, entre ellos: almacenamiento o conservación de germoplasma, nuevos métodos de hibridación y/o mejoramiento, investigación básica, propagación, erradicación o recuperación de plantas libres de patógenos, esta técnica ha sido empleada en diferentes especies vegetales con diversos usos (Tabla 10) (Chávez, 1993).

Tabla 10. Algunas especies que son propagadas por cultivo de tejidos

Especie	Usos
<i>Begonia semperflorens</i> (Begoniaceae)	ornamental
<i>Spathiphyllum sp.</i> (Araceae)	ornamental
<i>Nymphaea sp.</i> (Nymphaeaceae)	planta acuática, ornamental
<i>Pelargonium grandiflorum</i> (Geraniaceae)	ornamental
<i>Saintpaulia ionantha</i> (Gesneriaceae)	ornamental
<i>Tussilago farfara</i> (Asteraceae)	medicinal, selección de clon con alta producción de metabolitos secundarios para la industria farmacéutica
<i>Gloriosa rothschildiana</i> (Liliaceae)	metabolitos secundarios

<i>Pelecyphora strobiliformis</i> (Cactaceae)	cactácea ornamental catalogada como amenazada (NOM-059-ECOL-2001)
<i>Mammillaria guelzowiana</i> (Cactaceae)	cactácea ornamental catalogada como amenazada (NOM-059-ECOL-2001)
<i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae)	alimenticio, para la producción de plantas libres de patógenos
<i>Musa australis</i> (Musaceae)	alimenticio
<i>Prunus armeniaca</i> (Rosaceae)	alimenticio
<i>Vitis vinifera</i> (Vitaceae)	alimenticio, se han propagado diferentes variedades para la eliminación de virus y clonación de plantas élite

3b. Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Cactaceae

Debido a los trabajos publicados se puede mencionar que las cactáceas ofrecen amplias perspectivas para su cultivo *in vitro*, además de que los resultados obtenidos hasta ahora, permiten vislumbrar aplicaciones de impacto para la propagación masiva de estas plantas y su rescate del riesgo de extinción (Rubluo, 1990).

Las técnicas de cultivo de tejidos aplicadas a la reproducción de cactáceas son relativamente recientes, en 1976, Kolar y Bartek reportaron la primera regeneración de brotes de una cactácea, los cuales fueron originados a partir de callo de *Mammillaria woodsii*. En 1979, Mauseth logró brotes vía directa, sin pasar por callo, a partir de aréolas. El primer reporte sobre el desarrollo de embriones somáticos fue en 1974 por Minocha y Mehra en explantes de *Mammillaria prolifera*; después, escasos reportes han surgido sobre la formación de embriones somáticos, en *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992); *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994) y *A. kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

Estos primeros reportes sobre las investigaciones *in vitro* con cactáceas han permitido la regeneración de múltiples especies, mediante el empleo de distintos tipos de explantes (embriones, tubérculos, hipocótilo, areolas) (Tabla 11).

Tabla 11. Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

Especie	Explantante	Medio y reguladores de crecimiento	Respuesta	Estatus	Referencia
<i>Ferocactus glaucescens</i>	plántulas	MS, ANA 0.5 o 1 µM, BAP 22 µM	brotos	—	Santos-Díaz, 2005
<i>Aztekium ritteri</i>	tejido somático (tallos)	MS, ANA 0.5, 5.3 µM, BAP 0.04 µM	brotos, embriones somáticos	A Apéndice I	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992
<i>Opuntia ellisiana</i>	tejido somático (tallos)	MS, IBA 50 µM	brotos enraizados	—	Juárez y Passera, 2002
<i>Opuntia ficus-indica</i>	cotiledones hipocótilo	MS, K 0.9 µM, 2,4-D 2.3 µM, picloram 1.0 µM	callo, cultivos en suspensión	—	Llamoca-Zárata <i>et al.</i> , 1999
<i>Selenicereus megalanthus</i>	cotiledones, hipocótilos, epicótilos	TDZ 200 µM	brotos enraizados	—	Pelah <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria elongata</i>	tejido somático (tubérculos)	MS, ANA 1.07 µM, BAP 22.2 µM	brotos enraizados y aclimatizados	Apéndice II	Papafotiou <i>et al.</i> , 2001
<i>Turbincarpus laui</i>	plántulas	MS, BAP 8-13 µM, ANA 2.68 µM	brotos enraizados y aclimatizados	Pr Apéndice I	Mata <i>et al.</i> , 2001
<i>Schlumbergera y Rhipsalidopsis</i>	tejido somático (tallos)	MS, IBA 2.5 µM, BAP 3.5 µM ó BAP 4.4, TDZ 13.2 µM	brotos	—	Sriskandorajah y Serek, 2004
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	tejido somático (tubérculos)	MS, BAP 13.3 µM, ANA 5.4 µM	Embriones somáticos, brotes enraizados y aclimatizados	Pr NT Apéndice I	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	plántulas	MS, BAP 8.8 µM	brotos enraizados	Pr Apéndice I	Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	plántulas	MS, BAP 8.8 µM	brotos enraizados	Pr Apéndice	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003

A- amenazadas (NOM-059); NT- casi amenazada (UICN); Pr-sujeta a protección especial (NOM-059); Apéndice I y II (CITES)

Las cactáceas al igual que las demás angiospermas, tienen las yemas localizadas en el sitio donde la hoja se une al tallo. Estas yemas, denominadas areolas son productoras de flores y a veces de raíces y nuevos tallos. Las areolas normalmente son inactivas después de que han formado las espinas, sin embargo, pueden ser reactivadas *in vitro* para producir brotes (Mauseth, 1979; Bonnes *et al.*, 1993). Los tubérculos que contienen a las areolas son análogos a las hojas de las demás plantas con flores (Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979).

El medio de cultivo más utilizado para inducir la regeneración de las cactáceas es el desarrollado por Murashige y Skoog (1962) conocido como MS, del cual se ha comprobado que tiene el potencial para soportar todas las fases de la organogénesis en algunas cactáceas (Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979).

Aparte del medio de cultivo los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante en la propagación *in vitro* de las cactáceas.

3c. Reguladores de crecimiento empleados en el cultivo *in vitro* de cactáceas

La respuesta de los tejidos está determinada en gran medida por el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo. En cactáceas las citocininas más utilizadas para romper la latencia de las yemas axilares (areolas) son el BAP, además de la zeatina, K y el 2iP (Tabla 11) (Fay y Gratton, 1992). Se ha demostrado que las auxinas pueden ser necesarias en muy bajas concentraciones (0.1-0.5 mg/l) o bien, la proliferación de brotes puede proceder en su ausencia (Clayton *et al.*, 1990). Las auxinas más utilizadas son el AIA y el ANA con el fin de inducir la formación de raíces adventicias en brotes y plántulas regeneradas *in vitro*; el 2,4-D se ha empleado para la inducción de callos y para la obtención de embriones somáticos (Tabla 11).

Durante los últimos años se ha demostrado que la proliferación de brotes *in vitro* de cactáceas puede lograrse a través del rompimiento de la dominancia apical, y de esta forma activar la yemas axilares con la adición de citocininas en el medio de cultivo, o bien de la combinación de citocininas y auxinas, estas últimas en concentraciones muy bajas (Fay y Gratton, 1992).

3d. Cultivo de Tejidos Vegetales en el género *Turbinicarpus*

Se tienen reportes de la regeneración *in vitro* para el género *Turbinicarpus*, dos de ellos citados por Fay y Gratton (1992) en una comunicación personal con Ronse referente a *T. lophophoroides* (Werd.) y otro referente a la propagación *in vitro* de *T. pseudomacrochele* (Backeberg) en el Jardín Botánico de Kew, Inglaterra. Otro fue la obtención de embriones somáticos en *T. pseudomacrochele* (Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay 1996) en el CIATEJ; los más recientes son la regeneración de *T. laui* Glass et Foster en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Jardín Botánico de la UNAM (Mata *et al.*, 2001), otro efectuado por Santos-Díaz *et al.*, (2003) en el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el último referente a la regeneración de ocho especies o subespecies del género *Turbinicarpus* efectuado por Dávila-Figueroa *et al.*, (2005) en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Si bien estos resultados indican que la biotecnología puede generar conocimientos que permitan la propagación controlada de esta y otras especies silvestres, pretender establecer técnicas para la conservación *in vitro* implica considerar distintos aspectos como las anomalías genéticas que pueden llevar los organismos regenerados por las técnicas *in vitro* (Premoli, 1998).

4. Variación somaclonal en el Cultivo de Tejidos Vegetales

Las células vegetales exhiben el fenómeno de totipotencialidad, que es la habilidad de una sola célula para regenerar una planta completa (Haberlandt, citado por Benson, 1999). Este proceso de regeneración, donde los tejidos organizados o diferenciados son tomados de una planta e introducidos a un medio nutritivo y estimulados a dividirse, puede resultar en anomalías citológicas y cromosómicas que en conjunto son denominadas variaciones somaclonales y son evidenciadas por los cambios heredables en los fenotipos vegetales, variación en el número cromosómico, acumulación de mutaciones, alteración en los niveles de expresión de los ácidos ribonucleicos y cambios en la secuencia del DNA.

Esto tiene una gran importancia para la conservación del material vegetal *in vitro*, Scowcroft (citado por Benson, 1999) señaló que parte de esta variación puede preexistir en las poblaciones naturales tomadas para las colecciones o bancos de germoplasma o incluso puede ser generada *de novo* como resultado de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Todas o algunas de las plantas regeneradas pueden ser diferentes físicamente de la planta madre de la cual se derivaron los cultivos y esta variación puede deberse entre otros motivos al método utilizado para la regeneración que incluye el tipo de explante usado, los reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo, la edad del cultivo, entre otros.

Con los estudios *in vitro* se ha demostrado que es posible regenerar plantas completas por dos vías morfogénéticas: organogénesis y/o embriogénesis somática las cuales pueden ser directas o indirectas si primero existe la formación de un tejido no especializado y desdiferenciado (callo).

Se ha definido que las rutas morfogénéticas que impliquen una etapa de callo podrían resultar en regenerantes con cambios genéticos que afecten el uso de las técnicas de propagación *in vitro* para propósitos de conservación por lo que contar con un análisis de su genotipo es una herramienta muy importante para conocer y constatar el genotipo que se está conservando (Premoli, 1998).

Los mismos métodos usados para la detección de variación en los regenerantes pueden ser usados para el estudio de la variabilidad de los individuos de los cuales se tomaron los explantes para el proceso de propagación *in vitro* (Martín y Pérez, 1994).

5. Detección de polimorfismos de DNA

Las variaciones genéticas generalmente se estimaban a partir de marcadores asociados a caracteres morfológicos, sin embargo el pequeño número de estos marcadores distintos en un mismo linaje reduce la posibilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres relevantes a través del estudio de poblaciones segregantes. En los últimos años se ha incrementado el uso de marcadores moleculares como una herramienta más en la caracterización de los individuos.

Los marcadores moleculares considerados como un carácter adicional en los diferentes estudios sobre variabilidad genética no están influenciados por el ambiente, a diferencia de los marcadores isoenzimáticos en los que las diferencias entre dos individuos se visualizan a través del producto enzimático, el cual está influenciado por actividades asociadas a diferentes fases de desarrollo, a la especificidad de formas isoenzimáticas en los diferentes tejidos vegetales, o por factores ambientales que afectan la expresión y la actividad de las enzimas (Grattaplagia y Elias, 1998).

Los marcadores moleculares proporcionan un número ilimitado de caracteres moleculares que pueden ser de gran valor en la construcción de mapas genéticos, caracterización de genotipos de interés a partir de muestras de células o tejidos y también para el establecimiento de sus relaciones filogenéticas (Kazan *et al.*, 1993; Grattaplagia y Elias, 1998).

El uso de marcadores moleculares proporcionan una herramienta útil en el análisis de la variación y en la estimación de la diversidad biológica y constituyen un elemento esencial en la identificación y clasificación clonal, conservación del germoplasma, diversidad y huellas genéticas, identificación de cultivares, estudios ecológicos (Tabla 12) así como monitoreo de la estabilidad genética en material propagado por cultivo *in vitro* e identificación de mutantes (Kazan *et al.*, 1993; Cloutier y Landry, 1994).

Tabla 12. Algunas aplicaciones de marcadores moleculares en diferentes especies

Espece	Marcador molecular	Objetivo	Referencia
<i>Picea abies</i> (Pinaceae)	RAPDs	verificación clonal	Scheepers <i>et al.</i> , 1997
<i>Agave tequilana</i> var. Azul (Agavaceae)	RAPDs	análisis de la diversidad genética	Vega <i>et al.</i> 2001
<i>Zea mays</i> (Poaceae)	RFLP	identificación de cultivares	Henry, 1997
<i>Capsicum spp</i> (Solanaceae)	AFLP, RAPDs	distancia genética entre cultivares	Lefebvre <i>et al.</i> , 2001
<i>Prosopis ssp</i> (Mimosaceae)	RAPDs	variación inter e intragenética de poblaciones silvestres	Juárez-Muñoz <i>et al.</i> , 2002
<i>Carica papaya</i> (Caricaceae)	RAPDs	relaciones genéticas entre cultivares e individuos silvestres	Jobin-Décor <i>et al.</i> , 1997
<i>Asparagus</i> (Liliaceae)	RAPDs, SCAR	Identificación del sexo	Jiang y Sink, 1997
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Cactaceae)	RFLP, RAPDs	Obtención de huella genética	Arnold-Schmitt <i>et al.</i> , 2001

Un marcador genético molecular se define como la secuencia de DNA que puede ser detectada a través de alguna técnica particular asociada o correlacionada a una característica específica y cuya herencia puede ser monitoreada. Cuando se cita a un marcador bioquímico, se refiere a una proteína o enzima asociada a un fenotipo particular (Kazan *et al.*, 1993; Cloutier y Landry, 1994; Valadez-Moctezuma y Kahl, 2001).

La información genética que distingue a los individuos está contenida en sus genes que cuando se expresan, determinan el desarrollo y características particulares del individuo.

Todas las diferencias genéticas que se pueden apreciar entre los individuos son ocasionadas por cambios en su DNA, estos cambios pueden demostrarse de dos maneras: 1) al analizar directamente esta macromolécula, o 2) al analizar sus productos genéticos en la célula; es decir cambios en las proteínas, enzimas, metabolitos o características fenotípicas.

La variabilidad genética con base en los productos del DNA se ha determinado mediante análisis isoenzimáticos. Esta técnica involucra la separación electroforética de isoenzimas en geles de almidón o poliacrilamida, es relativamente económica, permite detectar varios loci en poco tiempo y detectar la herencia codominante (Weising *et al*, 1995).

A diferencia de las isoenzimas, los marcadores moleculares basados en el DNA tienen la ventaja de que sus polimorfismos son mucho más abundantes, ya que se encuentran distribuidos en todo el genoma, tienen mayor grado de reproducibilidad y su expresión no está limitada a determinados tejidos.

5a. Marcadores moleculares

Diversas técnicas de biología molecular están disponibles hoy para la detección de polimorfismo genético o variabilidad genética a nivel de secuencia de DNA, las cuales difieren en su potencialidad para detectar niveles de variabilidad, así como en otros factores tales como reproducibilidad y costo, que deben ser considerados para seleccionar la metodología más adecuada a aplicar (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de los marcadores moleculares más comúnmente utilizados para detectar variación en el genoma de plantas (Grattapaglia y Elias, 1998)

Características	RFLP	RAPDs	Microsatélites	AFLP
Tipo de sonda	DNA	primers 10 pb	secuencias repetidas específicas de DNA	secuencias específicas de DNA
Polimorfismo	medio	alto	alto	muy alto
Detección de alelos	si	no	si	no
Nº de loci detectados	1-3	1-10	1-5	50-100
Genoma analizado	parte del genoma	genoma completo	genoma completo	genoma completo
Dificultad	intermedia	simple	simple	intermedia
Reproducibilidad	alta	intermedia	alta	alta
Cantidad de DNA	2-30 µg	1-10 µg	50-100 µg	100 µg
Radioisótopos	si	no	no	si
Costo	alto	intermedio	alto	alto
Tiempo	intermedio	rápido	rápido	intermedio

5b. Técnicas basadas en hibridación

Una de las primeras técnicas desarrolladas para analizar polimorfismos en el genoma de las plantas fue la de los RFLPs, que consiste en detectar fragmentos específicos de DNA mediante la hibridación de una sonda particular;

es decir, mediante el uso de una secuencia específica de DNA que puede provenir de alguna región de un gen particular o algún otro fragmento del genoma, previamente marcada con radioactividad o con algún compuesto químico. Este tipo de marcadores son utilizados principalmente para localizar genes específicos y sus alelos en genomas complejos, para discriminar individuos cercanamente relacionados y para establecer mapas genómicos (Valadez-Moctezuma y Kahl, 2001).

5c. Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de PCR es una técnica poderosa que comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA en presencia de la enzima DNA polimerasa. La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitan la secuencia de DNA de doble cadena, “blanco” de la amplificación. Estos primers son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos son complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco.

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En la primera, el DNA de doble cadena es desnaturalizado al incrementar la temperatura (92° C). En la segunda, la temperatura es rápidamente reducida (35-60° C) dependiendo del tamaño y secuencia del primer, permite la hibridación DNA-DNA de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”, enseguida la temperatura es elevada (72° C) para que la DNA polimerasa la cual es resistente a altas temperaturas, realice la extensión de la cadena a partir de cada Terminal 3' de los primers mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia blanco, este ciclo se repite unas decenas de veces de manera que después de unos 20 ciclos se obtiene más de un millón de veces la cantidad inicial de la “secuencia-blanco”.

La separación de los fragmentos amplificados y la detección de los patrones polimórficos se efectúa mediante la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida por diferentes métodos de tinción. En este grupo se incluyen las técnicas de RAPDs, DAF, microsatélites, AP-PCR y AFLP entre otras.

5d. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico

Los RAPDs son básicamente una variación del protocolo de PCR en el que se utiliza un primer que tiene una secuencia arbitraria y por lo tanto su “secuencia blanco” es desconocida.

Para que ocurra la amplificación de un fragmento RAPD en el genoma analizado, las secuencias de DNA complementarias al primer arbitrario deben estar suficientemente adyacentes (<4000 pares de bases) y en orientación opuesta, de manera que sea posible la amplificación de ese segmento mediante la DNA polimerasa. En función de la gran cantidad de DNA producido, este fragmento amplificado puede ser visualizado directamente en forma de una banda en un gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio (Grattapaglia y Elias, 1998).

Con esta metodología es posible detectar herencia dominante y un alto grado de polimorfismo. Sin embargo, no es posible detectar alelos y el grado de reproducibilidad entre laboratorios es intermedio, debido a que los patrones de RAPDs pueden cambiar al modificarse la concentración de algunos de los componentes de la mezcla de reacción tales como el ion Mg⁺, DNA, primer, y DNA polimerasa, así como las condiciones de amplificación (desnaturalización, alineamiento y extensión) (Fig. 3).

Esta técnica se ha utilizado para estimar variabilidad genética interespecífica (Wilkie *et al.*, 1993; Nkongolo, 1999, Jobin-Decor, 1997) o intraespecífica (Mandal y Das, 2002; Fuentes *et al.*, 1999) en estudios taxonómicos para la delimitación de especies y para el establecimiento de relaciones filogenéticas, estudios de hibridación e introgresión (Tel-Zur *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 1991) (Tabla 12).

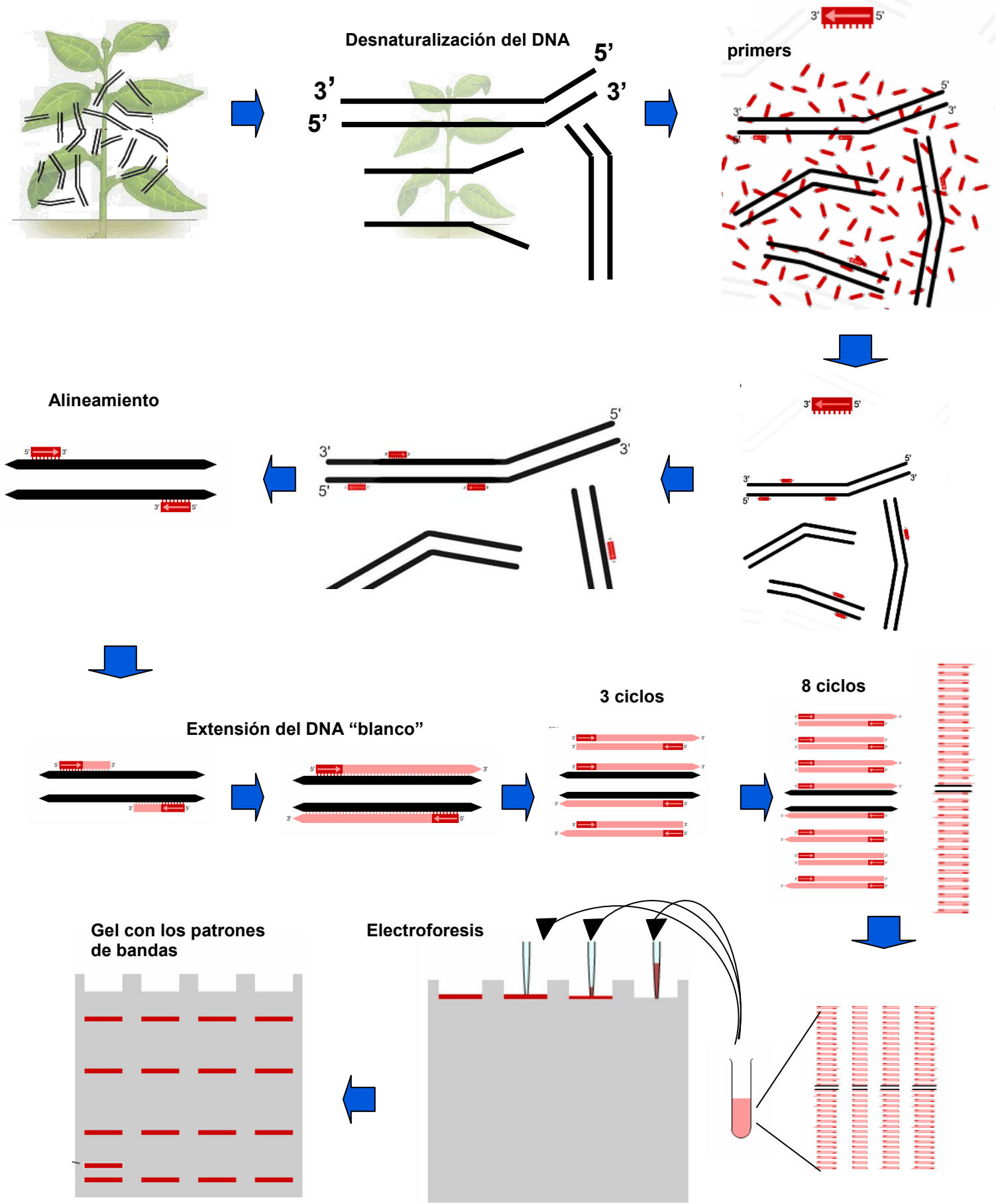


Fig. 3. Técnica de Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPDs)

6. Marcadores moleculares aplicados al Cultivo de Tejidos Vegetales

Las técnicas de marcadores moleculares han sido empleadas en el cultivo de tejidos para determinar la fidelidad genotípica de algunas especies de importancia económica, en algunas de las cuales se pretendió efectuar un fitomejoramiento, por lo que se requirió de métodos de identificación y selección de variedades con las características favorables mediante la búsqueda de huella o huellas asociadas a un carácter agronómico específico de interés. Por ejemplo, Carvalho *et al.* (2004) reportaron la regeneración de híbridos de la cruce de dos especies de *Castanea* (*C. sativa* X *C. crenata*) y determinaron la fidelidad y estabilidad genotípica de los regenerantes mediante RAPDs.

En otros estudios se han efectuado análisis para determinar si el método de propagación empleado genera una cierta variación en los regenerantes, tal es el caso del trabajo realizado por Feuser y Meler (2003) en el que se obtuvieron 600 plántulas de piña (*Ananas comosus*) mediante un tratamiento de inmersión de los explantes en paclobutrazol y ácido giberélico, sin embargo fue necesario determinar mediante el empleo de RAPDs e isoenzimas si este método tan eficiente de regeneración producía una considerable variación somaclonal en las plantas obtenidas y se encontraron un porcentaje de variación de 1.9% en comparación con el sistema estacionario (3.9%).

Así mismo, Salvi y George (2001) regeneraron plantas de *Curcuma longa*, una planta medicinal, por una vía de organogénesis indirecta a partir de callo generado en hojas y determinaron mediante el uso de RAPDs que existía variación a nivel de DNA en los regenerantes.

Otros reportes incluyen el trabajo de Munthali *et al.* (1996) que detectaron variantes somaclonales de betabel, mientras que Hashmi *et al.* (1997) determinaron la frecuencia de variación somaclonal de embriones somáticos de melocotón y Al Zahim *et al.* (1999) en regenerantes de *Allium sativum*.

6a. Fidelidad genética de los regenerantes

Como el objetivo básico de la micropropagación es la producción de plantas conforme al tipo original, es importante mantener y certificar la fidelidad genética. Existen diversos reportes del análisis de las plantas regeneradas por cultivo de tejidos y que están encaminados a constatar el genotipo de plantas que tienen alguna importancia como es medicinal, alimenticia, ornamental, etc. (Tabla 14).

Tabla 14. Algunas especies propagadas mediante cultivo *in vitro* y análisis de los regenerantes por diferentes marcadores moleculares

Especie propagada <i>in vitro</i>	Marcador molecular empleado en los regenerantes	Referencia
<i>Mehlia azerdach</i> (Meliaceae)	RAPDs	Olmos <i>et al.</i> , 2002
<i>Phalaenopsis sp.</i> (Orchidaceae)	RAPDs	Chen <i>et al.</i> , 1998
<i>Asparagus officinalis</i> cv. Argenteuil (Liliaceae)	RAPDs	Raimondi <i>et al.</i> , 2001
<i>Lilium</i> cv. „Gran Paradiso“ (Liliaceae)	RAPDs	Varshney <i>et al.</i> , 2001
<i>Agave tequilana</i> var. Azul (Agavaceae)	RAPDs	Gil <i>et al.</i> , 2001
<i>Actinidia deliciosa</i> (Actinidiaceae)	RAPDs SSR	Palombi y Damiano, 2002
<i>Angelica acutiloba</i> (Apiaceae)	RFLP, RAPDs	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
<i>Capsicum annum</i> (Solanaceae)	RAPDs	Hossain <i>et al.</i> , 2003

Existen algunos reportes de especies que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción que fueron propagadas por cultivo de tejidos y los regenerantes analizados mediante marcadores moleculares. Por ejemplo, *Pinus thunbergii* en Japón es atacado por un nemátodo, el cual ha acabado con cientos de individuos por lo que la especie ha sido propagada por cultivo de tejidos y los regenerantes han sido mantenidos *in vitro* por periodos prolongados, por lo que se emplearon marcadores moleculares (RAPDs) para corroborar el genotipo de las plantas propagadas (Goto *et al.*, 1998) y concluyeron que los regenerantes obtenidos fueron estables genéticamente. Otro ejemplo es el de la especie *Limonium estevei* originaria de España la cual se encuentra en peligro de extinción; y fue micropropagada y los regenerantes analizados mediante RAPDs para determinar el índice de diversidad genética y se encontró que hubo variación en las plantas obtenidas mediante regeneración *in vitro* y fue atribuida al explante inicial (semillas) (Martín y Pérez, 1994).

A pesar de que las investigaciones *in vitro* con cactáceas han permitido la propagación de diferentes especies con diversos propósitos incluida su conservación, prácticamente no existen estudios encaminados al análisis de su genotipo y poder establecer si se ha logrado una verdadera conservación o se han introducido cambios genéticos por efecto del cultivo *in vitro*. Mangolin *et al.* (2002) realizaron un estudio para detectar polimorfismos en callos de *Cereus peruvianus* mantenidos en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, sin embargo, debido a que el propósito del estudio fue la selección de líneas celulares para la producción de metabolitos secundarios, no se realizó la regeneración de plantas a partir de los callos por lo que no fue efectuado el análisis de los regenerantes.

Así mismo, Tel-Zur *et al.* (2004) realizaron la identificación clonal y determinaron las relaciones filogenéticas entre organismos del género *Hylocereus* y *Selenicereus* mediante análisis con RAPDs.

Es altamente recomendable que en los programas de propagación y conservación de recursos naturales se busque obtener información sobre la existencia de variación genética para establecer estrategias científicas y poder

implementar planes para el aprovechamiento y la conservación *ex situ* de las especies lo cual resulta más apremiante si estas especies se encuentran en peligro de extinción.

Considerando lo anterior, desde hace algunas décadas se han desarrollado estrategias que permiten detectar diferencias finas entre las plantas; estas estrategias incluyen tecnologías para diferenciar de manera directa el material genético de los individuos a través de patrones de bandas de DNA (Valadez-Moctezuma y Kahl, 2001).

B. Justificación

Turbinicarpus pseudopectinatus es una especie endémica de nuestro país que está catalogada como vulnerable por la UICN, bajo protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y se encuentra en el Apéndice I de CITES y debido a que es de lento crecimiento, produce pocos o nulos brotes laterales; no resulta conveniente propagarla por los métodos convencionales por lo que el Cultivo de Tejidos es una alternativa para su estudio, propagación y conservación. Lograr un procedimiento para su micropropagación haría posible una propagación masiva que permitiera abastecer el mercado y así reducir la presión sobre las poblaciones silvestres. Sin embargo es posible que durante el cultivo *in vitro* ocurran y permanezcan cambios genéticos en los regenerantes, es por ello que ante esta posibilidad y la necesidad de conservar los genotipos silvestres deben realizarse los análisis moleculares que permitan comprobar la identidad genética entre las plantas regeneradas y en relación a los genotipos silvestres.

C. Objetivos

Objetivo General

- Contribuir al estudio y conservación de *Turbinicarpus pseudopectinatus* a través su regeneración *in vitro*, así como determinar la variación genética entre los regenerantes y en relación a plantas madre de los cultivos.

Objetivos particulares

- Establecer condiciones para la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* que permitan definir bases metodológicas y fisiológicas para una propagación masiva.

- Determinar el tipo de explante con mayor potencial de regeneración.

- Determinar las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento que induzcan la regeneración *in vitro*.

- Establecer las condiciones de cultivo en invernadero para el crecimiento de las plántulas regeneradas.

- Determinar por RAPDs y comparar, el índice de diversidad genética de las plantas madre, así como de los regenerantes en el control y en los tratamientos hormonales que presentaron mayor potencial de regeneración.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Propagación *in vitro*

1a. Material vegetal

A partir de cultivos *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* derivados de la germinación *in vitro* de semillas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM, los cuales eran subcultivos por periodos de seis meses en 25 ml de medio MS sin hormonas y con base en la metodología establecida por Mata *et al.* (2001) para *T. laui* se efectuó un primer ensayo para explorar el potencial de regeneración de dos tipos de explantes.

Brotos de 0.5-1.0 cm de longitud, en los que se descartó la raíz fueron disectados: 1) transversalmente en ápices (2-4 mm) y 2) longitudinalmente en secciones basales de tallos (4-7 mm) y sembrados en medio MS con reguladores de crecimiento (Fig. 4).

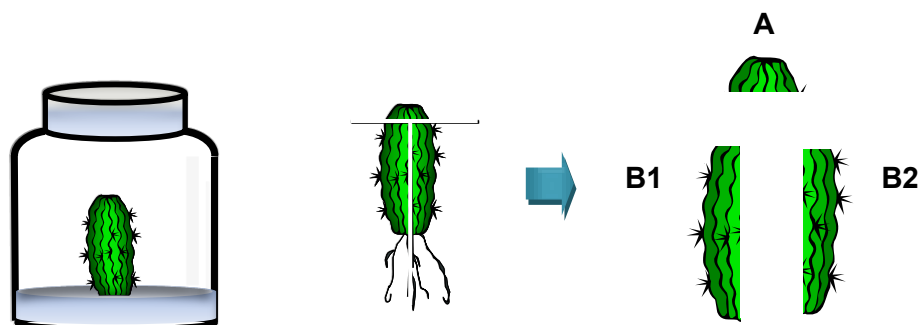


Fig. 4. Fuente de explantes de *T. pseudopectinatus*. A= apical, B= basal

1b. Cultivo de ápices y bases de tallos

Las secciones apicales y basales fueron sembradas en medio de inducción MS (1962) con sacarosa 30 g/l y se adicionaron combinaciones de los reguladores de crecimiento ANA/BAP; 2,4-D/K en diferentes concentraciones (Tabla 15). La concentración de agar fue de 9 g/l para todos los tratamientos.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 con HCl y KOH 0.1 N. Cada frasco de boca ancha, con capacidad de 120 ml, contenía 25 ml de medio de cultivo. Los frascos con el medio fueron esterilizados en un autoclave a 1.5 kg/cm² de presión y 120 ° C durante 15 min.

Se utilizó un diseño completamente al azar y de acuerdo con la disponibilidad del material biológico para cada uno de los tratamientos, se inocularon 4 explantes por frasco de cultivo para un total de 6 repeticiones por tratamiento. Al término de 1 mes los explantes apicales y basales fueron subcultivados a medio de cultivo sin reguladores de crecimiento: MS 50%, sacarosa 30g/l. Se determinó el peso fresco del callo para cada tipo de explante empleado en los diferentes tratamientos después de 4 meses de cultivo.

Tabla 15. Concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento empleados para el cultivo *in vitro* de explantes de *T. pseudopectinatus* en medio MS

ANA (mg/l)	BA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	K (mg/l)
0	0	0	0
0	2.0	0	2.0
0	3.0	0	3.0
0.5	2.0	0.5	2.0
0.5	3.0	0.5	3.0

1c. Cultivo de bases de tallos

La mayor regeneración se obtuvo al emplear secciones basales de tallos por lo que se efectuó una segunda inducción pero únicamente de explantes basales, se utilizó un diseño completamente al azar y se inocularon 4 explantes por frasco en medio MS con las mismas combinaciones y concentraciones hormonales mostradas en la Tabla 15 con 12 repeticiones por tratamiento.

Los cultivos fueron incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad.

Después de 1 mes, la mitad de los explantes basales de la segunda inducción fueron subcultivados a dos tipos de medio nutritivo sin reguladores de crecimiento: a) MS 50%, sacarosa 15g/l y b) MS 50%, sacarosa 30g/l y se determinó el peso fresco del callo para cada tratamiento después de 8 meses de cultivo.

Se efectuaron subcultivos cada 3 meses y se registraron los siguientes datos: 1) porcentaje de explantes con respuesta, 2) porcentaje de explantes con formación de callo y 3) número de brotes por explante.

1d. Individualización de brotes

Para todos los tratamientos, los brotes compactos y bien definidos regenerados vía directa o indirecta fueron: 1) individualizados, al alcanzar 0.5-1.0 cm de longitud y 2) para promover su enraizamiento fueron subcultivados en el mismo medio MS 50% con su respectiva concentración de sacarosa.

1e. Aclimatización

Los brotes individualizados que presentaron alrededor de 1-1.5 cm de longitud con un diámetro de 0.5 cm y que presentaban raíz, fueron llevados a condiciones *ex vitro* por lo que se sacaron de los frascos y se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar los restos de agar, se colocaron en papel secante por alrededor de una semana, posteriormente las raíces se sumergieron en una solución fungicida, Captan (3 g/l) y se colocaron en charolas translúcidas que contenían una combinación de tierra negra y tepojal 3:1, las charolas se mantuvieron cerradas durante las primeras 2 semanas y posteriormente se abrieron gradualmente los siguientes días.

1f. Análisis estadístico

Los datos obtenidos: número de brotes por explante con respuesta de callo y número de brotes, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), las diferencias de medias estadísticamente significativas se discriminaron mediante la prueba de rango múltiple de mínima diferencia significativa (LSD). El análisis se realizó con el paquete estadístico *Statistica* ver. 6.0.

2. Evaluación de la variación genética

2a. Selección de regenerantes y primers para los RAPDs

Para los análisis genéticos se seleccionaron los tratamientos en los que se obtuvo mayor número de brotes después de 8 meses de cultivo para cada par de reguladores de crecimiento usados; ANA/BAP 0.5/2.0 mg/l, 2,4-D/K 0/2.0 mg/l sacarosa 15 g/l, control (sin reguladores de crecimiento) y de 6 plantas adultas silvestres de las cuales se tomaron las semillas para iniciar los cultivos de *T. pseudopectinatus*.

Primeramente se tomaron 10 brotes regenerados tanto por vía directa como indirecta de 0.5 cm de longitud de 0.15 g en promedio de diferentes frascos del tratamiento 0.5/2 ANA/BAP; se realizó la extracción del DNA genómico según el método de Doyle y Doyle (1990) modificado y se probaron 20 primers y según los resultados se seleccionaron sólo 6 primers para aplicarlos al resto de los tratamientos (Tabla 16) [Ver sección 2b].

Posteriormente se realizó la extracción de DNA genómico de 12 brotes más del tratamiento 0.5/2 ANA/BAP para completar 22 muestras en total. Así mismo, de los tratamientos, 2,4-D/K 0/2 y del control se extrajo el DNA genómico de 22 regenerantes obtenidos vía organogénesis directa e indirecta. Los brotes fueron de 0.15 g y 0.5 cm de longitud promedio. Finalmente también se aisló el DNA de 6 plantas adultas.

De cada una de las 6 plantas adultas silvestres se desinfectó una pequeña zona con alcohol al 70% y con bisturí se seccionaron tubérculos de aproximadamente de 0.7 cm, se retiraron las espinas y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml para efectuar el aislamiento del DNA.

2b. Aislamiento de DNA

El DNA genómico de los regenerantes y de las plantas silvestres adultas fue aislado siguiendo el método descrito por Doyle y Doyle (1990) modificado como se describe a continuación:

A 10 ml de buffer CTAB se adicionó 0.4% de 2-mercaptoetanol y se precalentó la

mezcla a 65 °C, esta cantidad de buffer alcanzó para procesar 20 muestras. Posteriormente con ayuda de un minimortero, el tejido fue macerado en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y se utilizaron 100 µl del buffer modificado. Una vez que el tejido estuvo totalmente molido se agregó más buffer y se llevó a un volumen de 500 µl. Las muestras se incubaron a 65 °C durante 30 minutos y trascurrido el tiempo se aisló el DNA con 500 µl de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se mezcló suavemente invirtiendo los tubos varias veces durante 15 minutos con ayuda de una gradilla para a continuación centrifugar a 9000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente la fase acuosa de cada muestra se transfirió a un tubo limpio.

Finalmente el DNA se precipitó con 2 veces el volumen de la fase acuosa con isopropanol preenfriado a -20°C; la precipitación se observó como un enturbiamiento de la mezcla extracto-alcohol.

Las muestras se dejaron en el congelador a -20°C durante toda la noche para incrementar la precipitación de DNA.

Al día siguiente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante (se cuidó de no perder el precipitado); a continuación se adicionaron 500 µl de etanol al 70 % a cada muestra y se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos; se descartó el alcohol y en el mismo tubo se dejó secar el precipitado por alrededor de 2 horas hasta que el alcohol se evaporó totalmente de los tubos Eppendorf. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 50 µl de buffer TE pH 8 (10 mM de Tris-HCl pH 8 y 1mM de EDTA) precalentado a 65°C y se almacenaron a - 20°C.

2c. Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA se determinó por métodos espectrofotométricos para lo cual se tomaron alícuotas de 5 µl y se diluyeron en 495 µl de agua destilada estéril; posteriormente se determinaron las lecturas a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro Spectronic 601.

Considerando que la concentración de DNA de una solución puede ser determinada con los valores de absorbancia a 260 nm (A_{260}) y que un valor de $1.0 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ de DNA, la concentración de DNA en las muestras se calculó:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g/ml}) = \frac{495 \mu\text{l}}{X \mu\text{l}} \frac{50 \mu\text{g}}{\text{ml}} \text{OD}_{260}$$

X = volumen de DNA

495 μl = volumen de agua utilizado para disolver la muestra de DNA

50 $\mu\text{g/ml}$ = concentración de DNA determinada para un valor de 1.0 A_{260}

OD_{260} = valor obtenido en las muestras a esa longitud de onda.

2d. Evaluación de la integridad del DNA

El grado de integridad del DNA se estimó mediante la separación electroforética de las muestras de DNA en geles de 0.8% de agarosa (BIORAD) adicionado con bromuro de etidio. La electroforesis fue realizada a 100 volts durante 20 minutos (tiempo en que el frente del gel recorrió 4 cm) en buffer TBE 1X, se utilizó una fuente de poder EC105 (Apparatus Co) y una cámara de electroforesis horizontal marca Owl (Buffer Puffer). En los pozos del gel se cargó un volumen de 7 μl , este volumen estuvo constituido por 5 μl de la muestra y 2 μl de colorante de carga (50 % de glicerol, 1% de azul de bromofenol y 1% de xilen cianol). Posteriormente el gel fue colocado en un transiluminador de luz ultravioleta para visualizar las bandas. El DNA de alto peso molecular apareció como una banda compacta y el DNA degradado presentó un barrido de bandas a lo largo del carril.

2e. Amplificación del DNA

La amplificación del DNA se realizó según el método propuesto por De la Cruz *et al.*, (1997) en un volumen total de 25 μl , conteniendo 10 μg de DNA genómico, 1.03 X de buffer para PCR (Qiagen Taq PCR Core Kit), 2 mM de MgCl_2 , 0.41 mM de cada dNTP, 0.2 μM de cada primer y 1.5 U de la *Taq* DNA polimerasa.

Se utilizaron veinte primers de la serie OPB del 01 al 20 (Operon Technologies Inc., Alameda Ca. USA.) (Tabla 14).

La amplificación se realizó en un termociclador de la marca Applied Biosystems 9700 con el siguiente programa: 45 ciclos de 1 min a 94 ° C, 1 min a

38 ° C, 30 s a 54 ° C, 2 min a 72 ° C; con una extensión final de 15 min a 72 ° C.

Con el DNA de 10 brotes (ANA/BAP 0.5/2) se probaron los 20 primers de la serie OPB (Tabla 14) de manera que se obtuvieran los patrones de bandeo para todos los primers.

Se observaron patrones con buena resolución y reproducibilidad y para estimar la variabilidad genética de los regenerantes de cada uno de los tratamientos analizados se seleccionaron 6 primers (7, 8, 10, 14, 16 y 19), que fueron en los que se presentó mayor número de bandas y con ellos se efectuaron los análisis para los otros tratamientos.

Tabla 16. Secuencias de los primers empleados de la serie OPB (Qiagen Operon Technologies Inc., Alameda Ca. USA).

Código	5' to 3'	M.W.
OPB-01	GTTTCGCTCC	2970
OPB-02	TGATCCCTGG	3019
OPB-03	CATCCCCCTG	2924
OPB-04	GGACTGGAGT	3108
OPB-05	TGCGCCCTTC	2955
OPB-06	TGCTCTGCCC	2955
OPB-07	GGTGACGCAG	3093
OPB-08	GTCCACACGC	3013
OPB-09	TGGGGGACTC	3084
OPB-10	CTGCTGGGAC	3044
OPB-11	GTAGACCCGT	3028
OPB-12	CCTTGACGCA	2988
OPB-13	TTCCCCGCT	2915
OPB-14	TCCGCTCTGG	2995
OPB-15	GGAGGGTGTT	3139
OPB-16	TTTGCCCGGA	3019
OPB-17	AGGGAACGAG	3126
OPB-18	CCACAGCAGT	2997
OPB-19	ACCCCCGAAG	2982
OPB-20	GGACCCTTAC	2988

2f. Separación e identificación de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (BiORAD) al 1.4 % con buffer TBE 1X. La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 4 horas y media utilizando una fuente de poder EC105 (Apparatus Co) y una cámara de electroforesis horizontal marca Owl (Buffer Puffer).

En los pozos del gel se cargaron las muestras que contenían un volumen de 10 μ l del producto amplificado y 5 μ l de buffer de carga (agua 70%, glicerol 30% y azul de bromofenol). Se utilizaron 10 μ l de un marcador de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, *Invitrogen*) como referencia de pesos moleculares.

Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta utilizando un transiluminador de la marca UVP y un equipo EDAS290.

El software utilizado para la lectura de los geles fue el LabWorks 4.0 Bio Imaging Systems.

2g. Análisis de los geles

Los patrones de bandas observados después de la electroforesis fueron leídos con el software Labworks, las bandas fueron tratadas como características individuales (variables) y se registraron como presentes (asignando un valor de 1) o ausentes (asignando un valor de 0) y se generaron las matrices para cada primer y tratamiento, posteriormente las matrices se analizaron con el programa GenoType versión 1.2, y GenoDive versión 1.1, by Patrick Meirmans Universiteit van Amsterdam.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Propagación *in vitro*

1a. Cultivo de ápices y bases de tallos. Crecimiento de callo

Durante los 20 días iniciales de cultivo se obtuvieron las primeras respuestas, en las que de manera general se observó un incremento en el volumen de los explantes, denotado por un encurvamiento de los explantes basales (aspecto de “domo”), posteriormente y todavía dentro del primer mes de cultivo se observó la aparición de callo, el cual inició principalmente en las áreas de corte, en los bordes de los explantes, tanto apicales como basales (Fig. 5).

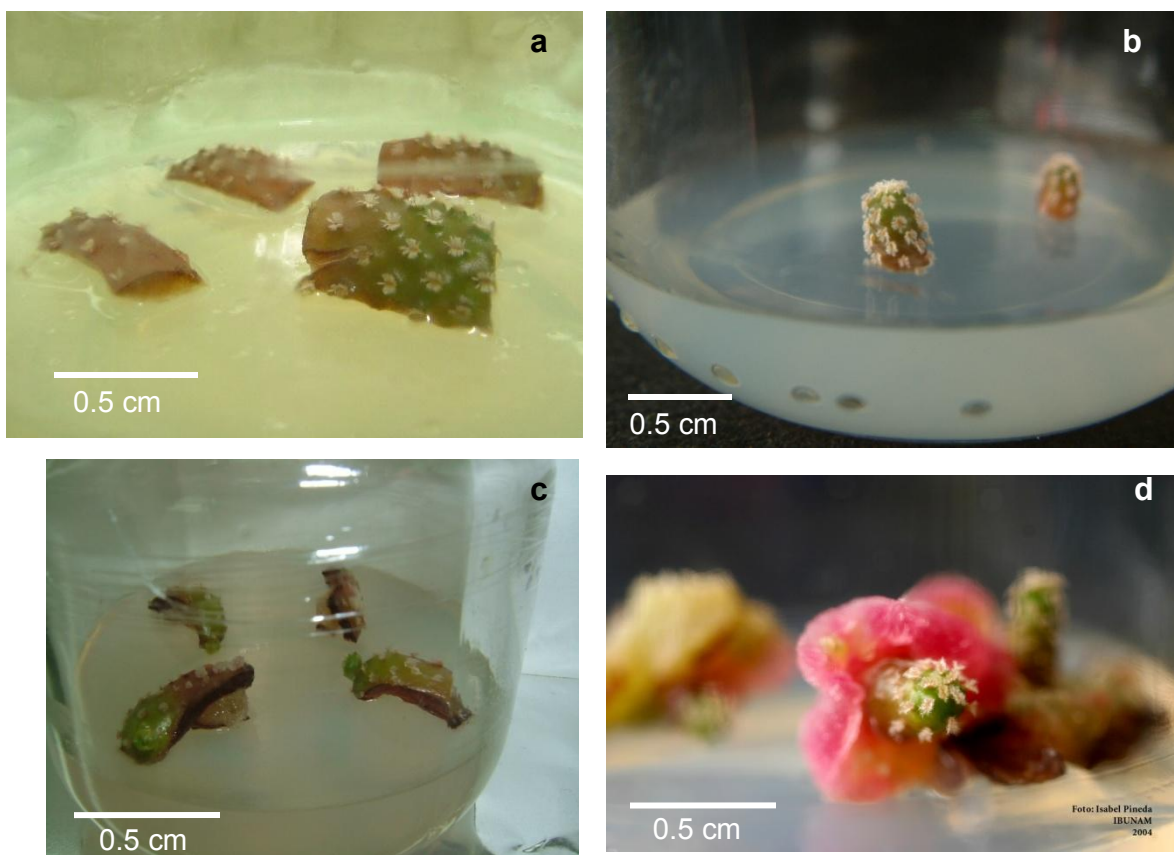


Fig. 5. a) Secciones basales de tallos, b) Secciones apicales de tallo sembrados en medio MS con diferentes reguladores de crecimiento, c) Explantes basales con aspecto de “domo” después de 20 días de cultivo y con presencia de callo en las zonas de corte, d) Explantes apicales con formación de callo

El callo era de rápido crecimiento y estuvo presente en prácticamente todos los tratamientos aunque en algunos como en los controles fue escaso (Tabla 17).

Tabla 17. Explantes con callo de *T. pseudopectinatus* después de 45 días de cultivo en medio MS con reguladores de crecimiento

Tratamiento (mg/l)		Callo (explantes basales de tallo)	Callo (explantes apicales de tallo)
ANA	BAP		
0	0	3/24 (12%)	2/24 (8%)
0	2.0	9/24 (37%)	5/24 (20%)
0	3.0	11/24 (46%)	10/24 (41%)
0.5	2.0	12/24 (50%)	10/24 (41%)
0.5	3.0	12/24 (50%)	9/24 (37%)
<hr/>			
2,4-D	K		
0	0	5/24 (20%)	5/24 (20%)
0	2.0	11/24 (46%)	4/24 (16%)
0	3.0	8/24 (33%)	6/24 (25%)
0.5	2.0	10/24 (41%)	12/24 (50%)
0.5	3.0	12/24 (50%)	9/24 (37%)

4 explantes/frasco con 6 réplicas/tratamiento para un total de 24 explantes; el porcentaje representa los explantes en los que se observó respuesta (formación de callo)

Como se muestra en la Tabla 17, se observan diferencias significativas entre los controles y los tratamientos hormonales, sin embargo no existen diferencias entre la respuesta a la formación de callo entre los explantes apicales en presencia de ANA/BAP o 2,4-D/K, ni entre los explantes basales también en presencia de ANA/BAP o 2,4-D/K, aunque sí se observaron diferencias en cuanto a la apariencia del callo entre los explantes apicales y basales.

En general, el callo en los explantes basales de los tratamientos con ANA/BAP y 2,4-D/K fue homogéneo y su color dentro de los primeras respuestas fue rosado intenso y presentó una consistencia esponjosa, mientras que en los explantes apicales el callo también presentó una coloración rosada intensa pero la consistencia fue más compacta (Fig. 6), y en los explantes apicales en los que el callo estuvo ausente, se presentó la formación de raíces, las cuales estuvieron totalmente ausentes en los explantes basales (Fig. 8).

Una vez transcurrido el periodo de inducción de un mes, los explantes fueron subcultivados a medio de cultivo MS 50%, sacarosa 30 g/l, sin reguladores de crecimiento, el volumen del callo se incrementó significativamente en los diferentes tratamientos (Tabla 18), alrededor de 60% de los explantes basales y 40% de los explantes apicales perdieron su identidad por completo excepto en el control.

Los explantes apicales regeneraron la parte faltante, las raíces (Fig. 8), así mismo las coloraciones del callo predominantemente rosas, mostradas en la primera etapa de inducción fueron remplazadas por tonalidades verdosas y amarillas que se mantuvieron a lo largo de la formación de los regenerantes.

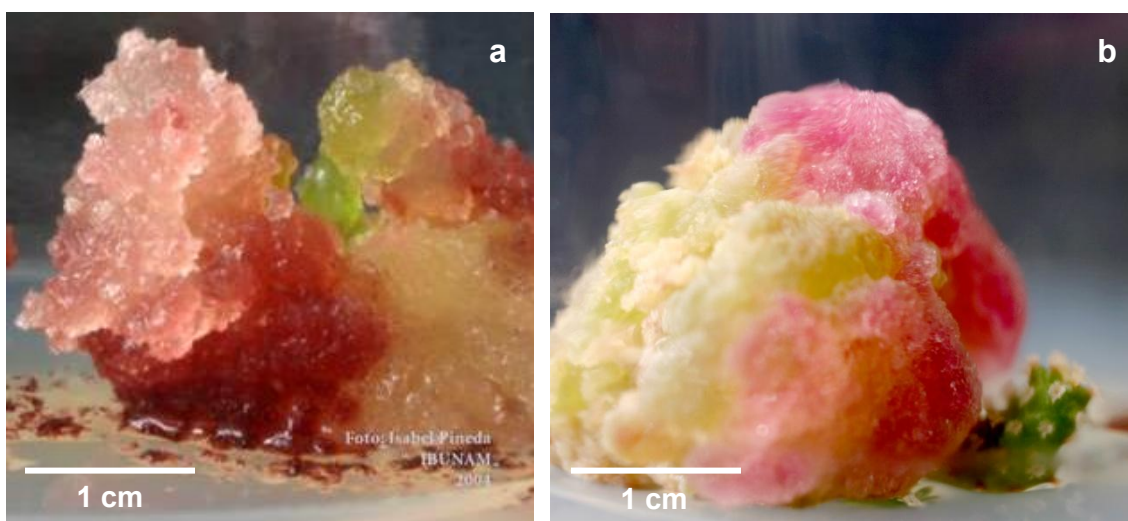


Fig. 6. a) Callo con consistencia esponjosa, obtenido de secciones basales de tallo ANA/BAP 0.5/3.0 después de 1 mes de cultivo, b) Callo de consistencia compacta de secciones apicales de tallo con tratamiento 2,4-D/K 0.5/2.0 después de 1 mes de cultivo

No hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de callo que se presentó en los explantes apicales y basales inducidos con ANA/BAP y 2,4-D/K aunque de manera total los explantes apicales generaron en promedio menos cantidad de callo (1.78 g por tratamiento) que los basales (2.33 g por tratamiento), y de estos últimos la mayor cantidad de callo se produjo con los reguladores 2,4-D y K (2.51 g por tratamiento), además en los controles se produjo la menor cantidad de callo con 0.6 g por tratamiento en promedio.

Tabla 18. Promedio de peso fresco de callo (g) por tratamiento de *T. pseudopectinatus* después de 4 meses de cultivo en medio MS 50 %, sacarosa 30 g/l

Tratamiento (mg/l)		Explantos apicales	Explantos basales
ANA	BAP	Callo (g)	Callo (g)
0	0	0.71 ± 0.14	0.5 ± 0.27
0	2.0	2.22 ± 0.90	1.8 ± 0.81
0	3.0	0.92 ± 0.13	2.0 ± 0.69
0.5	2.0	1.34 ± 0.19	2.2 ± 1.37
0.5	3.0	3.23 ± 1.15	4.2 ± 0.85
2,4-D			
K			
0	0	0.39 ± 0.36	0.9 ± 0.13
0	2.0	1.32 ± 0.40	2.09 ± 0.74
0	3.0	1.36 ± 0.52	1.8 ± 0.99
0.5	2.0	3.11 ± 1.02	3.2 ± 0.80
0.5	3.0	3.2 ± 1.43	4.5 ± 1.53

Los tratamientos que mas cantidad de callo generaron fueron ANA/BAP 0.5/3.0 mg/l, 2,4-D/K 0.5/2.0 y 0.5/3.0 mg/l después de 4 meses de cultivo (Tabla 18).

2b. Cultivo de bases de tallos. Crecimiento de callo

Se consideraron los resultados de la primera siembra (ápices y bases de tallo) para efectuar una segunda inducción de explantes donde sólo se emplearon explantes basales, se probaron 2 concentraciones de sacarosa en medio MS 50% después de la inducción.

En estos nuevos cultivos de bases de tallos, los tratamientos que más callo produjeron fueron ANA/BAP 0.5/3.0 y 2,4-D/K 0.5/2.0 y 0.5/3.0 (Tabla 19) sin embargo, la combinación ANA/BAP no mostró diferencias significativas entre los medios con sacarosa 15 y 30 g/l con 2.0 y 1.8 g en promedio de callo respectivamente, lo mismo ocurrió para la combinación de 2,4-D/K con sacarosa 15 y 30 g/l con 2.4 y 2.3 g en promedio de callo respectivamente, es decir, no obstante que la fuente de carbono se redujo en el medio de cultivo, aún así la cantidad de biomasa fue muy similar para ambas concentraciones de sacarosa, aunque al igual que en el experimento donde se compararon explantes apicales y

basales, la combinación 2,4-D/K fue la que produjo mayor cantidad total de callo (271 g) que la combinación ANA/BAP (224 g).

Tabla 19. Peso fresco de callo (g) de *T. pseudopectinatus* después de 8 meses de cultivo en medio MS 50% con dos concentraciones de sacarosa

Tratamiento (mg/l)		sacarosa 30 g/l	sacarosa 15 g/l
ANA	BAP	Callo (g)	Callo (g)
0	0	1.03 ± 0.83	0.69 ± 0.30
0	2.0	2.20 ± 1.0	1.90 ± 0.58
0	3.0	0.80 ± 0.53	1.25 ± 0.61
0.5	2.0	1.33 ± 0.58	2.5 ± 1.06
0.5	3.0	3.50 ± 1.24	3.83 ± 1.58
2,4-D			
	K		
0	0	0.58 ± 0.36	1.40 ± 0.96
0	2.0	2.41 ± 0.84	2.09 ± 1.07
0	3.0	1.57 ± 0.69	1.77 ± 0.83
0.5	2.0	3.12 ± 1.44	3.60 ± 1.12
0.5	3.0	4.10 ± 1.39	3.71 ± 1.58

La escasa presencia de callo en los controles en comparación con los tratamientos hormonales indicó que la formación del tejido indiferenciado se ve favorecida por la presencia exógena de reguladores de crecimiento, en este caso ANA/BAP y 2,4-D/K. Hubstenberger *et al.*(1992) mencionaron que las cactáceas tienen la capacidad de sintetizar altas concentraciones de auxinas cuando se cultivan *in vitro*, por lo que la adición de auxinas en los medios de cultivo frecuentemente estimula la producción de callo, el cual en algunos casos puede resultar problemático cuando el callo formado no es organogénico por lo que en determinadas ocasiones solo utilizan como fuente de hormonas a la citocininas.

El tipo de explante original influyó en la cantidad de callo producido inicialmente ya que en los explantes basales se produjo mayor cantidad del mismo. Al seccionar las plantas para obtener los explantes la superficie de corte fue mayor que en los explantes apicales por lo que la división celular que promovió la formación inicial de callo fue favorecida ya que el explante tuvo un alto índice de superficie de corte en relación a su volumen, además Hanson *et al.* (1982)

mencionaron que las secciones de tejido disectadas de una planta parecen tener una alta sensibilidad a las auxinas por lo que el estímulo causado por la herida producida al seccionar las plantas puede ser debido a la elevada capacidad de respuesta del tejido a los reguladores de crecimiento exógenos (auxinas y citocininas) lo que se traduce en una elevada división celular que favorece la producción de callo, lo que no aconteció en los controles ya que aunque sí formaron callo, no fue en la misma cantidad que en el resto de los tratamientos, este pudo ser producido únicamente por efecto de los reguladores endógenos.

El hecho de que se presentara desdiferenciación a callo en gran parte de los explantes concuerda con lo reportado por Mata *et al.* (2001) y Santos-Díaz *et al.* (2003) para *Turbinicarpus laui*, y Pérez *et al.* (1998) para *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha clavata*, *Echinocereus pectinatus*, *E. dubis*, *Ferocactus hamatacanthus*, *F. hystrix*, *F. latispinus* y *Mammillaria candida* donde observaron la pérdida de la identidad del explante debida a la formación de callo además de diferencias significativas entre los controles y los tratamientos adicionados con auxina (ANA) en el medio de inducción.

Las coloraciones del callo, predominantemente rosas, mostradas en las primeras etapas de inducción podrían reflejar el efecto de estrés para el tejido por acción de la luz y por la presencia de los reguladores de crecimiento, este fenómeno en cuanto a la coloración del callo también fue reportado por Pérez *et al.* (1998) para *Mammillaria formosa*, *M. candida*, *M. sphaelata* y *M. uncinata*, en los que el callo presentó una consistencia compacta y una coloración roja lo cual lo atribuyen a la presencia de pigmentos denominados betalainas, característicos de las familias pertenecientes al orden Caryophyllales.

En el presente estudio, aproximadamente después de 2 meses de cultivo, en diversas regiones del callo se empezaron a observar pequeñas zonas más compactas de color verde oscuro, donde se empezaron a formar los brotes y en donde la consistencia del callo era más friable.

3c. Cultivo de ápices y bases de tallos. Organogénesis

Se evaluó el desarrollo de brotes, los cuales aparecieron alrededor de 40 días después de la siembra en el medio de inducción, esta regeneración ocurrió vía organogénesis directa a partir de las areolas del explante.

Se comparó la respuesta de explantes apicales y basales en la formación de brotes y en donde se emplearon combinaciones de 4 reguladores de crecimiento (ANA/BAP; 2,4-D/K).

En la Tabla 20 se muestra el porcentaje de explantes que formaron brotes, así como el promedio de brotes por explante por tratamiento de acuerdo al explante empleado. La formación de brotes ocurrió en todos los tratamientos incluso en los tratamientos sin reguladores de crecimiento (control).

A partir de los explantes basales se obtuvieron porcentajes de 100% de respuesta en formación de brotes en los tratamientos ANA/BAP 0.5/2.0, 2,4-D/K 0.5/2.0 y 0.5/3.0, y en otros tres por arriba del 90%, ANA/BAP 0/3.0, 0.5/3.0 y 2,4-D/K 0/3.0 (Tabla 18).

Respecto a los explantes apicales, el mayor porcentaje de respuesta en formación de brotes fue de 83.3% en el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0 mg/l y en donde se observó la formación de callo en la zona basal y la formación de raíces (Tabla 20 y Fig. 8b).

El mayor promedio de brotes por explante con respuesta fue en los explantes basales cultivados inicialmente en medio MS suplementado con ANA/BAP 0.5/2.0 mg/l con un promedio de 3, y en donde se obtuvo el 100% de respuesta en formación de brotes de los explantes (Fig. 9), seguido por el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0, en ausencia de auxina, de donde se logró la formación de 2.9 brotes por explante, mientras que para los explantes apicales, el mayor promedio (2.0) se obtuvo con el tratamiento 2,4-D/K 0/3.0, por lo que se observaron diferencias significativas en la formación de brotes entre los tratamientos debidas al explante inicial empleado.

Los controles indujeron el menor porcentaje de respuesta (0.5 brotes/explante), que fue el menor promedio de todos los tratamientos (Fig. 7).

Tabla 20. Porcentaje de explantes apicales y basales de tallos con formación de brotes y promedio de brotes por explante cultivados en medio MS 50%, sacarosa 30 g/l. Resultados después de 4 meses

Tratamiento (mg/l)		Explantes apicales		Explantes basales	
ANA	BAP	Explantes con formación de brotes	\bar{X} brotes/explante	Explantes con formación de brotes	\bar{X} brotes/explante
0	0	6/24 (25%)	0.5 ^a	10/24 (41.6%)	0.4 ^a
0	2.0	14/24 (58.3%)	0.7 ^{ab}	8/24 (33.3%)	1.5 ^{ab}
0	3.0	18/24 (75%)	1.4 ^{bc}	22/24 (92%)	1.8 ^c
0.5	2.0	8/24 (33.3%)	0.5 ^a	24/24 (100%)	3.0 ^d
0.5	3.0	20/24 (83.3%)	1.9 ^d	22/24 (92%)	1.9 ^{bc}
2,4-D K					
0	0	3/24 (12.5%)	1.3 ^{bc}	8/24 (33%)	0.2 ^a
0	2.0	8/24 (33.3%)	1.7 ^d	24/24 (100%)	2.2 ^{bcd}
0	3.0	19/24 (80%)	2.0 ^d	22/24 (92%)	2.9 ^{cd}
0.5	2.0	16/24 (66.6%)	0.4 ^a	24/24 (100%)	2.5 ^{bcd}
0.5	3.0	18/24 (75%)	0.6 ^{bc}	24/24 (100%)	2.0 ^{bcd}

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

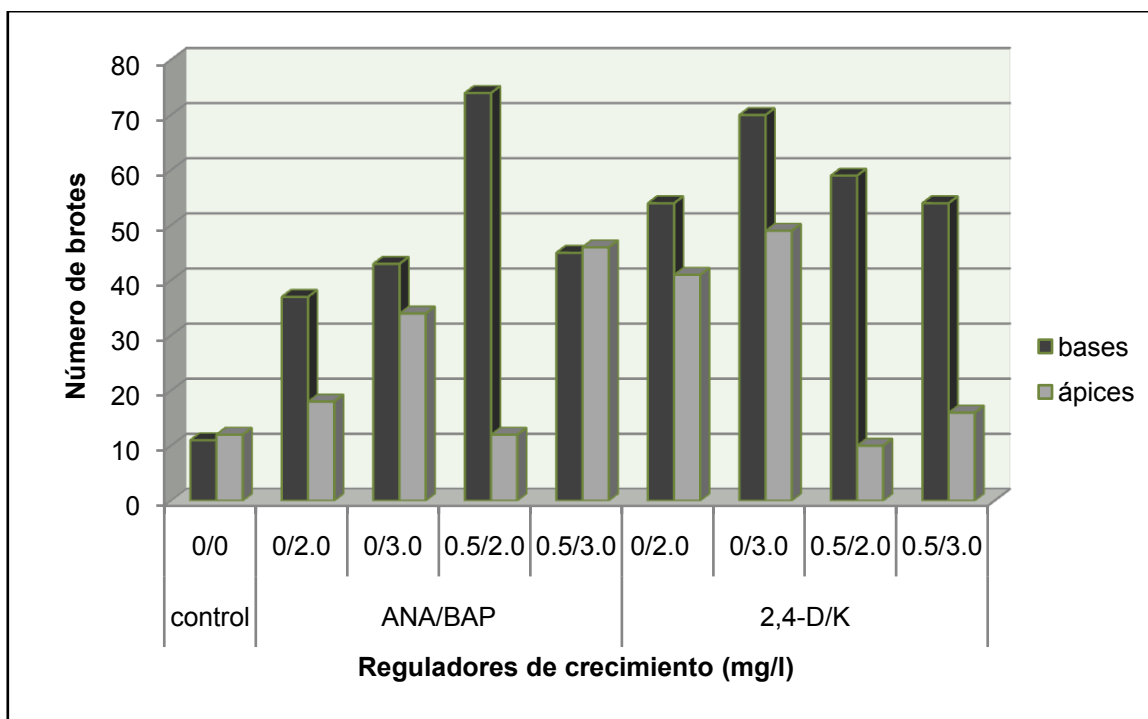


Fig. 7. Brotes obtenidos de secciones apicales y basales de tallo en medio MS 50%, sacarosa 30 g/l Resultados después de 4 meses

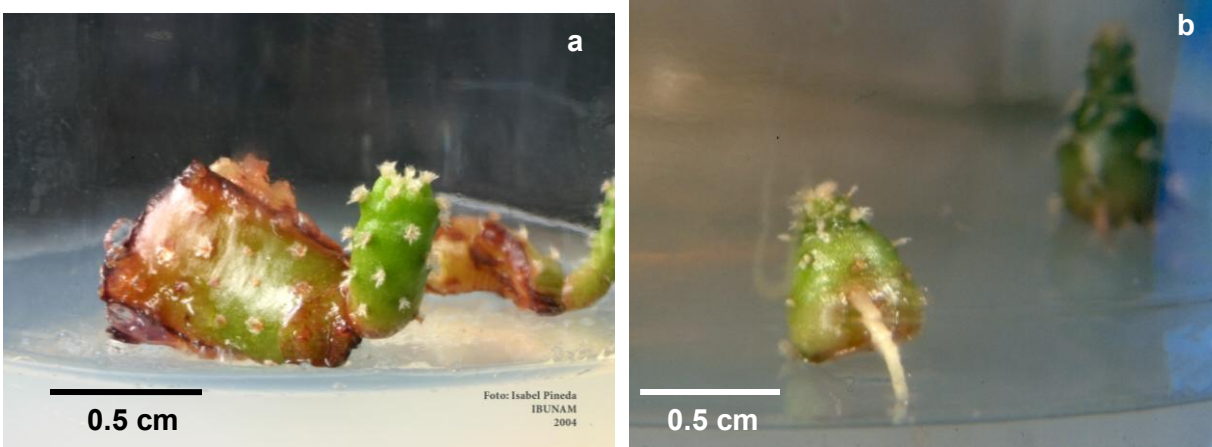


Fig. 8. a) Brotes regenerados vía organogénesis directa en el control después de 2 meses de cultivo; b) Explantes apicales enraizados con el tratamiento ANA/BAP 0/2.0 después de 1 mes de cultivo

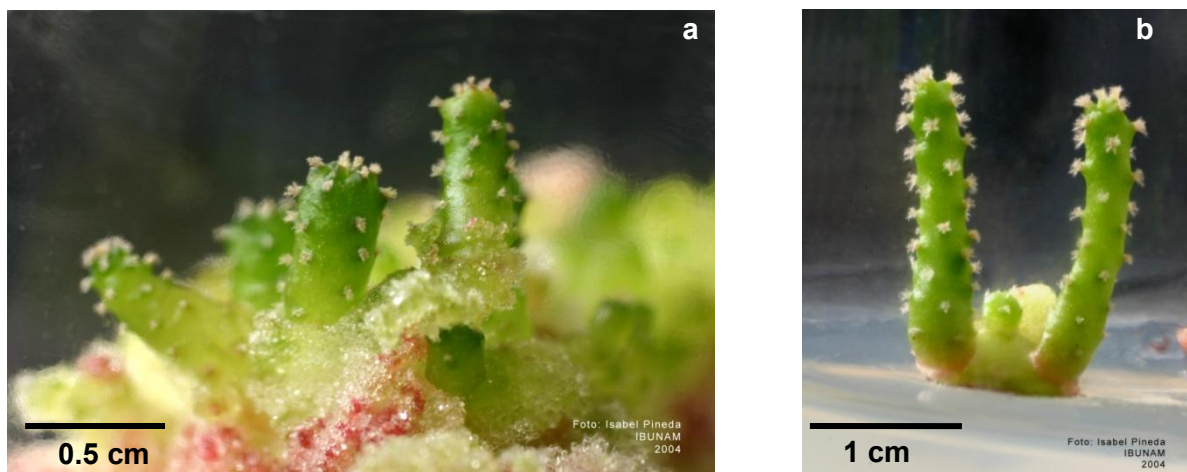


Fig. 9. a) Brotes regenerados vía organogénesis directa a partir de explantes basales en el tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0, después de 4 meses de cultivo; b) Brotes regenerados vía organogénesis indirecta a partir de explantes apicales, tratamiento ANA/BAP 0/2.0 después de 3 meses de cultivo

En la Familia Cactaceae, la disección del ápice se ha empleado para romper o reducir la dominancia apical y de esta manera incrementar la respuesta morfogénica de los explantes (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Giusti *et al.*, 2002; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Santos-Díaz, 2005; Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002), Mauseth y Halperin (1975) encontraron que las areolas de la *Opuntia polyacantha* no mostraron crecimiento ni respuesta en presencia de ANA

y BAP, sin embargo, si los explantes eran seccionados y nuevamente colocados en el medio de inducción se promovió su respuesta ante los reguladores de crecimiento y se produjo una morfogénesis inducida.

En el cultivo de ápices y bases de *Turbinicarpus pseudopectinatus* se observaron diferencias significativas en la regeneración de brotes cuando se usaron explantes basales, este efecto se debió muy posiblemente al cambio en el balance hormonal dentro del explante lo que permitió activarse a las zonas meristemáticas de las areolas que se encontraban en latencia (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989) y, no obstante que los explantes apicales también formaron brotes, en ellos se observó la presencia de raíces, por lo que en muchos casos únicamente regeneraron la parte faltante, la raíz, lo que puede indicar un fuerte compromiso para continuar como individuo y rápidamente restablecer sus funciones.

Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa (2002) reportaron un efecto similar al emplear dos tipos de explantes para la regeneración de *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* (secciones apicales y transversales); las secciones transversales de *P. strobiliformis* fueron las que produjeron mayor cantidad de brotes por explante ya que los ápices solo se elongaron y generaron muy pocos brotes, Giusti *et al.* (2002) reportaron un resultado similar al propagar tres cactáceas, *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *P. aselliformis*. El autor mencionó que para *M. pectinifera* se obtuvo la más alta respuesta morfogenética de brotes por explante basal (4.0). La misma respuesta obtuvieron Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) quienes demostraron que el mejor índice de proliferación podía ser obtenido de secciones laterales de tallo de *Mammillaria haageana* y *Mammillaria san-angelensis*.

4d. Cultivo de bases de tallos. Organogénesis

De acuerdo a los resultados obtenidos se realizó un segundo barrido hormonal con los mismos reguladores de crecimiento y en las mismas concentraciones, pero se emplearon únicamente explantes basales y al igual que el ensayo anterior se mantuvieron durante 1 mes en inducción en medio con hormonas y posteriormente se subcultivaron a medio MS 50%, pero con dos concentraciones de sacarosa, con 15 g/l y 30 g/l.

Al igual que en el experimento anterior (explantes apicales y basales) se obtuvieron porcentajes de respuesta en formación de brotes por arriba del 90% en 4 tratamientos (ANA/BAP 0/3.0, 0.5/2.0 y 2,4-D/K 0/2.0, 0/3.0).

Los análisis estadísticos indicaron que no hubo diferencias significativas en cuanto al número total de brotes obtenidos en los tratamientos en medio MS 50% con sacarosa 15 y 30 g/l.

Para la combinación ANA/BAP, sacarosa 15 g/l se obtuvieron 752 brotes y para la combinación ANA/BAP, sacarosa 30 g/l se obtuvieron 641 brotes después de 7 meses. Para la combinación 2,4-D/K, sacarosa 15 g/l se formaron 563 brotes y para la combinación 2,4-D/K, sacarosa 30g/l 458 brotes después de 7 meses de cultivo, sin embargo, sí se presentaron diferencias en el número de brotes producidos entre los tratamientos con los mismos reguladores de crecimiento ANA/BAP o 2,4-D/K y los controles con una misma concentración de sacarosa (Tabla 21 y Fig. 10).

Los tratamientos con mayor número de brotes fueron ANA/BAP 0.5/2.0, 0/3.0 y 2,4-D/K 0/2.0 con 262, 207 y 193 brotes por tratamiento respectivamente, mientras que el número de brotes más bajo se presentó en los controles (sin reguladores de crecimiento) (Fig. 10). El índice más alto de regeneración ocurrió en la presencia de 2.0-3.0 mg/l de citocinina (BAP o K) en combinación con nula o moderada concentración de auxina (ANA y también de 2,4-D), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para algunas cactáceas regeneradas *in vitro* (Martínez-Vázquez y Rubluo 1989; Pérez-Molphe *et al.*, 1998; Clayton *et al.*, 1990).

Tabla 21. Porcentaje de explantes basales de tallos con formación de brotes y promedio de brotes por explante cultivados en medio MS 50% con dos concentraciones de sacarosa.

Tratamiento (mg/l)		Explantes con formación de brotes 3 meses de cultivo	Después de 7 meses de cultivo	
ANA	BAP		\bar{X} brotes/explante Sacarosa 15 g/l	\bar{X} brotes/explante Sacarosa 30 g/l
0	0	25/48 (52 %)	2.0 ^a	1.0 ^x
0	2	46/48 (95.8 %)	3.4 ^{abc}	3.6 ^z
0	3	48/48 (100 %)	4.3 ^{cd}	3.3 ^z
0.5	2	48/48 (100 %)	5.4 ^d	4.0 ^{yz}
0.5	3	42/48 (87.5 %)	2.4 ^{ab}	2.3 ^{xyz}
2,4-D				
0	0	18/48 (37.5 %)	0.5 ^a	0.8 ^x
0	2	43/48 (89.5 %)	4.0 ^{bcd}	3.4 ^{yz}
0	3	48/48 (100 %)	3.0 ^{abc}	3.0 ^{xyz}
0.5	2	38/48 (79.1 %)	2.3 ^{abc}	1.7 ^{xyz}
0.5	3	30/48 (62.5 %)	2.6 ^{abc}	1.4 ^{xy}

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente $p=0.05$

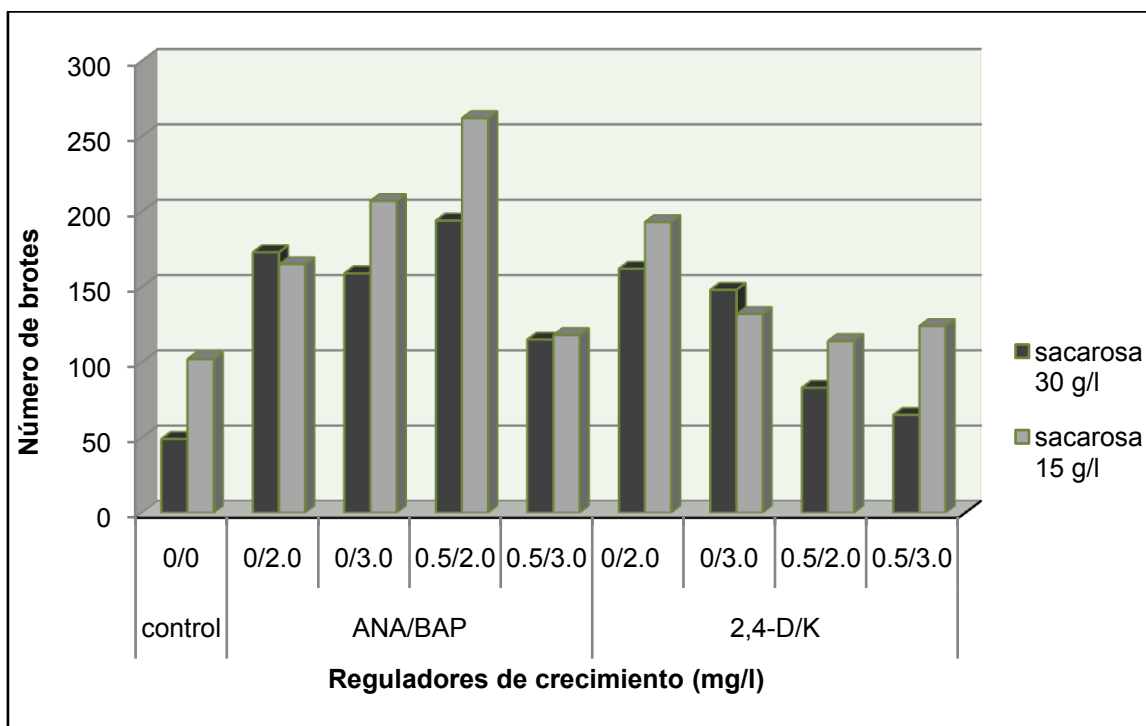


Fig. 10. Brotes obtenidos de secciones basales de tallo en medio MS 50% sacarosa 15 y 30 g/l. Resultados después de 7 meses de iniciados los cultivos

Las primeras muestras de regeneración de brotes vía indirecta ocurrieron después de tres meses de cultivo. En el callo se presentaron pequeñas zonas de color verde oscuro, las cuales formaron nódulos que después se diferenciaron en primordios de brotes al presentar las características areolas. Estas zonas de color verde oscuro fueron aumentando y madurando en brotes adventicios después del subcultivo a medio MS 50% (Fig. 11).

No obstante que no se presentaron diferencias significativas en cuanto al número total de brotes obtenidos en los tratamientos en medio MS 50% con sacarosa 15 y 30 g/l, se observaron diferencias en cuanto a la vía de regeneración de los brotes (Tabla 22) ya que en el medio MS 50% sacarosa 30g/l se obtuvieron 0.31 promedio de brotes por explante vía organogénesis directa y 0.48 promedio de brotes por explante vía organogénesis indirecta para los tratamientos ANA/BAP y 2,4-D/K, mientras que para el medio MS 50% sacarosa 15 g/l se obtuvieron 0.46 promedio de brotes por explante vía organogénesis directa y 0.2 promedio de brotes por explante vía organogénesis indirecta para los tratamientos ANA/BAP y 2,4-D/K, es decir que cuando la concentración de sacarosa se mantuvo al 100% se formaron mas brotes vía morfogénesis indirecta, mientras que cuando se redujo a la mitad, los brotes se regeneraron preferentemente vía directa después de 4 meses de cultivo.

Tabla 22. Organogénesis directa e indirecta a partir de secciones basales de tallo en medio MS 50% con dos concentraciones de sacarosa. Resultados después de 4 meses de cultivo

Reguladores de crecimiento (mg/l)	Sacarosa 30 g/l		Sacarosa 15 g/l	
	\bar{X} brotes/ explante vía directa	\bar{X} brotes/ explante vía indirecta	\bar{X} brotes/ explante vía directa	\bar{X} brotes/ explante vía indirecta
control	0.2	0.04	0.37	0.25
ANA/BAP 0/2.0	0.75	0.4	0.41	0.08
0/3.0	0.3	0.6	0.72	0.37
0.5/2.0	0.25	0.54	0.62	0.2
0.5/3.0	0.27	0.6	0.25	0.54
control	0.29	0.08	0.56	0.25
2,4-D/K 0/2.0	0.45	0.72	0.43	0.25
0/3.0	0.23	0.7	0.2	0.27
0.5/2.0	0.14	0.5	0.4	0.43
0.5/3.0	0.18	0.6	0.7	0.31

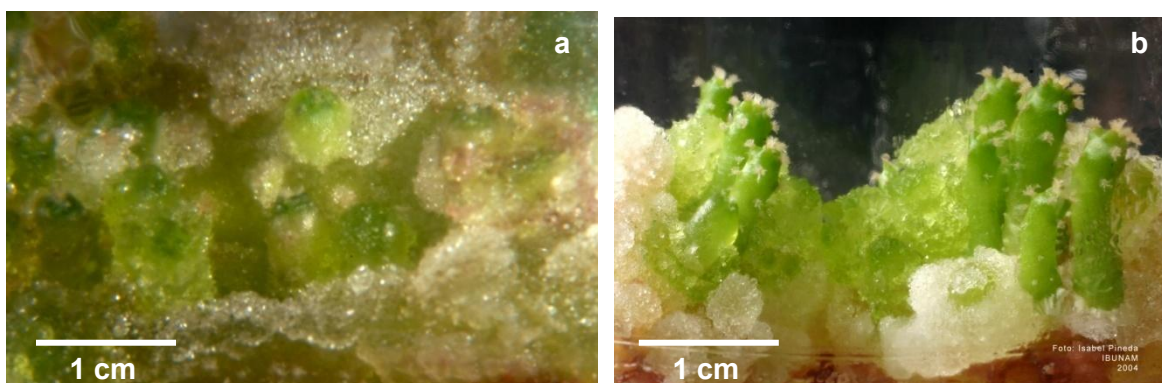


Fig. 11. a) Nódulos y primordios de brotes formados vía organogénesis indirecta con ANA/BAP 0.5/2.0, después de 3 meses de cultivo; b) Brotes adventicios que presentan areolas características después de 4 meses de cultivo

Hubstenberger *et al.* (1992) indicaron que muchas cactáceas al parecer tienen la capacidad de producir elevadas concentraciones de auxinas cuando son cultivadas *in vitro*, lo cual generalmente estimula la producción de callo de manera que para numerosas especies hay una interacción más intensa con una fuente exógena de citocininas que de auxinas, sin embargo, para otras especies es necesaria la presencia de ambos reguladores de crecimiento para la inducción de una respuesta morfogénica.

Pérez *et al.* (1998) reportaron que para *Mammillaria uncinata*, *Coryphanta durangensis* y *Astrophytum myriostigma*, sólo fue necesaria la adición de citocininas (BAP 1mg/l) para que ocurrieran los índices más altos de proliferación, sin embargo, en el mismo estudio se determinó que para las especies de los géneros *Echinocereus* y *Ferocactus* se requirió la combinación de ambos reguladores de crecimiento (0.01/1.0 mg/l ANA/BAP) para que se produjeran altos índices de organogénesis, lo mismo reportaron Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) e Infante (1992) que sugirieron que la presencia de ambos reguladores estimularon altos índices de regeneración de *Mammillaria san-angelensis* y *Mediocactus coccineus*.

Algunos estudios señalaron que encontraron diferencias en la regeneración al emplear 2 citocininas diferentes en la misma concentración, por ejemplo, Giusti *et al.* (2002) reportaron diferencias en cuanto a la proliferación de *Pelecypora aselliformis* ya que la K fue más efectiva que el BAP usándolas por separado en concentraciones iguales, pero para *Mammillaria pectinifera* no existieron diferencias en los índices de proliferación con dichas hormonas, Dabekaussen *et al.* (1991) encontraron un efecto similar ya que reportaron que no existieron diferencias en los índices de proliferación de *Sulcorebutia alba* cuando se emplearon diferentes citocininas en cantidad equimolar, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proliferación obtenida con K y BAP cuando se emplearon en concentraciones iguales, sin embargo, para que se produjera la mayor cantidad de brotes fue necesaria la presencia de la auxina, específicamente ANA, ya que con el 2,4-D sí se produjeron diferencias en cuanto a la organogénesis cuando sirvió como fuente de auxina. Los brotes obtenidos con ANA tuvieron una apariencia más consolidada, es decir con un color verde oscuro y con los tubérculos arreglados en espirales y comprimidos lateralmente.

Mata *et al.* (2001) para *T. laui* y Dávila-Figueroa *et al.* (2005) para *T. lophophoroides*, *T. subterraneus* y *T. pseudopectinatus* reportaron que la mejor respuesta en número de brotes por explante fue obtenida al usar BAP como único regulador de crecimiento, lo cual aunque concuerda en parte con lo obtenido en nuestros resultados, en el presente estudio, fue necesaria una moderada cantidad de auxina (ANA 0.5 mg/l) para lograr el máximo número de brotes por explante. Esto puede deberse a que tanto Dávila-Figueroa *et al.* (2005), como en este estudio, se partió desde semillas para iniciar los cultivos, por lo que esta diferencia puede estar influenciada por la variación genética entre las semillas así como el tipo y condición fisiológica del explante ya que Dávila-Figueroa *et al.* (2005) encontraron la mejor respuesta en secciones transversales del tallo.

Johnson y Emino (1979) reportaron que durante la micropropagación de cactáceas, la aplicación y combinación de reguladores de crecimiento necesarias para la proliferación de brotes son únicas para cada especie, en este estudio se sugiere que las auxinas y citocininas necesarias para la producción óptima de brotes interactúan en gran medida con las hormonas endógenas de manera que indica la capacidad que tuvieron las células para regular endógenamente la concentración de reguladores de crecimiento adicionados al medio que permitieron llevar a cabo una morfogénesis en las condiciones de cultivo ensayadas.

La sacarosa, es la fuente de carbono requerida para la micropropagación debido a la reducida capacidad fotosintética de las plantas cultivadas *in vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999, George, 1993, Haisel, *et al.*, 1999), por lo que es necesaria su adición al medio de cultivo. Sin embargo, en uno de los medios de cultivo la sacarosa se redujo a la mitad (15 g/l) y el índice de regeneración no disminuyó significativamente. Malda *et al.* (1999) emplearon concentraciones de 0, 15, 30 y 45 g/l de sacarosa y concluyeron que la concentración más efectiva para el crecimiento de *Coryphanta minima* fue de 30 g/l ya que en concentraciones inferiores o superiores a 30 g/l se observó una reducción en el crecimiento. Nowak *et al.* (2004), determinaron que la mejor concentración para inducir organogénesis en explantes de hoja en *Prunus domestica* fue en concentraciones de 20 g/l,

mientras Hammat (1993) reportó que la mejor concentración de sacarosa para *P. padus* fue de 30 g/l, por lo que Nowak *et al.* (2004), señalaron que la concentración de la fuente de carbono puede ser especie específica; lo mismo indicó George (1993), que la concentración óptima para inducir la morfogénesis o crecimiento difiere entre genotipos, incluso entre aquellos que se encuentran muy relacionados. Damiano *et al.* (1987) encontraron que la concentración de sacarosa necesaria para producir un alto índice de proliferación de brotes de *Eucalyptus gunnii* varió entre los clones. La influencia de la concentración de sacarosa en la organogénesis entre explantes de *Chrysanthemum* dependió del tipo de cultivar (George, 1993).

Aunque en este estudio, se probaron 2 concentraciones de sacarosa (15 y 30 g/l), no hubo diferencias significativas en el potencial de regeneración, se debe considerar que durante la inducción, la concentración de azúcar que fue de 30 g/l, pudo resultar determinante y suficiente para formar el callo y las nuevas zonas meristemáticas, mediante un flujo pasivo de azúcares del medio hacia el tejido, de manera que su almacenamiento pudo ser decisivo para la morfogénesis posterior, por lo que aunque se subcultivó a medio con la mitad de sacarosa (15g/l), el proceso de diferenciación ya había comenzado y los nuevos brotes pudieron continuar su crecimiento con los siguientes subcultivos no obstante la reducción de la fuente de carbono, un resultado similar fue reportado por Nowak *et al.* (2004) en explantes de hoja en *Prunus domestica* donde una vez que había ocurrido la diferenciación los siguientes subcultivos en medio con menor cantidad de sacarosa no fue determinante para la organogénesis.

Malda *et al.* (1999) también discutieron que las plantas cultivadas *in vitro* tienen elevadas tasas de transpiración comparadas con las plantas *ex vitro* debido a una mayor apertura estomática, lo que permite aumentar la entrada de CO₂; en las plantas con metabolismo CAM el aporte de CO₂ solo ocurre durante la noche para reducir la pérdida de agua, en contraste, las plantas *in vitro* están sometidas a una alta humedad relativa y los estomas presentan una baja funcionalidad lo que puede favorecer una mayor fijación de CO₂ tanto en periodos de luz como en oscuridad, por lo que es posible que las cactáceas cultivadas *in vitro* puedan asimilar carbono constantemente y reflejarse en un continuo y rápido crecimiento,

y un incremento en la morfogénesis, así mismo en este estudio, el decremento de la fuente de carbono pudo provocar una retroalimentación positiva hacia la maquinaria fotosintética, en especial hacia la activación de la Rubisco que a su vez pudo incrementar la tasa fotosintética.

Por otro lado, los reguladores de crecimiento principalmente las citocininas pudieron favorecer la diferenciación de los cloroplastos (Taiz y Zeiger, 2006), que son los sitios de síntesis de los azúcares de manera que no se produjo un decremento en la organogénesis, Desjardins (1995) mencionó que existe cada vez mas evidencia de que la fuente exógena de carbono presente en el medio de cultivo es uno de los factores más importantes asociados a la baja actividad de la fotosíntesis especialmente de la Rubisco en las células y tejidos *in vitro*.

El potencial de regeneración de órganos demostrado en los tejidos de explantes en cultivo de *T. pseudopectinatus* y expresado como regeneración de brotes vía directa e indirecta indican que las células adquirieron la competencia y desarrollaron la capacidad de diferenciación organogénica en respuesta a un nuevo balance hormonal del explante.

Además, las células respondieron a los reguladores de crecimiento utilizados para promover el desarrollo de tejido indiferenciado (callo) y brotes, y aunque el callo permanece indiferenciado, conforme el crecimiento procede, algunas células especializadas forman centros meristemáticos que dan origen a los nuevos órganos; aun los explantes en medio nutritivo sin reguladores de crecimiento fueron capaces de responder y regenerar brotes debido a la presencia endógena de hormonas mediante la activación de las zonas meristemáticas en las areolas.

Para *Turbinicarpus laui*, se reportó la aparición de brotes vía organogénesis directa después de 2 semanas en el medio de inducción, sin embargo para *T. pseudopectinatus* apenas se empezaron a observar los brotes alrededor de las 5 semanas de cultivo, para otras especies el tiempo puede variar según la especie, ya que Olguín (1994) reportó que *Ariocarpus retusus* produjo brotes después de un mes de inducción y Pérez *et al.* (1998) reportaron el crecimiento de brotes a partir de las areolas hasta después de 7 semanas de inducción en *Astrophytum*

myriostigma, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha clavata*, *Mammillaria formosa* y *M. uncinata*.

Los explantes de *T. pseudopectinatus* mostraron una gran capacidad organogénica bajo las condiciones de cultivo debido a que, prácticamente en todos los tratamientos, se obtuvieron brotes y callo, transcurridos 7 meses se tuvieron aproximadamente 2565 brotes vía directa e indirecta (de la segunda inducción de explantes basales) lo que promedia 6 brotes por explante, no obstante Mata *et al.* (2001) reportaron para *Turbincarpus laui* al cabo de tres meses la obtención de 298 brotes por explante, mientras que Dávila-Figueroa *et al.* (2005) para otras especies de *Turbincarpus* reportaron un promedio de 7 brotes por explante para *T. valdezianus* y de 19 para *T. pseudopectinatus*, sin embargo, no se menciona después de cuánto tiempo. No obstante que en el presente estudio el promedio obtenido para *T. pseudopectinatus* es menor, los siguientes subcultivos mostraron una activa regeneración de brotes. Hubstenberger *et al.* (1992) señalaron que es común un incremento de 4-10 veces por mes, Ault y Blackmon (1987) reportaron un promedio de 7.9 brotes por explante obtenidos de *Ferocactus acanthodes*, y Pérez *et al.* (1998) reportaron promedios que van desde 2.1 hasta 17.5 brotes por explante para *Nyctocereus serpentinus* y *Mammillaria sphaelata*.

Aunque los cultivos fueron mantenidos en medio nutritivo MS libre de reguladores de crecimiento, expresaron su potencial morfogénico y continuaron la regeneración de brotes vía indirecta e incluso a partir de los brotes ya consolidados que generaron mas brotes a partir de las areolas.

5e. Individualización de brotes

Los brotes consolidados, es decir, aquellos, con un color verde oscuro, con la formación y desarrollo de las areolas características de la especie y de una altura aproximadamente de 1 cm, fueron separados de la masa de callo y del grupo de brotes y subcultivados a MS 50% con su respectiva concentración de sacarosa (15 o 30 g/l) para inducir la formación y desarrollo de raíces (Fig.12).

En algunos casos los brotes aumentaron de volumen, reventaron y formaron callo que produjo nuevamente brotes tanto por organogénesis directa (activación de yemas) como por organogénesis indirecta. Por lo anterior se decidió no adicionar reguladores de crecimiento para promover el enraizamiento de los brotes y aunque en algunos de ellos se desarrollaron raíces, en otros casos los brotes no presentaron ningún cambio por lo que para promover la formación de raíces se dejó deshidratar el medio de cultivo como lo efectuaron Smith *et al.* (1991) quienes obtuvieron un 73% de enraizamiento en *Coryphantha macromeris* al dejar secar el medio de cultivo.

Apenas el 10% de los brotes presentaron raíz en medio MS 50%, sacarosa 15 g/l después de 2 meses de ser individualizados y menos del 4 % de los que estaban en medio MS 50%, sacarosa 30 g/l.

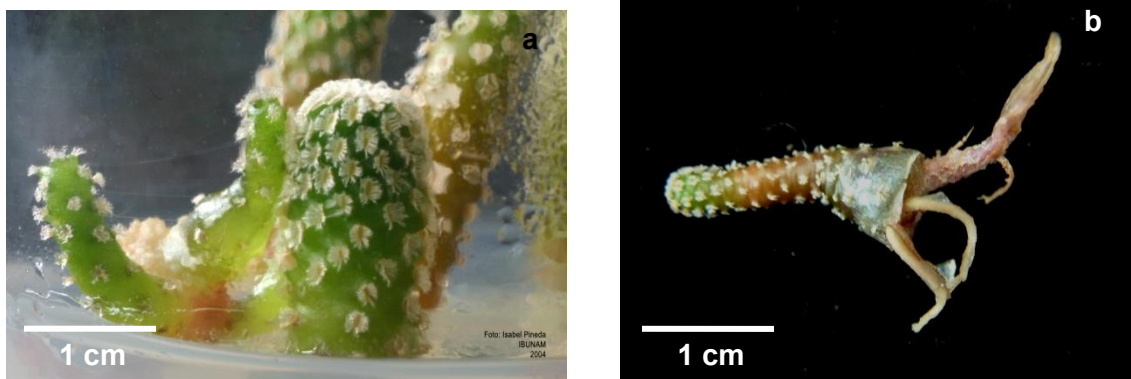


Fig. 12. a) Brotes consolidados e individualizados formados vía organogénesis indirecta tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0 sacarosa 15 g/l para promover su enraizamiento b) Brotes enraizados para ser aclimatizados tratamiento 0.5/2.0 ANA/BAP

Mata *et al.* (2001) reportaron que para *T. laui* solo fue necesario el medio MS al 50% para lograr una eficiencia de enraizamiento de 94-100% de los brotes individualizados después de 2 semanas, esto contrasta totalmente con lo reportado por Santos-Díaz *et al.* (2003) para la inducción de raíces en la misma especie, *T. laui*, en la que cuantificaron apenas 33% de enraizamiento en medio MS después de 3 meses y fueron necesarios 6 meses para la obtención de raíces bien definidas, y más aún para *Peleciphora aselliformis* Santos-Díaz *et al.* (2003) requirieron de un año para el enraizamiento en medio MS sin reguladores de crecimiento.

Dávila-Figueroa *et al.* (2005) probaron tres tratamientos que involucraron MS completo, MS 50% con carbón activado y MS adicionado con IBA (1 mg/l) y concluyeron que aunque se produjeron raíces en todos los tratamientos, el más efectivo fue con medio MS al 50% donde obtuvieron porcentajes de enraizamiento de 54.2% en *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus* y 91.4% en *T. pseudopectinatus*; en el presente estudio se obtuvieron porcentajes de enraizamiento muy por debajo de los reportados por Dávila-Figueroa *et al.* (2005) para *T. pseudopectinatus*, esto puede ser atribuido a que la diferenciación de brotes y/o raíces pueda tener preponderancia como resultado de la interacción entre auxinas y citocininas (ANA/BAP y 2,4-D/K) exógena y endógena (Rubluo *et al.*, 1996).

Es posible que, según lo reportado por Santos-Díaz *et al.* (2003), se requiera de mayor tiempo para el enraizamiento de los brotes de *T. pseudopectinatus* debido a que el sistema radicular representa el 70-80% de la longitud total de la planta (Anderson *et al.*, 1994), por lo tanto no es de sorprender que el enraizamiento sea un proceso muy largo.

6f. Aclimatización

Para efectuar la aclimatización se emplearon brotes con raíz de 1 cm de longitud en adelante y se obtuvo un porcentaje de supervivencia de alrededor del 60% después de un año (Fig.13), Dávila-Figueroa *et al.* (2005) reportaron diferentes porcentajes de supervivencia para las diferentes especies de *Turbinicarpus* propagadas, la más baja fue justamente para *T. pseudopectinatus* con 79%, mientras que para *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, obtuvo un porcentaje de alrededor de 98% lo mismo que Mata *et al.* (2001) para *T. laui* con 94% de supervivencia.

Sin embargo, otras especies de cactáceas muestran diferentes porcentajes de supervivencia ie., Smith *et al.* (1991) reportaron para *Coryphantha macromeris* un porcentaje de supervivencia de 64%, y Pérez *et al.* (1998) reportaron porcentajes de 50% para *Echinocereus dubius* y de 55% para *Mammillaria sphaelata* y *M. craigii*.

La disminución en la supervivencia puede deberse a las diversas condiciones que operan *in vitro* y que pueden provocar que las plantas micropropagadas presenten modificaciones como menor cantidad de ceras cuticulares, estomas con baja funcionalidad, escasa capacidad fotosintética que pueden provocar una disminución de la supervivencia en las condiciones *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999; Majada *et al.*, 2000).



Fig. 13. Plantas aclimatizadas de *T. pseudopectinatus* después de 1 año

2. Evaluación de la variación genética

2a. Aislamiento de DNA y determinación de la concentración de DNA

A los brotes de los tratamientos que tuvieron el mayor potencial de regeneración, ANA/BAP 0.5/2 mg/l y 2,4-D/K 0/2 mg/l, así como del control y de 6 plantas adultas silvestres se les practicó el aislamiento del DNA genómico. El valor promedio de concentración de DNA obtenido para las muestras *in vitro* fue de 300 ng/ μ l, mientras que para las 6 plantas madre de los cultivos fue de 200 ng/ μ l (Tabla 23).

Tabla 23. Determinación de la concentración de DNA de 22 brotes regenerados *in vitro* y de 6 plantas adultas silvestres de *T. pseudopectinatus*

Brote	Concentración ng/ μ l Tratamiento control	Concentración ng/ μ l 0.5/2 mg/l ANA/BAP	Concentración ng/ μ l 0/2 mg/l 2,4-D/K	Concentración ng/ μ l plantas adultas silvestres
1	340	160	1185	165
2	300	90	25	130
3	300	300	200	430
4	190	115	100	200
5	605	60	20	85
6	75	100	250	202
7	215	260	90	
8	400	280	30	
9	245	165	75	
10	115	630	200	
11	350	110	50	
12	450	900	100	
13	220	1470	50	
14	225	390	25	
15	940	220	150	
16	300	400	85	
17	450	220	50	
18	270	225	85	
19	325	500	95	
20	235	370	1235	
21	275	1000	500	
22	275	475	500	

2b. Evaluación de la integridad del DNA

Al evaluar la integridad del DNA en los geles de agarosa se observó que en la mayoría de las muestras el DNA se resolvió en una banda más bien uniforme y se observó un bajo grado de barrido a lo largo del gel de agarosa (ver Apéndice G).

La concentración de DNA extraída de los regenerantes (300 ng/μl) (Tabla 23) concuerda con el promedio obtenido por De la Cruz *et al.* (1997) quienes extrajeron DNA de diversos géneros de cactáceas entre ellos *Turbinicarpus*, sin embargo no mencionan qué especies en particular, y aunque no emplearon el protocolo de Doyle y Doyle (1990) obtuvieron en promedio 303 ng/μl para este género.

Los resultados muestran que el método de Doyle y Doyle (1990) modificado, empleado para el aislamiento de DNA de *T. pseudopectinatus* permitió obtener muestras de DNA con la integridad necesaria para efectuar la reacción de RAPD-PCR.

El aislamiento de DNA de las plantas adultas silvestres produjo un rendimiento ligeramente menor (200 ng/μl), para efectuar la extracción fue necesario cortar un fragmento de tubérculo sin seccionar zonas parenquimáticas, ya que las cactáceas presentan mucílagos en su tejido que son una serie de polisacáridos que les permiten retener agua en condiciones climáticas desfavorables (Mondragon-Jacobo *et al.*, 2000), este mucílago se presenta en tejidos del clorénquima y en porciones adyacentes de parénquima que almacena agua. Debido a las características del tejido, se aislaron secciones que fueran lo más superficiales posible ya que en algunos ensayos previos la presencia de estos mucílagos provocaron que se formara un gel de consistencia tan viscosa que no permitió el manejo de la muestra al tratar de tomarla con la micropipeta, por lo que esas muestras fueron descartadas en vista de que Porebsky *et al.* (1997) reportaron que la elevada cantidad de azúcares pueden inhibir la acción de las enzimas que efectúan la amplificación en el PCR, por tanto, al seccionar el tejido solo se tomaron pequeñas fracciones de tubérculos que fueran lo más superficiales posibles de manera que permitió la extracción de DNA, aunque en un rendimiento menor que los brotes cultivados *in vitro*.

3c. Amplificación de DNA

Se tomaron 10 muestras de DNA del tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0 para efectuar la amplificación y se obtuvieron 151 bandas definidas para los 20 primers (Tabla 24). Los patrones amplificados mostraron fragmentos de entre 3 y 14 bandas con un rango de tamaños de entre los 650 a 3200 pb.

De acuerdo a los patrones obtenidos se seleccionaron los primers 10, 16, 8, 14, 7 y 19 para efectuar la amplificación de los tratamientos 2,4-D/K 0/2.0, el control (sin reguladores de crecimiento) y de las 6 plantas madres de los cultivos.

Tabla 24. Bandas obtenidas para 10 muestras de DNA con primers de la serie OPB (Operon Technologies, USA)

Primer	Número de bandas
OPB-01	5
OPB-02	3
OPB-03	3
OPB-04	7
OPB-05	8
OPB-06	7
OPB-07	11
OPB-08	12
OPB-09	8
OPB-10	14
OPB-11	8
OPB-12	4
OPB-13	5
OPB-14	7
OPB-15	8
OPB-16	6
OPB-17	12
OPB-18	8
OPB-19	6
OPB-20	9

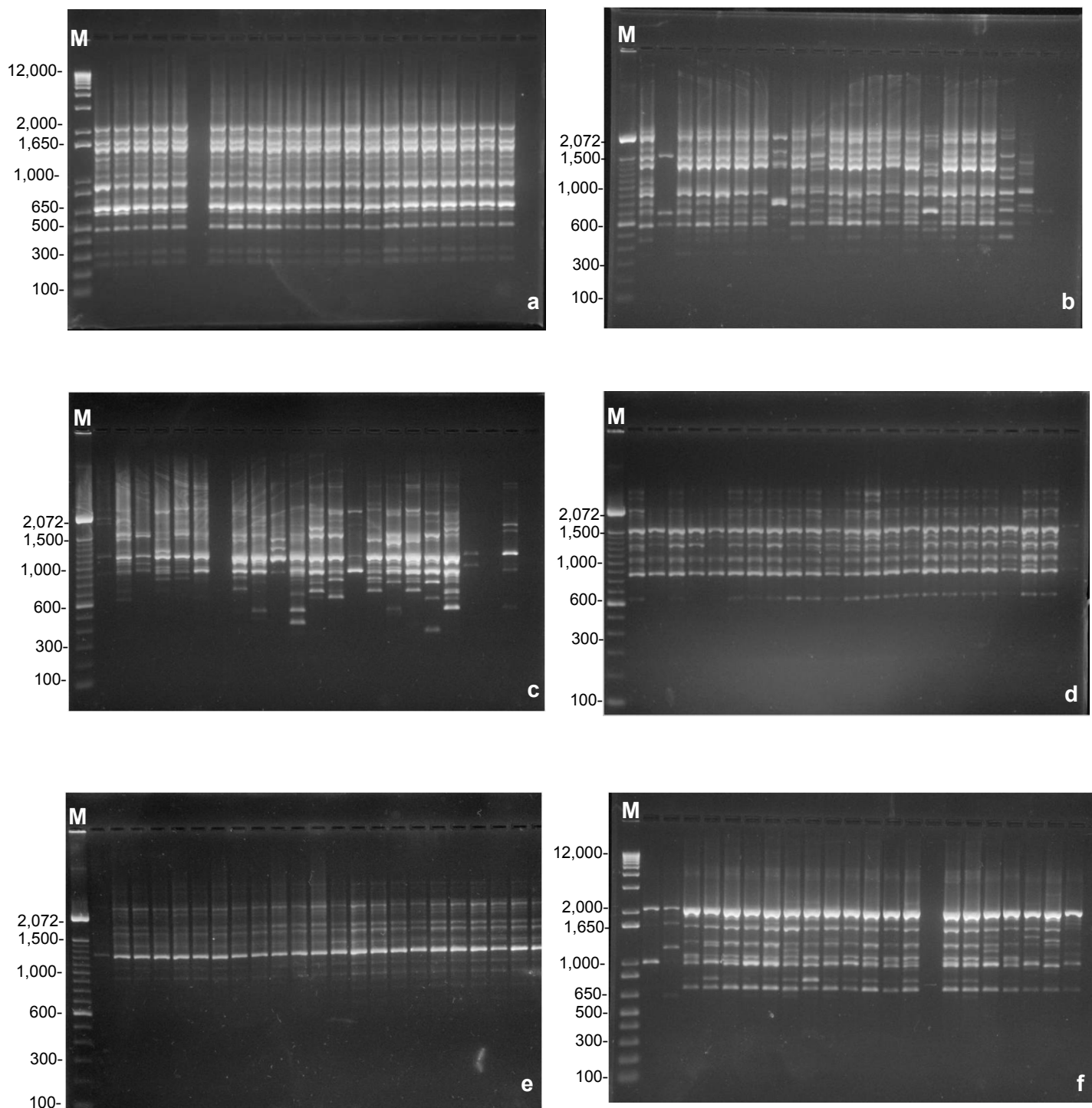


Fig. 14. Patrón de bandas de regenerantes de *T. pseudopectinatus* obtenidos del control; a) primer 10; b) primer 7; c) primer 14; d) primer 8; e) primer 16 y f) primer 19; se observa que los que presentaron mayor polimorfismo fueron el primer 7 y 14; M, Marcador de peso molecular (bp)

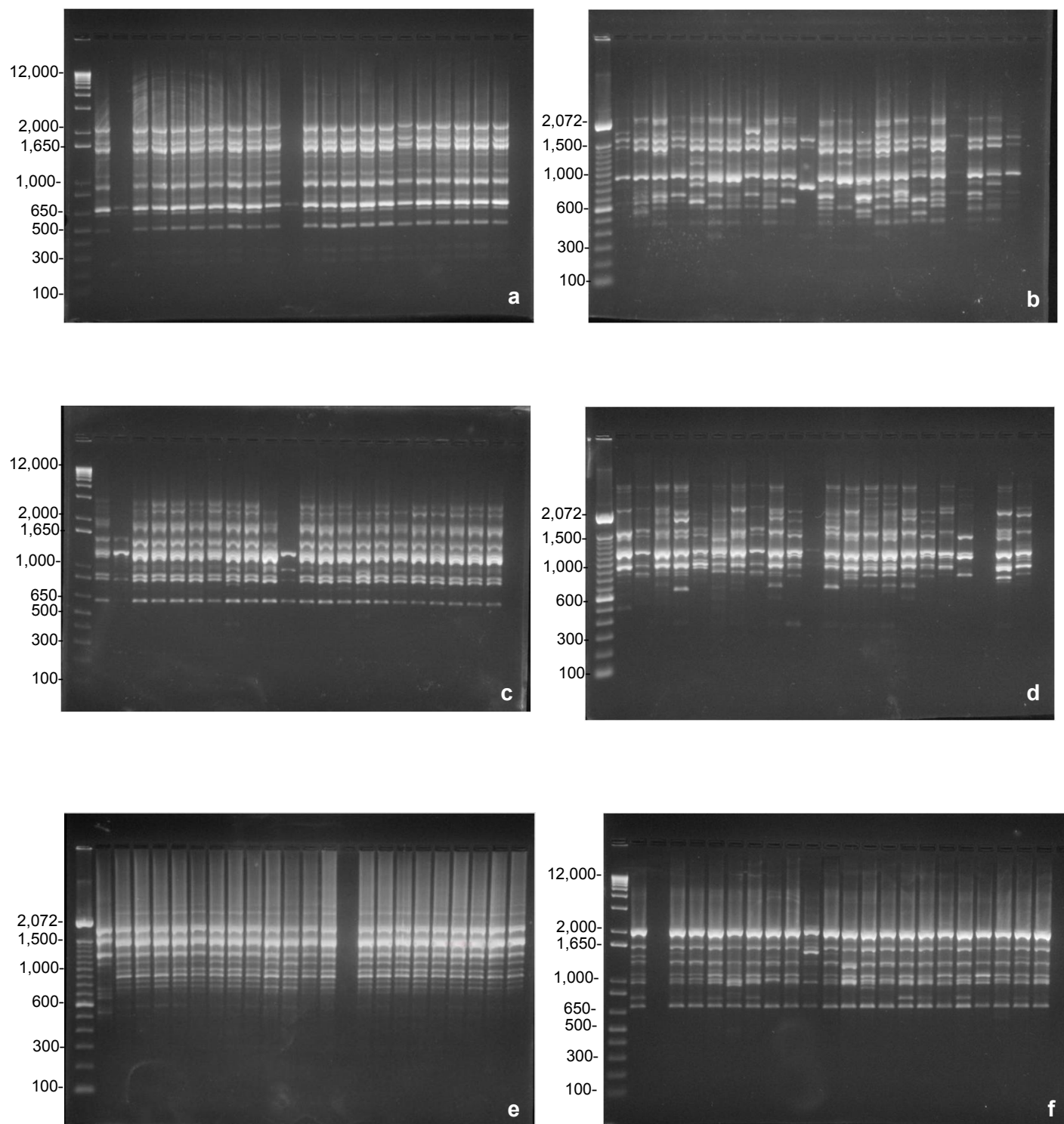


Fig. 15. Patrón de bandas de DNA de regenerantes de *T. pseudopectinatus* obtenidos con el tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0; a) primer 10; b) primer 7; c) primer 8; d) primer 14; e) primer 16 y f) primer 19; los primer 7 y 14 fueron los que mostraron mayor polimorfismo en este tratamiento que fue el que mostró mayor potencial de regeneración; M, Marcador de peso molecular (bp)

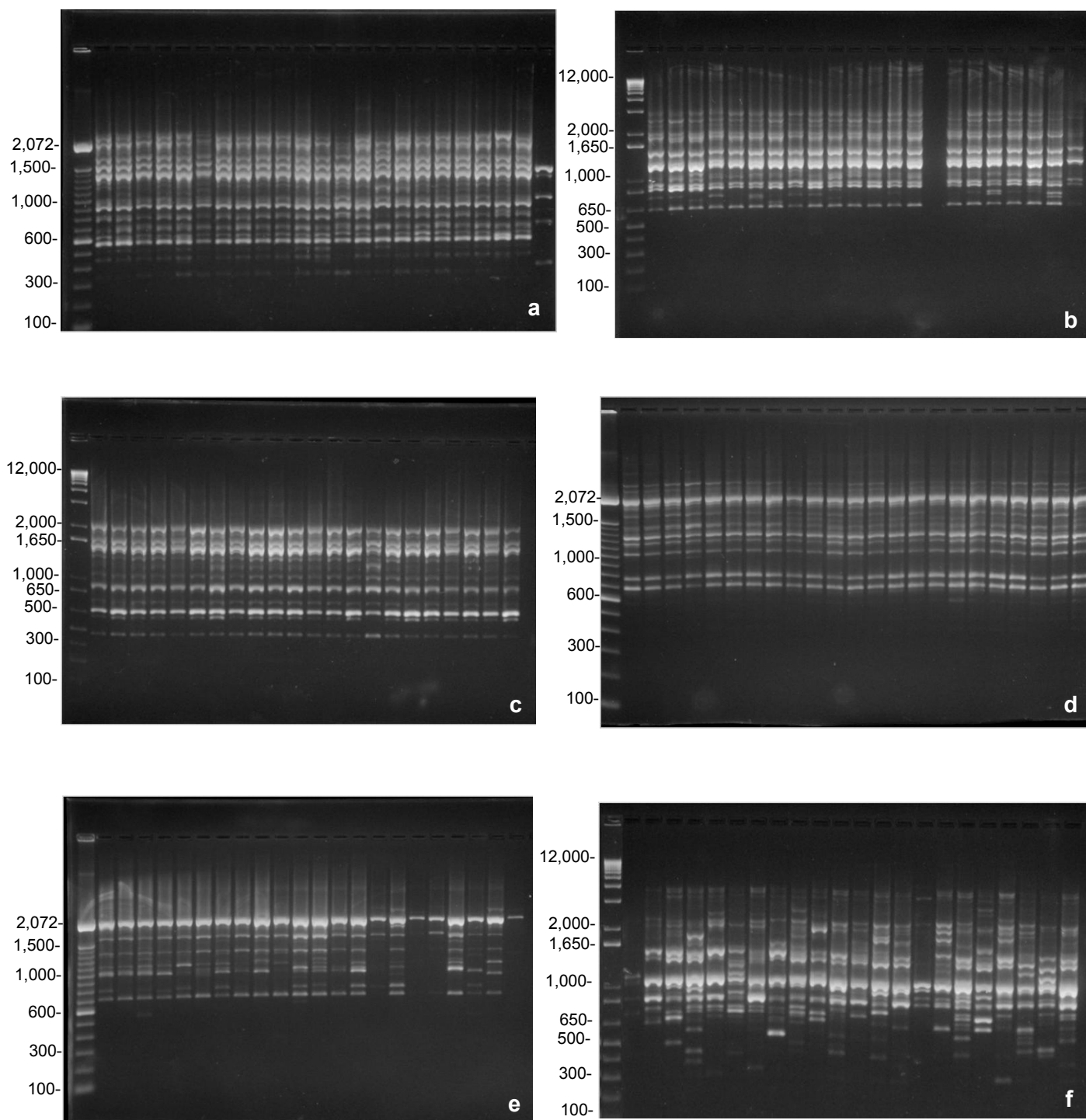


Fig. 16. Patrón de bandas de DNA de regenerantes de *T. pseudopectinatus* obtenidos con el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0; a) primer 7; b) primer 8; c) primer 10; d) primer 16; e) primer 19 y f) primer 14; en este tratamiento el primer 14 fue el que mostró mayor polimorfismo; M, Marcador de peso molecular (bp)

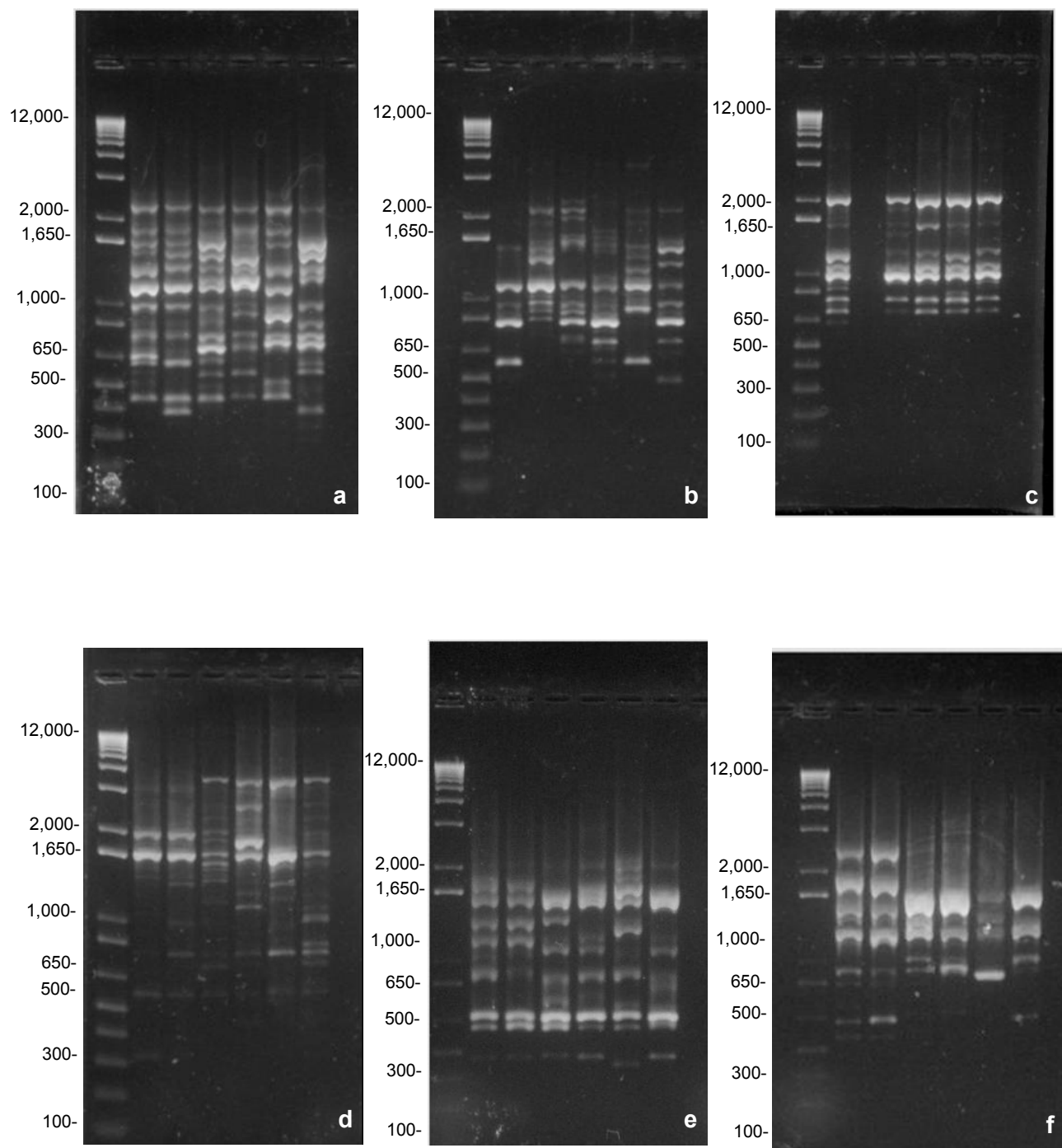


Fig. 17. Patrón de bandas de DNA de 6 plantas silvestres adultas de *T. pseudopectinatus* madre de los cultivos; a) primer 7; b) primer 14; c) primer 19; d) primer 16; e) primer 10; f) primer 8; donde es notable la variación con todos los primers; M, Marcador de peso molecular (bp)

Los índices de diversidad clonal se calcularon para cada tratamiento con un umbral de 3 aplicado con el programa GenoType y GenoDive

Tabla 25. Índices de variación clonal de los regenerantes obtenidos en el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0

Tratamiento 0/2.0 2,4-D/K	gen	eff	div	shw
Primer 7	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 10	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 14	8	3.03	0.7	0.67
Primer 16	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 8	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 19	1	1.0	0.00	-0.00

gen= número de genotipos encontrados en la población

eff= número efectivo de alelos

div= índice de diversidad genética de Nei (1973)

shw= índice de Shannon-Weaver

Tabla 26. Índices de variación clonal de los regenerantes obtenidos en el tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0

Tratamiento 0.5/2.0 ANA/BAP	gen	eff	div	shw
Primer 7	3	1.97	0.52	0.34
Primer 10	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 14	4	1.92	0.5	0.38
Primer 16	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 8	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 19	1	1.0	0.00	-0.00

gen= número de genotipos encontrados en la población

eff= número efectivo de alelos

div= índice de diversidad genética de Nei (1973)

shw= índice de Shannon-Weaver

Tabla 27. Índices de variación clonal de los regenerantes obtenidos en el control

Control 0/0	gen	eff	div	shw
Primer 7	3	1.20	0.18	0.16
Primer 10	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 14	2	1.10	0.09	0.08
Primer 16	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 8	1	1.0	0.00	-0.00
Primer 19	1	1.0	0.00	-0.00

gen= número de genotipos encontrados en la población

eff= número efectivo de alelos

div= índice de diversidad genética de Nei (1973)

shw= índice de Shannon-Weaver

Tabla 28. Índices de variación clonal de las plantas adultas silvestres

Plantas adultas silvestres	gen	eff	div	shw
Primer 7	5	4.5	0.93	0.68
Primer 10	2	1.80	0.53	0.28
Primer 14	4	3.60	0.87	0.58
Primer 16	5	4.50	0.93	0.68
Primer 8	2	1.80	0.53	0.28
Primer 19	1	1.0	0.00	-0.00

gen= número de genotipos encontrados en la población

eff= número efectivo de alelos

div= índice de diversidad genética de Nei (1973)

shw= índice de Shannon-Weaver

Los resultados muestran que los primers que tuvieron mayor número de fragmentos polimórficos fueron el 7 y 14, sin embargo fue el primer 14 el que tuvo la mayor capacidad para discriminar fragmentos polimórficos en los diferentes tratamientos. En todos los tratamientos se observaron diversos índices de variación desde 0.09 con el primer 14 del tratamiento control hasta 0.7 obtenido también con el primer 14 pero con el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0.

Con el primer 7 se detectaron 3 genotipos para los tratamientos ANA/BAP 0.5/2.0 y control; y con el primer 14 se obtuvieron 8 genotipos para el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0 y 4 genotipos para el tratamiento ANA/BAP 0.5/2.0, en general se obtuvieron índices de variación más altos con el tratamiento ANA/BAP (0.5 y 0.52) que fue el tratamiento en el que se obtuvo la mayor regeneración de brotes, no obstante en el tratamiento control donde no hubo una inducción de reguladores de crecimiento, se presentó muy poca cantidad de callo y donde los brotes en su mayoría fueron regenerados por organogénesis directa, los primers 7 y 14 fueron capaces de mostrar diversos grados de variación de 0.18 y 0.09.

El índice de variación más alto, 0.7 fue con el tratamiento 2,4-D/K 0/2.0 aunque esto solo se presentó para un solo primer (14). Mangolin *et al.*, (2002) emplearon primers de la serie OPB para callos de *Cereus peruvianus* mantenidos en diferentes concentraciones de 2,4-D y K y encontraron que el mayor índice de diversidad genética fue para los callos mantenidos con 4.0 mg/l de 2,4-D y 8.0 mg/l de K, en este trabajo el índice de diversidad genética más alto fue para el tratamiento con 2 mg/l de K sin 2,4-D.

Los primers 10, 16, 8 y 19 que para las plantas regeneradas presentaron patrones mas bien uniformes, para las 6 plantas adultas silvestres se observó un alto grado de variación entre ellas y en donde no solo se obtuvieron los índices de variación más altos con los primers 7 y 14 con (0.93 y 0.84) sino que también con el primer 16 se obtuvo un alto índice de variación con 0.93, mientras que en las plantas regeneradas este primer no mostró variación entre las plantas regeneradas

El alto grado de variación mostrado en los geles de las plantas adultas nos indica que la especie presenta una gran variabilidad lo cual permite que pueda sobrevivir en su ambiente natural lo cual se ve reforzado por el hecho de que las

plantas de *Turbinicarpus* no se auto-polinizan (Sotomayor, 1999) sino que para que se produzcan semillas es necesaria una fertilización entre dos individuos distintos, George (1993) señaló que las semillas de muchas especies producen plantas que difieren genéticamente y que por tanto dependiendo del objetivo de la propagación *in vitro* normalmente se emplea tejido somático (tallos, hojas, meristemos, etc) como fuente de explantes de manera que se puedan obtener individuos con una alta fidelidad genética. Por tanto, es necesario considerar que las plantas con las que se iniciaron los cultivos no provenían de tejido somático sino de la germinación de semillas, lo que indica las diferencias encontradas entre los tratamientos podría deberse a la variabilidad genética de los individuos a partir de la cual se obtuvo el material vegetal inicial.

Así mismo, la variación que se observó en los individuos silvestres pudo deberse a que posiblemente las plantas provenían de poblaciones diferentes, *T. pseudopectinatus* es una especie con poblaciones distribuidas en tres estados de la República Mexicana, sometida a diferentes condiciones biológicas y ambientales, y por tanto su supervivencia y habilidad para adaptarse a cambios climáticos depende de la existencia de variabilidad genética, esta variabilidad pudo ser reflejada en los regenerantes obtenidos mediante el cultivo *in vitro*, es decir que aunque se observó variación en las plantas regeneradas ésta pudo provenir desde el explante inicial; en el control donde no hubo inducción hormonal y en que la cantidad de callo fue muy escasa, se observó variación evidenciada con los mismos primers (7 y 14) que para los demás tratamientos, se plantea que aunque hubo variación en los cultivos no fue por efecto del cultivo *in vitro*, un resultado similar fue encontrado por Martín y Pérez (1994) donde observaron variación en los regenerantes de *Limonium estevei*, sin embargo consideraron que dicha variación en los regenerantes fue debida a la variabilidad genética de las semillas usadas como explante inicial. También sugirieron que debieron analizar las plantas de la población natural para determinar la variabilidad de las plantas silvestres y compararla con la de las plantas cultivadas *in vitro*, sin embargo consideran que esto a veces no es posible porque la especie puede estar en peligro de extinción y por tanto a veces no resulta factible conseguir material vegetal, no obstante que la técnica de RAPDs requiere de pequeñas cantidades de tejido para aislar el DNA.

Así mismo, señalaron que puede ocurrir un cambio en las etapas iniciales del cultivo *in vitro* por lo que todas las plantas resultarían uniformes debido a que serían alteradas en la misma forma, por esta razón es necesario identificar el material a partir del cual se iniciarán los cultivos, sin embargo este material a veces no es accesible o se tiene en muy poca cantidad como ocurrió con las semillas germinadas *in vitro* para *Limonium estevei* por lo que se plantea que los análisis se puede hacer en diferentes etapas del cultivo aunque nuevamente hay que considerar que si se hace en etapas muy tempranas el material requerido puede implicar una importante reducción de la cantidad del material micropropagado lo cual puede ser determinante si se trata de poblaciones amenazadas o en peligro de extinción.

Así mismo, las plantas de *T. pseudopectinatus* mantuvieron una anatomía normal, George (1993) señala que en diversas ocasiones, las plantas que son regeneradas via indirecta pueden ser muy anormales, en cuanto a la morfología, coloración de las flores, entre otros mientras que en los otros se observo estabilidad en las plantas, así mismo hay reportes en los que al propagar cactáceas *in vitro* se presenta el fenómeno de fasciación Papafoutiou *et al.*, 2001) sin embargo en todos los cultivos después de contabilizar el número de brotes no se observó que las plantas presentaran dicho fenómeno.

Smith (1998) resumió los factores que contribuyen a la variación en las plantas micropropagadas, las cuales pueden ser: 1) de tipo intrínseco, que en gran medida depende de la estabilidad genética del explante inicial o 2) de tipo extrínseco como los reguladores de crecimiento adicionados al medio nutritivo, los cuales son usados inducir y mantener una rápida división celular y favorecer una morfogénesis *in vitro*, el tipo y la concentración de estos reguladores pueden influir en la variación en las plantas regeneradas. Esto último se puede deber al alto índice de división celular que se mantiene, o al actuar directamente sobre el material genético de las células que forman los centros meristemáticos y que dan origen a los regenerantes (Karp, 1992). George (1993) mencionó que las auxinas son casi invariablemente añadidas al medio de cultivo para mantener un crecimiento y Lynch (1999) mencionó que el 2,4-D ha mostrado tener un efecto muy dañino a nivel genético a diferencia de otras auxinas, como el AIA o el IBA.

Hay diversos reportes de cactáceas que se encuentran en peligro de extinción y que han sido propagadas por cultivo de tejidos vegetales usando diferentes explantes, medios de cultivo y combinaciones de reguladores de crecimiento (Papafotiou *et al.*, 2001; Mata *et al.*, 2001; Sriskandorajah y Serek, 2004; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002) hasta donde se sabe solo existen escasos reportes sobre la detección de la variación genética de los regenerantes.

Algunos autores consideran que el conocimiento de la composición genética de las especies es esencial para cualquier plan de conservación. El estudio de la composición genética y por tanto de la diversidad de especies es importante para interpretar su biología reproductiva y su evolución. El conocimiento de la variabilidad genética es especialmente importante cuando la estrategia de conservación está enfocada en la conservación *ex situ* del material, que debería ser representativo de la variación genética en la población natural. Esto resulta aún más relevante si se considera una introducción o reintroducción del material biológico.

Hay pocos estudios acerca de la composición genética de las especies silvestres, y el número es aún menor cuando se consideran a las especies amenazadas o en peligro de extinción.

En las especies en las que el establecimiento de técnicas de cultivo *in vitro* forma parte de una estrategia de conservación, la evaluación de la diversidad genética del material vegetal inicial puede garantizar la representación de la diversidad de la población natural en la muestra. Al mismo tiempo puede ser usada como referencia para verificar la presencia de variación después de la micropropagación.

La biotecnología ha hecho contribuciones significativas para mejorar la conservación y uso de los recursos genéticos. El progreso en el cultivo *in vitro* ha ayudado a la conservación de especies que se encuentran en severo riesgo, sin embargo Krogstrup *et al.* (1992) señalaron que no hay métodos de regeneración y almacenamiento *in vitro* que se apliquen a todas las especies vegetales por lo que es necesario desarrollar continuamente nuevos protocolos para cada especie, lo

cual resulta trascendental si se encuentran amenazadas o en peligro de extinción.

Desafortunadamente en nuestro país los recursos genéticos se encuentran severamente afectados por múltiples problemas. La solución no es fácil pero es posible atenuar el impacto de los mismos a través de proyectos de desarrollo sustentable, sin embargo, el mejor conocimiento de los recursos facilitará la búsqueda de alternativas para un manejo óptimo de los mismos lo cual conlleva directamente a su conservación.

El cultivo de tejidos integrado a la valoración genética de las plantas regeneradas resulta un poderosa elemento biotecnológico para el estudio, conservación y el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales de México y del planeta.

CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos se logró la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus*.

Las respuestas de los explantes cultivados después de 3 meses de cultivo fueron: 1) la formación de callo y 2) respuestas morfogénicas vía organogénesis directa e indirecta.

Aunque no hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de callo, los explantes apicales generaron menos cantidad que los basales, y la mayor cantidad de callo (2.51 g en promedio) se originó con la combinación de 2,4-D/K, después de 4 meses de cultivo.

No hubo diferencias en cuanto a la cantidad de callo producido en explantes basales, cultivados con dos concentraciones de sacarosa 15 y 30 g/l, con la combinación ANA/BAP (2.0 g y 1.8 g promedio), y para la combinación 2,4-D/K (2.4 g y 2.3 g promedio), después de 8 meses de cultivo.

Bajo las condiciones experimentales ensayadas hubo diferencias en el potencial de regeneración en cuanto al tipo de explante inicial empleado, ya que fueron los explantes basales los que generaron mayor cantidad de brotes (3.0) que los apicales (2.0), después de 4 meses de cultivo.

Los explantes apicales regeneraron brotes, pero también raíces lo cual puede indicar un fuerte compromiso de los ápices para continuar como individuo y restablecer sus funciones.

La formación de brotes vía organogénesis directa se produjo desde el medio de inducción y su crecimiento se vio favorecido en medio MS sin reguladores de crecimiento.

No hubo diferencias en cuanto a la cantidad de brotes producido en explantes basales, cultivados con dos concentraciones de sacarosa 15 y 30 g/l, después de 7 meses de cultivo.

Hubo diferencias en cuanto a la vía de regeneración de los brotes, en medio MS 50%, sacarosa 30g/l con ANA/BAP y 2,4-D/K se produjeron 0.3 brotes por explante vía directa y 0.48 vía indirecta; en medio MS 50%, sacarosa 15 g/l con ANA/BAP y 2,4-D/K, se obtuvieron 0.46 brotes vía directa y 0.2 brotes vía indirecta.

En los controles fue posible obtener regenerantes a partir de los explantes, sin embargo fueron los tratamientos que indujeron el menor número de brotes por explante, ($\bar{X}= 0.5$), después de 7 meses de cultivo.

Aunque la organogénesis se produjo en todos los tratamientos, el mayor número de regenerantes estuvo relacionado con altas concentraciones de citocininas y bajas concentraciones o ausencia de auxinas.

Los tratamientos con mayor número de brotes fueron: ANA/BAP (0.5/2.0 y 0/3.0 mg/l) con 262 y 207 respectivamente y 2,4-D/K (0/2.0 mg/l) con 193 brotes, después de 7 meses de cultivo.

Se demostró el gran potencial de regeneración de explantes de *T. pseudopectinatus* en cultivo, expresado como regeneración de 2565 brotes (vía directa e indirecta) después de 7 meses de cultivo.

Para las plantas aclimatizadas bajo condiciones de invernadero, se obtuvo un porcentaje de supervivencia de aproximadamente 60%, después de 1 año.

El método de extracción de DNA utilizado resultó efectivo para la amplificación por RAPDs.

Los resultados obtenidos, demostraron que la técnica de RAPDs fue efectiva en la evaluación de la fidelidad genética de los regenerantes obtenidos por cultivo de tejidos.

Los primers 7 y 14 fueron los que mostraron mayor número de fragmentos polimórficos.

Se encontraron altos índices de variación en las plantas silvestres adultas, desde 0.28 con el primer 10 hasta 0.68 con el primer 16, no obstante que este último primer no reveló diferencias entre las plantas regeneradas.

La variación genética encontrada en las plantas regeneradas de los diferentes tratamientos, podría deberse a la variabilidad genética del explante inicial (semillas) partir del cual se iniciaron los cultivos *in vitro*, por tanto se propone que la variación en los cultivos no fue debida al proceso de regeneración.

La técnica de marcadores moleculares RAPDs resultó útil para el estudio y estimación de la variación genética del material vegetal propagado *in vitro* de *T. pseudopectinatus*.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer una metodología para una propagación masiva de *T. pseudopectinatus* que permitiría satisfacer por un lado la demanda comercial y así disminuir la presión de colecta sobre las poblaciones naturales y por otro lado, este procedimiento puede ser aplicado tanto a otras especies del género que se encuentra bajo un estatus crítico como a otras especies de cactáceas.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., H. Godínez-Álvarez, U. Guzmán y P. Dávila. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas amenazadas: implicaciones para su conservación. Boletín de la Sociedad Botánica de México 75:7-16
- Al-Zahim, M., B. Ford-Lloyd and H. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Reports 18:473-477
- Anderson, E.F. 2001. The cactus family. Timber Press. USA
- Anderson, F., S. Arias and Taylor, N. P. 1994. Threatened Cacti of Mexico. Vol. II Royal Botanic Gardens, Kew United Kingdom
- Arnold, M. L., C. M. Bucher y J. Robinson. 1991. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana trees. Proceedings of the National Academy of Science. 88:1398-1402
- Arnold-Schmitt, B., L. Girao, R. Llamoca-Zárate y F. Campos. 2001. Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and Efficient Micromethod. Journal of the Association for the Cactus Development. 57-65
- Arias, S. 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 44:109-115 pp.
- Arias, S. 1997. Distribución, grupos taxonómicos y formas de vida. En: Suculentas Mexicanas, cactáceas. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-Semarnap, México.
- Ault, J. R. y W. J. Blackmon. 1987. In vitro propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience 22(1):126-127
- Bárcenas, R. T. 2003. Parte II: Los cactus del Desierto Chihuahuense en México: Una evaluación del comercio, la administración y las prioridades de conservación. En: Robbins, C (Ed.). 2003. Comercio Espinoso Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense
- Bárcenas, R. 2003. Chihuahuan Desert Cacti in Mexico: An Assessment of Trade, Management and Conservation Priorities Part II. http://www.worldwilde.org/speciesattachments/cactus_report_part2_pdf
- Barthlott, W. 1979. Cacti. En: Rodríguez-Garay y A. Rubluo. 1992. In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). Cactus & Succulent Journal. 64(3):116-199
- Benson, E.1999. Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis Padstow. United Kingdom

- Bonnes, M. S., P. W. Pare y T. J. Mabry. (1993). Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cactus & Succulent Journal*. 65(3):144-147.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez Mejorada. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1 Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Vol. 3 Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México. México
- Caetano, G. 1995. DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. University of Tennessee. Wiley –Vch
- Carvalho, L., L. Goulao, C. Oliveira, J. Gonçalves y S. Amancio. 2004. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:23-27
- Casas, A. 2002. Uso y Manejo de Cactáceas Columnares mesoamericanas. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 40:18-22
- Chávez, V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias (Biología)-UNAM, Facultad de Ciencias
- Chen, W., T. Chen, Y. Fu, R. Hsieh y S. Chen. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalenopsis*. *Plant Cell Reports* 18:7-13
- CITES. 1990. Convention on International trade of Endangered Species. Apendices I, II and III to the convention. US Fish and Wildlife Service, Washington, D. C.
- Clayton, P. W., J.F. Hubstenberger y G.C. Phillips. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *Journal of American Society of Horticultural Science* 115:337-343.
- Cloutier, S. y B. Landry. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 30:32-39
- Dabekausen, M.; R. Pierik, J. Van der Laken y J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rauh. *Scientia Horticulturae* 46:283-294

- Damiano, C., P. Curir y T. Cosmit. 1987. Short note on the effects of sugar on the growth of *Eucalyptus gunnii in vitro*. *Acta Horticulturae* 212:553-556
- Dávila-Figueroa, C., M. de la Rosa-Carrillo, E. Perez-Molphe. 2005. In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus (Cactaceae)*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:540-545
- De la Cruz, M., F. Ramírez, y H. Hernández. 1997. DNA Isolation and amplification from cacti. *Molecular Biology Reporter* 4:319-325
- Desjardins, Y. 1995. Photosynthesis *in vitro*, on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulturae* 393:45-61
- Dirzo, R. 1990. La biodiversidad como crisis ecológica actual, ¿qué sabemos? *Ciencias* 4. UNAM. México.
- Doyle J. y J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Ehrlich, A.H. y P.R. Ehrlich. 1992. Causes and consequences of the disappearance of biodiversity. En Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. CONABIO. México.
- Fay, M.F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Feuser, S. y K. Meler. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 72:221-227
- Flores, O. y P. Geréz. 1995. Capítulo 6: Conservación. En: CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Flores, A., J. Cuevas y G. Manzanero. 2000. Pruebas de germinación y sobrevivencia de plántulas de *Ferocactus recurvus* (Miller) Lindsay. *Amaranto*. 13(3):3-11
- Fuentes, J. L., F. Escobar, A. Álvarez, G. Gallego, M. Duque, M. Ferrer, J. Deus y J. Tohme. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 109:107-115
- George, E. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology*. Exergetics Limited. United Kingdom
- Glass, C. 1997. Illegal collecting in Mexico. *Cactus & Succulent Journal* 69:106–107

- Glass, C. 1998. Guide to the identification of threatened cacti of México. Ediciones Cante. México
- Gibson, A. y P. Nobel. 1986. The cactus primer. Harvard University Press. Cambridge. USA
- Gil, K., M. González, O. Martínez de la Vega, J. Simpson y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341
- Giusti, P. D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. M. Tucci. 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95:319-322
- Goto, S., R. Thakur y K. Ishii. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. *Plant Cell Reports* 18:193-197
- Grattapaglia, D. y M. Elias. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. EMBRAPA-CENARGEN. Brasil
- Haisel, D., J. Pospíšilová, H. Synková, J. Čatský, N. Wilhelmová y Š. Plzánková. 1999. Photosynthetic pigments and gas exchange of *in vitro* grown tobacco plants as affected by CO₂ supply. *Biologia Plantarum* 42 (3): 463-468
- Hammatt N (1993) Micropropagation of fastigiate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves. *Journal of Horticultural Science*. 68: 975–981
- Hanson, J. y A. Trewavas. 1982. Regulation of plant cell growth: the changing perspective. *New Phytologist* 90:1-18
- Hashmi G, R. Huettel, R. Meyor, L. Krusberg y F. Hammerschlag. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports* 16: 624 – 627
- Henrickson, J. y R. Straw. A gazetteer of the Chihuahuan Desert Region. A supplement to the Chihuahuan Desert flora. En: Sotomayor, J.; A. Arredondo; F. R. Sánchez and M. Martinez. 2004. The genus *Turbinicarpus* in San Luis Potosí. Cactus & Co. USA.
- Henry, R. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall. United Kingdom
- Hernández, H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26:33-52

- Hernández, H., C. Gómez-Hinostrosa y B. Goettsch. 2004. Cactáceas. En: A.J. García, M. J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México
- Hernández, H. y C. Gómez-Hinostrosa. 2005. Cactus Diversity and Endemism in the Chihuahuan Desert Region. En: Cartron, J.; G. Ceballos and R. Stephen (Ed.). Biodiversity, Ecosystem and Conservation in Northern Mexico. Oxford University Press. USA
- Hossain, M., K. Konisho, M. Minami y K. Nemoto. 2003. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* 130:233-239
- Hubstenberger, J.F., P. W. Clayton y G.C. Phillips. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). pp 49-58. En: Y.P.S. Bajaj. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 20 High-Tech and Micropropagation. IV. Springer-Verlag.USA
- Hunt. 1992. Cactaceae. In Hutchinson GE. Genera of flowering plants. vol II. Oxford University Press. United Kingdom
- Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31:155-159
- Jiang, C. y K. Sink. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in Asparagus. *Euphytica* 94:329-333
- Jobin-Décor, M., G. Graham, R. Henry y R. Drew. 1997. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 44:471-477
- Johnson J. y E. Emino. 1979. Tissue Culture in the Cactaceae. *Cactus & Succulent Journal*. 29:102-104
- Jordan, P.W. y P. Nobel. 1981. Seedling establishment of *Ferocactus acanthodes* in relation to drought. En: Amaranto. 2000. Pruebas de germinación y sobrevivencia de plántulas de *Ferocactus recurvus* (Miller) Lindsay 13(3): 3-11
- Juárez-Muñoz, J., G. Carrillo, R. Arreguín y A. Rubluo. 2002. Inter- and Intra variation of four wild population of *Prosopis* using rapd-pcr fingerprints. *Biodiversity and Conservation* 11:921-930
- Juárez, M. y C. Passera. 2002. In vitro propagation of *Opuntia ellisana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell* 26(3): 319-324

- Karp, A. 1992. The role of growth regulators in somaclonal variation. En: Benson, E.1999. Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis Padstow United Kingdom
- Kazan, K., J. Mammers y D. Cameron. 1993. Genetic variation in agronomically important species of *Stilosathes* determined using RAPDs markers. Theoretical and Applied Genetics 85:882-888
- Krogstrup, P., S. Baldursson y J. Norgaard. 1992. *Ex situ* genetic conservation by use of tissue culture. Opera Botánica: 113:49-53
- Kolar, Z. y J. Bartek. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* through tissue cultures. Experientia. 32:668-669
- Llamoca-Zárate, R., C. Studart-Guimaraes, J. Landsmann y F. Campos. 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58:155-157
- Lefebvre, V., B. Goffinet, J. Chauvet, B. Caromel y P. Signolet. 2001 Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD an phenotypic data. Theoretical and Applied Genetics 102: 741-750
- Lynch, P. 1999. Tissue Culture Techniques in *In Vitro* Plant Conservation. En: Benson, E.1999. Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis Padstow, United Kingdom
- Majada, J.P., F. Tadeo, M.A. Fal y R. Sánchez-Tamés. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 207–214
- Malda G., R. Backhaus y C. Martin. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58:1–9
- Mandal, N. y P. Das. 2002. Intra- and Interspecific Genetic Diversity in Grain Amaranthus Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Plant Tissue Culture. 12(1): 49-56
- Mangolin, C. L. Ottoboni y M. Machado. 2002. RAPD Markers to Evaluate Callus Tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) Maintained in Different Growth Regulators Combinations. Biochemical Genetics 40 (9/10): 351-358

- Martín, C. y C. Pérez. 1994. The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the Spanish endemism, *Limonium esteveí*. *Phyton*. 56:65-72
- Martínez-Vazquez, O. y A. Rubluo. 1989. In vitro mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science*. 64(1):99-105.
- Mata, R., M. Monroy de la Rosa y V. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology –Plant* 37:400-404
- Mauseth, J. 1979. A new method for the propagation of Cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus & Succulent Journal* 51:186-187.
- Mauseth, J. 1983a. Introduction to cactus anatomy. Part 2. Apical meristems. *Cactus & Succulent Journal* 55(42): 18-21.
- Mauseth, J. 1983b. Introduction to cactus anatomy. Part 3. Cell structure. *Cactus & Succulent Journal* 55: 84-89.
- Mauseth, J. 1984a. Introduction to cactus anatomy. Part 7. Epiderms. *Cactus & Succulent Journal* 56: 33-37.
- Mauseth, J. 1984b. Introduction to cactus anatomy. Part 8. Inner body *Cactus & Succulent Journal* 56: 131-135.
- Mauseth, J. y W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 62:869-877
- Minocha, S. y P. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations of callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller. *American Journal of Botany* 61:168-173
- Mondragon-Jacobo C., N. Doudareva y B. Bordelon. 2000. DNA Extraction from Several Cacti. *HortScience* 35(6):1124-1126
- Moebius-Goldammer, K. Mata, M. y Víctor M. Chávez. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactaceae), an endangered and Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39:388-393
- Munthali MT, J. Newbury y B.V. Ford-Lloyd. 1996. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Reports* 15:474–478
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. En: Karp, A.; P. Isaac y D. Ingram (Eds). Molecular Tools for Screening Biodiversity. Plants and Animals. Kluwer Academic Publishers. USA
- Neyra, L. y L. Durand. 1998. Capítulo 3: Biodiversidad. En: CONABIO. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Nkongolo, K. 1999. RAPD and cytological analyses of *Picea* spp. from different provenances: genomic relationships among taxa. *Hereditas* 130:137-144
- Nowak, B., K. Miczynski y L. Hudy. 2004. Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of „Wegierka Zwykła” plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 255–260
- Olguin, L.P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* (Cactaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF
- Oldfield, S. 1997. Cactus and succulent plants-status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. Gland and Cambridge: IUCN.
- Olmos, S., G. Lavia, M. di Renzo, L. M. Roginski y V. Echenique. 2002. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* (38) 6:617-622
- Palombi, M. y C. Damiano. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* 20:1061-1066
- Papafotiou, M., G. Balotis, P. Louka y J. Chronopoluos. 2001. *In vitro* regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:163-167
- Pelah, D., R. A. Kaushik, Y. Mizrahi y Y. Sitrit. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71:81-84
- Peña, A., L. Durand y C. Álvarez. Capítulo 6: Conservación. En: CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Pérez, E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34:134-135

- Pérez-Molphe, E. y C. Dávila-Figueroa. 2002. In Vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Wendermann (Cactaceae). In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 38:73-78
- Phillips, R., S. Kaeppler y P. Olhoff. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. Proceedings of the National Academy of Science. 91:5222-5226
- Porebski, S., G. Bailey y R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. En: De la Cruz, M., F. Ramírez, y H. Hernández. 1997. DNA Isolation and amplification from cacti. Molecular Biology Reporter. 4: 319-325.
- Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzáková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum 42 (4): 481-497.
- Premoli, A. C. 1998. Use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas for more widespread species. pp. 157-171. International Foundation for Science (IFS). Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management, Proceedings of an IFS Workshop.
- Raimondi, J., R. Williams y E. Camadro. 2001. Assessment of somaclonal variation in *Asparagus* by RAPD fingerprint and cytogenetic analyses. Scientia Horticulturae 90:19-29
- Rao, N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology. 3(2): 136-145
- Reyes, J. y T. Terrazas. 1991. Cactáceas raras, amenazadas y en peligro de extinción de las colecciones del Jardín Botánico, IB-UNAM. Amaranto 4:7-10.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri*. Cactus & Succulent Journal 64:116-119
- Rojas-Aréchiga M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus and seed germination: a review. Journal of Arid Environments. 44:85-104
- Rubluo, A. 1990. Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de especies en peligro de extinción. BIOTAM. 1(4)

- Rubluo, A. V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation*. 63:163-169
- Rubluo, A., J. Reyes, B. Rodríguez-Garay y E. Pimienta-Barrios. 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en cactáceas para zonas áridas. En: *Técnicas Convencionales y Biotecnológicas para la Propagación de de Plantas de Zonas Áridas*. Vol. 19 J. Izquierdo, G. Palomino (eds.) FAO/PNUMA. Chile
- Rzedowski, J. 1983, *Vegetación de México*. Limusa. México
- Rzedowski, J. 1992. Diversidad del universo vegetal de México: perspectivas de un conocimiento sólido. En: Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). *México ante los retos de la biodiversidad*. CONABIO. México.
- Rzedowski, J. 1998. Diversidad y Orígenes de la Flora Fanerogámica de México. En: *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM. México
- Salvi, N. y L. George. 2001. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 66:113-119
- Sánchez-Martínez, E. y M. Hernández. 2002. Propagation of Mexican cacti threatened with extinction. *Cactus & Succulent Journal*. 74(3)
- Santos-Díaz, M., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. Santos-Díaz. 2003. In vitro organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39:480-484
- Santos-Díaz M., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. Santos-Díaz. 2003. Clonal propagation of *Turbincarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction. *Bradleya* 21:7-12
- Santos-Díaz, M. 2005. Micropropagacion de *Ferocactus glaucescens* Britton et Rose, cactácea mexicana con valor ornamental. *Bradleya* 2(3)
- Scheepers, D., M. Eloy y M. Briquet. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theoretical and Applied Genetics* 94:480-485
- Semarnat, 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*, Marzo 6, 2002

- Smith, M. K. 1998. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated banana fruits. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 43:219-223
- Smith, R. H., P. Burdick, J. Anthony y A. Reilley. 1991. In vitro propagation of *Coryphanta macromeris*. *HortScience* 26(3):315
- Starha, R. y A. Chybidziurová. 1999. Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 27 839-841
- Sotomayor, M. 1999. Problemas de supervivencia de las especies de la Familia Cactaceae del estado de San Luis Potosí. *Circular Guanabios* 1(11):40.
- Sotomayor, J., A. Arredondo, F. R. Sánchez y M. Martínez. 2004. The genus *Turbinicarpus* in San Luis Potosí. *Cactus & Co. USA*.
- Sriskandorajah, S. y M. Serek. 2004. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. *Plant Cell, Tissue and organ Culture* 78: 75-81
- Starling, R. J. y J. H. Dodds. (1983). Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1:84-90
- Stuppy, W y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, USA
- Tel-Zur, N., S. Abbo, D. Bar-Zvi y Y. Mizrahi. 2004. Clone identification and genetic relationship among vine cacti from the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 100:279-289
- Torres-Muñoz, L. y B. Rodríguez-Garay. 1996. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg). *Journal of the Association for the Cactus Development*. 1: 36-38
- Varshney, A., M. Lakshmikumar, P. y V. Dhawan. 2001. Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 37:227-231
- Valadez-Moctezuma y E., Kahl. G. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana* 24(1):103-120

- Vega, K. M. González, O. Martínez de la Vega, J. Simpson y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilaza* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341
- Watanabe, A., S. Araki, S. Kobari, H. Sudo, T. Tsuchida, T. Uno, N. Kosaka, K. Shimomura, M. Yamazaki y K. Saito. 1998. In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. *Plant Cell Reports* 18:187-192
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolf y W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. USA
- Williams, J.K.G., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski y S.V. Tingey, 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704–740.
- Wilkie, S. E., P. Isaac y R. J. Slater. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theoretical and Applied Genetics* 86:497-504
- Winter, P. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*.11: 438-448
- WCMC, 1992. Global Biodiversity. Status o the Earth's Living Resources. Chapman and Hall. United Kingdom.

APÉNDICES

A. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Macronutrientes	g/l	g/10 litros
KNO ₃	1.90	19
(NH ₄) NO ₃	1.65	16.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.37	3.7
KH ₂ PO ₄ monobásico	0.17	1.7
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.44	4.4
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	0.0062	0.062
MnSO ₄ .H ₂ O	0.01689	0.1689
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0086	0.086
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.00025	0.0025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.000025	0.00025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.000025	0.00025
KI	0.00083	0.0083
Solución quelante		
Fe SO ₄ . 7H ₂ O	0.0373	0.373
Na ₂ EDTA	0.0278	0.278
Vitaminas		
Piridoxina-HCL	0.0005	0.005
Tiamina-HCL	0.0001	0.001
Ac. Nicotínico	0.0005	0.005
myo- Inositol	0.10	1.0
Glicina	0.002	0.02
Sacarosa	30	-
Agar bacto	9	-

Se prepararon las soluciones stock por separado para evitar que se precipitaran y se adicionaron una a una, el volumen dependió de la cantidad de medio de cultivo que se preparó. El pH se ajustó a 5.7 con soluciones de NaOH y HCl 0.1 0.5 y 1 N

B. Preparación de stocks de reguladores de crecimiento

Tanto las auxinas, 2,4-D y ANA, como las citocininas, BAP y K, fueron de la marca Sigma y para su preparación se pesaron 10 mg del regulador de crecimiento y se disolvieron en 2 ml de una solución 1 N de NaOH para el ANA, BAP y K y de etanol 50% v/v para el 2,4-D y finalmente se aforaron a un volumen de 10 ml de agua destilada.

C. Preparación de los primers

Los primers liofilizados Qiagen Operon Technologies se prepararon a una concentración de 50 pmoles/ μ l para lo cual se disolvieron en agua destilada estéril. La cantidad de picomoles obtenida dependió del peso molecular del primer.

Código	pmoles	μ l de agua destilada estéril añadida
OPB-01	6364	127.28
OPB-02	5656	113.12
OPB-03	6314	126.28
OPB-04	4894	97.88
OPB-05	6475	129.5
OPB-06	6475	129.5
OPB-07	4959	99.18
OPB-08	5379	107.58
OPB-09	5267	105.34
OPB-10	5495	109.9
OPB-11	5302	106.04
OPB-12	5533	110.66
OPB-13	6282	136.44
OPB-14	6161	123.22
OPB-15	4990	99.8
OPB-16	5656	113.12
OPB-17	4387	87.74
OPB-18	5194	103.88
OPB-19	5267	105.34
OPB-20	5533	110.66

D. Preparación de buffer CTAB

50 mM tris-HCl pH=8

Se pesaron 0.6057g tris base (PM= 121.14) y se disolvieron en 80 ml de agua destilada, posteriormente se agregaron 0.05 ml de HCl concentrado

Se añadieron 4.09 g de cloruro de sodio (0.7M) y 0.372 de EDTA (10 mM) y finalmente se aforaron a 100 ml.

E. Preparación de buffer TBE 10X

Pesar:

108 g de TRIS

55g de ácido bórico

40 ml de solución 0.5 M EDTA* pH=8

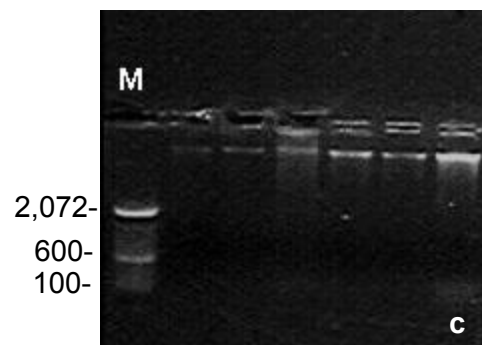
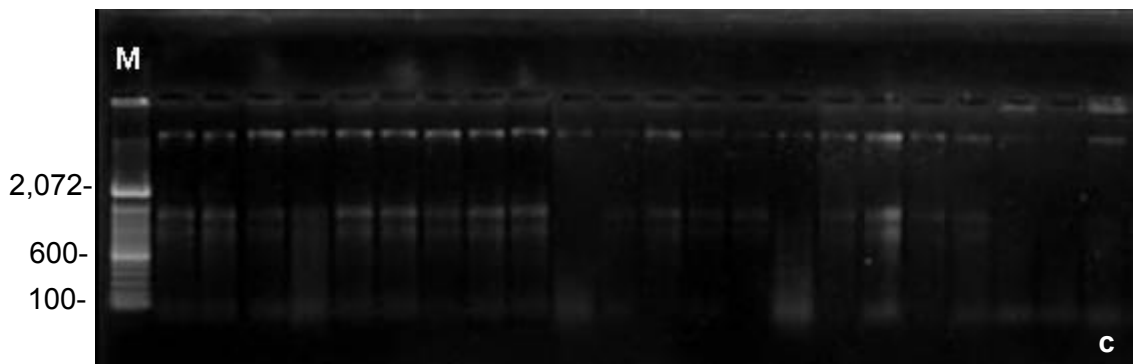
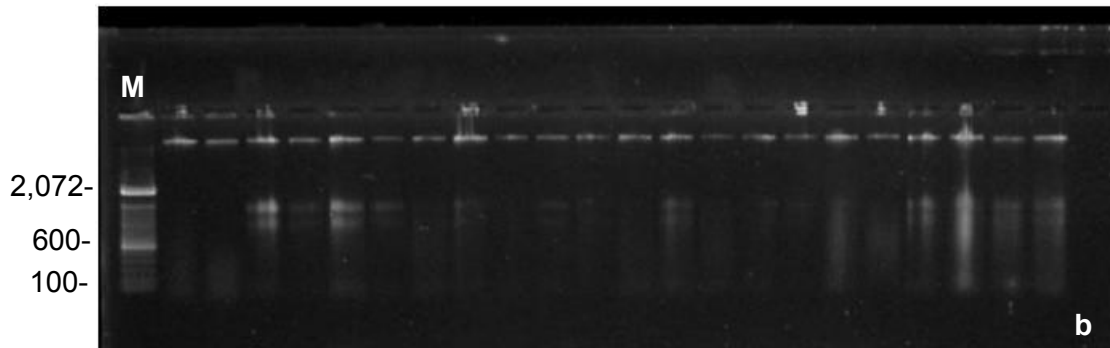
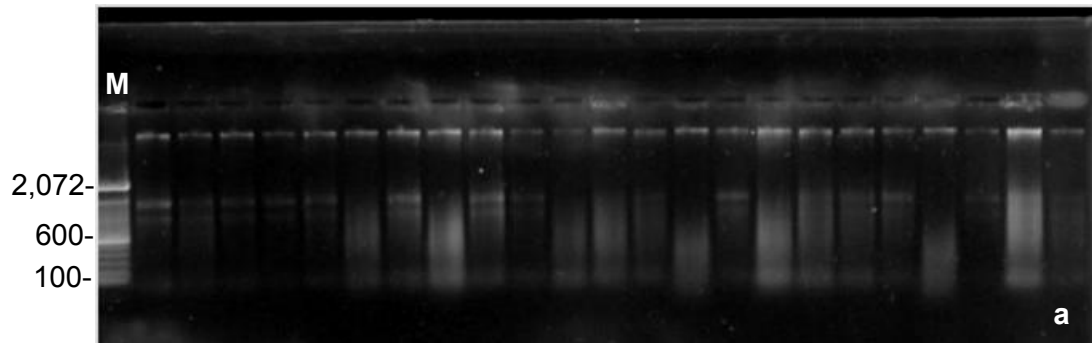
Aforar a un litro

* Para elaborar 100 ml de solución de EDTA (PM= 380.2) 0.5M pH=8 se pesaron 190.1 g de EDTA y se disolvieron en 100 ml de agua destilada, el pH se ajustó con ácido clorhídrico y con hidróxido de sodio.

F. Elaboración de los geles de agarosa

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad se agregaron 1.82 g de agarosa (BIORAD) y 130 ml de buffer TBE 1X. La agarosa se fundió en un horno de microondas durante 1.20 min aproximadamente y se dejó enfriar a una temperatura de 40-50 °C. Posteriormente se añadieron 2 gotas de bromuro de etidio al gel y finalmente se vertió en la cámara de electroforesis la cual previamente se preparó (se sellaron los extremos mediante *parafilm* y se colocó el peine), para formar el molde que constituyó el gel.

G. Evaluación de la integridad del DNA



DNA extraído de los brotes regenerados *in vitro* de los tratamientos: a) ANA/BAP 0.5/2.0; b) 2,4-D/K 0/2.0, c) control y d) de las plantas adultas silvestres de *T. pseudopectinatus*. M; marcador de peso molecular (bp).