



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ORIGEN Y DESARROLLO DE LOS BROTES
REGENERADOS *in vitro* de *Mammillaria*
coahuilensis (BOED.) MORAN (CACTACEAE),
ESPECIE AMENAZADA DEL ESTADO DE
COAHUILA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

AMELIA LÓPEZ HERRERA

TUTORA: ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
López
Herrera
Amelia
26 42 04 22
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302207118
2. Datos del tutor
Dra.
Ana Laura
López
Escamilla
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Helia Reyna
Osuna
Fernández
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Clara
Esquivel
Huesca
6. Datos del sinodal 4
Biól.
Laura Patricia
Olguín
Santos
7. Datos del trabajo escrito
Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie Amenazada del estado de Coahuila
67 p
2009

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller titulado “Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas”.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- ✿ A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de adquirir conocimientos, principios y valores.
- ✿ Al proyecto FOMIX-HGO-2005-C01-53 "El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del estado de Hidalgo" por la beca proporcionada para participar como asistente en el proyecto y realizar el presente trabajo.
- ✿ Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por facilitar sus instalaciones y equipo necesario para la realización de este proyecto.
- ✿ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Ana Laura López Escamilla, Biól. Laura Patricia Olguín Santos y M. en C. Karina Jiménez Durán profesoras del Taller "Biología del Desarrollo y Función de las estructuras Reproductoras en Cactáceas", por sus comentarios y sugerencias al trabajo escrito.
- ✿ A la Dra. Yolanda Hornelas Orozco y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por el apoyo brindado durante la obtención de las micrografías.
- ✿ A la M. F. P. Ana Isabel Bieler Antolín y al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias por las facilidades ofrecidas durante la toma de fotografías.
- ✿ A la Biól. Laura Patricia Olguín Santos, Técnico Académico de la Unidad de Ambientes Controlados por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las cámaras.
- ✿ A la Dra. Ana Laura López Escamilla por dirigir este proyecto.
- ✿ A la Dra. Clara Esquivel Huesca, M. en C. Ricardo Wong, M. en C. Mónica Pérez Pacheco y Biól. Dulce María Tapia Cruz, por sus sugerencias y aportaciones durante la realización del presente trabajo.
- ✿ A la Dra. Ana Laura López Escamilla y a la Biól. Laura Patricia Olguín Santos por coordinar la parte de Cultivo de Tejidos Vegetales.
- ✿ A la Dra. Clara Esquivel Huesca por la asesoría en la parte histológica.
- ✿ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán por el apoyo en la descripción de los cortes.

Personales

A mis padres:

Agustín López Rodríguez y Dalila Herrera Estrada

Por sus palabras de amor que hoy son la fuerza que hacen latir a mi corazón...

Por sus sabios consejos que hoy son la armadura para enfrentar mis nuevos desafíos...

Por sus cansados desvelos y arduo trabajo que hoy fructifican en uno de los anhelos más grandes de mi vida...

A mis hermanos:

Yazmín, Lizbeth, Agustín, Edalid y Bernardo

Por su apoyo, cariño, comprensión e indudable confianza que han sido mi fuerza para seguir adelante...

A mi sobrina:

Yarezi Itzayana

Por sus sonrisas que alegran mi alma, te amo princesa...

¡Gracias... porque ustedes saben que son mi Vida!

A todos mis maestros:

Por encaminarme a ese maravilloso mundo del saber...

A los que me enseñaron a seguir adelante sin olvidarme nunca de tres cosas:

México, Pumas y Universidad... ¡Muchas gracias!

A mis grandes amigos:

Arturo, Alejandra, Susi, Ale, Cris, Alma, Dulce, Mary, Nelly, Vick, Bere, Viri, Ivonne, Samanta, José Luis, Rebe, Erick, Martha, Fer, Betty, Itzue, Alejandro, Marco y a todos los del Lab. de Desarrollo en plantas y a los del museo Universum...

Gracias por brindarme su amistad y apoyo incondicional

CONTENIDO

Abreviaturas	1
Resumen	2
I. Introducción	3
II. Antecedentes	5
1.- La familia Cactaceae	5
a) Problemática de las cactáceas en México	6
2.- Cultivo de Tejidos Vegetales	7
3.- El género <i>Mammillaria</i> y sus características	11
a) <i>Mammillaria coahuilensis</i>	12
b) Distribución geográfica y problemática	12
4.- Propagación <i>in vitro</i> en el género <i>Mammillaria</i>	14
5.- Estudios histológicos en el género <i>Mammillaria</i> cultivado <i>in vitro</i>	19
6.- Organización y función de los meristemos vegetativos	21
a) Meristemo apical	21
b) Meristemo dimórfico en el género <i>Mammillaria</i>	22
III. Justificación	23
IV. Objetivos	23
General	23
Particular	23
V. Materiales y Métodos	24
1.- Material biológico	24
2.- Desinfección y siembra de semillas	24
3.- Elongación de plántulas (medio líquido)	25
4.- Inducción de brotes	25
5.- Microtecnia	26
a) Inclusión en LR White	27
b) Pruebas histoquímicas	27
➤ Reactivo de Lugol	27
➤ Reactivo de Schiff	28
6.- Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)	28
VI. Resultados y Discusión	30
1.- Germinación	30
2.- Desarrollo de plántulas	33
a) Hiperhidratación	34
b) Oxidación	35

3.- Elongación de plántulas (medio líquido)	36
4.- Respuestas morfogénicas	37
a) Plántulas en medio líquido	37
b) Explantes apicales	38
c) Explantes laterales	39
5.- Análisis histológico del tallo de una plántula germinada <i>in vitro</i>	42
a) Epidermis	42
b) Laticíferos	43
c) Meristemas	44
➤ Meristemo apical	44
➤ Meristemo dimórfico	45
6.- Desarrollo de los brotes regenerados <i>in vitro</i>	46
a) Aréola vegetativa	46
b) Aréola floral	50
VII. Conclusiones	55
Anexo I. Descripción Botánica de <i>Mammillaria coahuilensis</i>	56
Anexo II. Formulación de los medios de cultivo MS y MS 50% (Murashige y Skoog, 1962)	57
Literatura Citada	58

ABREVIATURAS

AA	Agua con Agar
AIA	Ácido Indol-acético
AIB	Ácido Indol-butírico
ANA	Ácido Naftalenacético
BA	Benciladenina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2 iP	2-Isopentenil adenina
K	Kinetina
CA	Carbón Activado
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
FAA	Formol, Ácido acético, Alcohol etílico
IUCN	International Union Conservation of Nature (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)
MS	Murashige y Skoog (1962)
MS 50 %	MS al 50 % de todos sus componentes
MSL	MS líquido
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido

RESUMEN

Mammillaria coahuilensis es una especie endémica del estado de Coahuila que debido a sus poblaciones reducidas, la especificidad de hábitat, su distribución restringida y lento crecimiento, se encuentra en la categoría de Amenazada de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Su establecimiento y propagación *in vitro* hicieron posible, además de promover la conservación de esta especie, realizar el estudio anatómico que, siendo escaso en cactáceas obtenidas *in vitro* mediante Cultivo de Tejidos Vegetales, permitirá aportar el conocimiento del origen y desarrollo de las estructuras regeneradas a través de este sistema de cultivo. En el presente trabajo se realizó el estudio histológico y micromorfológico de los brotes regenerados *in vitro* para determinar si el origen de estos es a partir de aréolas vegetativas y/o florales. Plántulas germinadas *in vitro* de 0.5 a 1 cm de longitud se disectaron para obtener dos tipos de explantes, uno apical y dos laterales por plántula, los cuales se sembraron en medio Murashige y Skoog adicionado con Benciladenina 0.5 mg L⁻¹, pH 5.7-5.8, sacarosa 30 g L⁻¹ y agar 8 g L⁻¹. Semanalmente fueron evaluadas las respuestas morfogénicas previas a la formación y proliferación de los brotes. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C, fotoperiodo 16/8 h e intensidad luminosa de 30-35 μmol m⁻² s⁻¹. Los explantes fueron cosechados a los 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días del medio con Benciladenina, y fijados en una solución de Formol, Ácido acético y Alcohol etílico, para su posterior procesamiento en LR White y Microscopio Electrónico de Barrido. El estudio anatómico sugiere que la activación y desarrollo de los brotes es a partir del meristemo vegetativo y floral.

I. INTRODUCCIÓN

México tiene un gran número de especies de cactáceas distribuidas a lo largo de su territorio. Estas plantas han sido usadas desde tiempos antiguos, y actualmente una gran proporción de la población las utiliza como fuente de alimento, forraje, uso medicinal y ornamental (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b). Desafortunadamente muchas de las especies mexicanas están amenazadas o en peligro de extinción, debido principalmente a la sobrecolecta, destrucción de su hábitat y comercio ilegal (Rubluo *et al.*, 1993; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 2002). Una de las acciones más deseables para salvaguardar especies vegetales en alguna categoría de riesgo es promover técnicas de propagación (Paunescu, 2009).

El cultivo *in vitro* ha emergido como una alternativa efectiva para propagar muchas especies vegetales, incluyendo las cactáceas. Estas técnicas permiten la obtención de muchos individuos a partir de pequeños fragmentos de tejido que son cultivados en medios químicamente definidos y mantenidos en un ambiente controlado (Rubluo *et al.*, 1993; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1998). Los reportes sobre la propagación de cactáceas por Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se ha incrementado en la última década, sin embargo, los estudios anatómicos e histológicos relacionados con el origen y desarrollo de las estructuras regeneradas *in vitro* es aún escaso. Estos estudios son importantes cuando, dependiendo de los esquemas de investigación, se necesita mantener el genotipo exacto u obtener variantes genéticas de un individuo de interés y conocer los problemas asociados a dichos eventos (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). Por lo anterior, en el presente trabajo se

planteó conocer el origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* especie endémica ubicada en la categoría de Amenazada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002), mediante el análisis histológico y micromorfológico que permitan determinar si el origen de los brotes es a partir de las aréolas vegetativas y/o florales.

II. ANTECEDENTES

1.- La familia Cactaceae

En el orden Caryophyllales, representado por 12 familias, encontramos a la familia Cactaceae, un grupo de plantas nativas del continente americano que se extienden ampliamente desde Alberta en Canadá hasta la Patagonia en Argentina. Comprende cuatro subfamilias Maihuenioideae, Pereskioideae, Cactoideae y Opuntioideae (Anderson, 2001) y más de 1500 especies (Bravo-Hollis, 1978). Es uno de los grupos vegetales con mayor presencia en nuestro país (Hernández y Godínez, 1994), en donde se encuentran alrededor de 51 géneros y aproximadamente 850 especies, y se estima que cerca del 80% de las especies reconocidas para el territorio nacional son endémicas (Arias, 1997; Benítez y Dávila, 2002). Por otra parte, Guzmán *et al.* (2003) consideran a 913 taxones entre especies (669) y subespecies (244), agrupadas en 63 géneros, de éstos, 25 géneros, 518 especies y 206 subespecies son endémicos para México. Con respecto a su distribución nacional, encontramos que el estado de San Luis Potosí alberga el mayor número de especies con 151, seguido por Coahuila con 126 y Nuevo León y Oaxaca con 118. Asimismo, San Luis Potosí es el más diverso al contar con 33 géneros, seguido de Oaxaca con 32 y Tamaulipas con 31 (Guzmán *et al.*, 2003). Para el estado de Coahuila, de las 126 especies reportadas, 10 taxa son endémicos (Villarreal-Quintanilla y Encina-Domínguez, 2005).

A pesar de encontrarse ampliamente distribuidas y presentar una gran importancia ecológica, evolutiva, biológica y etnobotánica, la familia Cactaceae está considerada amenazada ya que muchas de sus especies podrían

desaparecer de sus ambientes naturales, principalmente por las actividades humanas tales como el comercio ilegal, tráfico internacional y modificación de su hábitat (Chávez *et al.*, 2006; Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006; Martorell y Peters, 2009).

a) Problemática de las cactáceas en México

La mayoría de las cactáceas mexicanas son afectadas adversamente por las actividades humanas, estas presiones comprenden: el uso del suelo para la agricultura y ganadería, la construcción de presas y carreteras, la extracción de materiales de construcción, asentamientos humanos y principalmente la colecta ilegal de ejemplares para venderlos en el mercado nacional e internacional (Hernández y Godínez, 1994; Becerra, 2000). El saqueo de las cactáceas silvestres puede llegar al extremo de la codicia humana debido a que son muy buscadas por coleccionistas extranjeros que las ponen en venta para obtener beneficios propios; lamentablemente éstas plantas continúan apareciendo en el comercio ilegal a pesar de que las leyes mexicanas prohíben su recolección (Anderson, 2001). Se cree que el número de especímenes que son parte de este tipo de comercio es pequeño, pero puede ser lo suficientemente significativo para desestabilizar las poblaciones silvestres de algunas especies (Robbins, 2003). El comercio ilegal de las especies de cactus es producto de una combinación de problemas tales como la falta de viveros que propaguen especies raras para la demanda internacional y la generación de leyes confusas al ser insuficientes o inexistentes. Por otra parte, la poca información sobre las áreas donde se diversifica la familia, la demografía de las especies y otros factores que amenazan la estabilidad de las

poblaciones como su lento crecimiento, ciclos de vida muy largos y la baja capacidad de recuperación no sólo pueden poner en riesgo la densidad de las mismas (Castro-Gallo *et al.*, 2002), sino también la aplicación de acciones de conservación o establecimiento de leyes que aseguren la conservación de estas plantas (Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006).

2.- Cultivo de Tejidos Vegetales

Las cactáceas pueden ser reproducidas de muy distintas maneras: la propagación sexual a partir de semillas y diversas formas asexuales o vegetativas, entre las cuales se pueden mencionar la propagación por esquejes, el injerto y las recientes técnicas de micropropagación (Hartmann *et al.*, 1997; Rowley, 1981 citado por Sánchez, 1995). La capacidad para establecer y mantener órganos y tejidos vegetales en un cultivo aséptico usando soluciones nutritivas para regenerar nuevas plantas ha sido llamado cultivo de tejidos y órganos o cultivo *in vitro* (Hartmann *et al.*, 1997; Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Existen tres vías diferentes para la regeneración de plantas *in vitro*: la brotación y proliferación de yemas, la embriogénesis somática y la organogénesis. En el primer caso se parten de meristemas para la obtención de una o varias plantas completas, mientras que en la embriogénesis y la organogénesis se parte de tejidos no meristemáticos que requieren de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación para dar lugar a embriones o brotes adventicios (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999). Las zonas meristemáticas están constituidas por células pequeñas, no diferenciadas, con una alta relación núcleo-citoplasma, vacuolas muy pequeñas, paredes celulares delgadas y plastidios no diferenciados. Estas

zonas solo se localizan en ciertas regiones o puntos de crecimiento de la planta como los ápices, axilas, ápices de la raíz, zona del cambium y felógeno. Debido a lo anterior el cultivo de yemas apicales o axilares son una forma sencilla de obtener nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes, por lo que no implica fenómenos de desdiferenciación y rediferenciación celular como los que ocurren en la organogénesis y embriogénesis somática. En el cultivo de meristemos puede usarse el domo apical del meristemo con un pequeño número de primordios foliares incluyendo o no al tejido vascular diferenciado así como explantes que lleven una o más yemas axilares. El término organogénesis se refiere a la formación *de novo* de órganos en los explantes cultivados, entre los órganos formados pueden estar las raíces y brotes adventicios. Puede ser directa cuando tienen lugar en el explante original o indirecta cuando primeramente se origina callo y luego órganos a partir de éste.

Bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, ciertas células tienen la capacidad de formar embriones sin la fusión de gametos siguiendo las etapas de la embriogénesis cigótica. A este proceso se le denomina embriogénesis somática, y ésta también puede ser directa o indirecta dependiendo si los embriones se originan directamente del explante o es precedido por la formación de callo (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008).

Entre las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales se encuentra la conservación del germoplasma (Paunescu, 2009), la transferencia directa de genes a las plantas mediante ingeniería genética, investigaciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales así como la micropropagación la cual se perfila como una de las técnicas más idóneas de reproducción debido a que aventaja

a otros métodos tradicionales en (Sánchez, 1995; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999):

1.- Mantener las características genóticas del material inicial seleccionado, debido a que es un sistema de propagación clonal ideal para la multiplicación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes.

2.- Permitir reproducir cantidades grandes de plantas a partir de pocos explantes, por eso facilita la propagación en casos en los que las especies son escasas en la naturaleza.

3.- El espacio requerido es mínimo y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto.

4.- Promover la precocidad favoreciendo el florecimiento temprano.

5.- Reducir la mortalidad que se presenta en las primeras fases de desarrollo cuando se parte de semilla.

6.- Ya que se trata de un cultivo en condiciones asépticas facilita el movimiento de material vegetal entre distintas zonas geográficas sometidas a regulaciones sanitarias, eliminando procesos cuarentenarios.

El proceso de micropropagación consta de 5 fases (Collin y Edwards, 1998):

Fase 0. Selección del material. Es la fase en la que se selecciona la planta madre de la cual se obtendrán los explantes, es decir las semillas, embriones, órganos, tejidos o segmentos de tejidos vegetales que van a ser utilizados para iniciar los cultivos. Se recomienda que el material éste sano y libre de patógenos. En ésta etapa se pueden manipular variables como el fotoperiodo,

la temperatura, la iluminación, la adición de fitoreguladores, fertilizantes o podas severas para el rejuvenecimiento.

Fase I. Establecimiento del explante. Al obtenerse los explantes, éstos deben someterse a un tren de desinfección y lavado superficial para establecerlos en el medio de cultivo adecuado. La elección del explante depende de la especie y del sistema de proliferación que se aplique en la fase II (propagación por yemas o meristemas, organogénesis o embriogénesis somática).

Fase II. Multiplicación. Durante esta etapa, el medio de cultivo, los fitoreguladores y las condiciones de incubación (temperatura, fotoperiodo e intensidad luminosa) juegan un papel muy importante, pues es aquí donde se realiza la inducción para formar y proliferar los brotes o embriones somáticos.

Fase III. Elongación y enraizamiento. Comprende la elongación y el enraizamiento de los brotes o la germinación de los embriones. Los brotes pueden transferirse a un sustrato en condiciones *ex vitro* o bien inducir la formación de raíces adicionando al medio de cultivo auxinas o Carbón Activado (CA), aunque también puede dejarse en medio basal sin reguladores de crecimiento, pues la formación de raíces también puede ser espontánea.

Fase IV. Aclimatización. Es la etapa más crucial pues define el éxito o el fracaso en la productividad. Comprende la transferencia de las plántulas *in vitro* a *ex vitro* a través de un proceso gradual en el cambio de las condiciones ambientales (humedad relativa, intensidad luminosa, temperatura, intercambio gaseoso y medios ricos en nutrientes) con la finalidad de evitar un estrés en la planta y lograr su sobrevivencia fuera del frasco (Starling y Dodds, 1983; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999; Giusti *et al.*, 2002).

3.- El género *Mammillaria* y sus características

El género *Mammillaria*, pertenece a la subfamilia Cactoideae y a la tribu Cacteeae (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a). Comprende plantas de tamaño muy pequeño, simples o cespitosas, con **tallos** globosos y jugo acuoso, semilechoso o lechoso. Los **tubérculos** se encuentran dispuestos en series espiraladas que van desde cónicos a piramidales. Las **espinas** generalmente están diferenciadas en centrales y radiales, son variables en número, en forma, dimensiones y color. Las **flores** generalmente pueden ser pequeñas o grandes y están dispuestas en corona cerca del ápice, son

infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura. El **fruto** es una baya pequeña claviforme. Las **semillas** son pequeñas, más o menos globosas, ovoides o piriformes; con **testa** de estructura reticulada y de color castaño más o menos oscuro hasta foveolada y de color castaño rojizo oscuro hasta negro; embrión ovoide o algo cilíndrico, muy suculento y con cotiledones reducidos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b; Scheinvar, 2004). El género se caracteriza por presentar aréolas

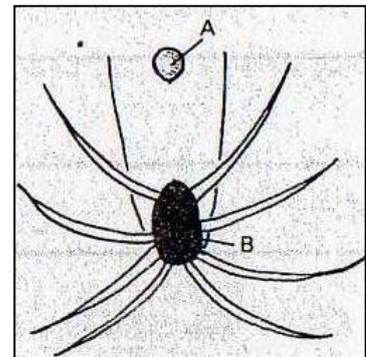


Figura 1. Aréola de *Mammillaria* que muestra el meristemo vegetativo y floral, el primero en el ápice del tubérculo y el segundo en la axila del mismo (Tomado de Bravo-Hollis, 1978).

Abreviaturas: (A) meristemo floral y (B) meristemo vegetativo.

dimorfas (Fig. 1), es decir, que las aréolas espiníferas o vegetativas, ubicadas en el ápice de los tubérculos, producen espinas, pelos, cerdas y lana, y sólo en la subfamilia *Opuntioideae* además pueden presentarse glóquidas. Las aréolas florales, en las axilas de los tubérculos, además de flores y frutos, también pueden producir cerdas, lana, tricomas (Bravo-Hollis, 1978) y nuevos brotes (Boke, 1958). De acuerdo a Arias *et al.* (1997), este género comprende

aproximadamente 200 especies. En México se encuentra su principal centro de diversificación y distribución (Boke, 1958; Arias, 1997; Arias *et al.*, 1997).

a) *Mammillaria coahuilensis*

Mammillaria coahuilensis (Boed.) Moran (Cactaceae) (Anexo I) se caracteriza por presentar un tallo simple con el ápice aplanado, los tubérculos son triangulares y están flojamente dispuestos en series espiraladas; con jugo lechoso. Las axilas tienen un poco de lana, las aréolas al principio son lanosas y después desnudas, presentan espinas radiales y una central más larga ligeramente pubescente. Las flores son campanulado-infundibuliformes de color rosa claro. El fruto es claviforme de color rojo con semillas café claro ligeramente rojizas de 1 mm de diámetro, gruesamente foveoladas con hilo basal pequeño (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b) (Fig. 2).

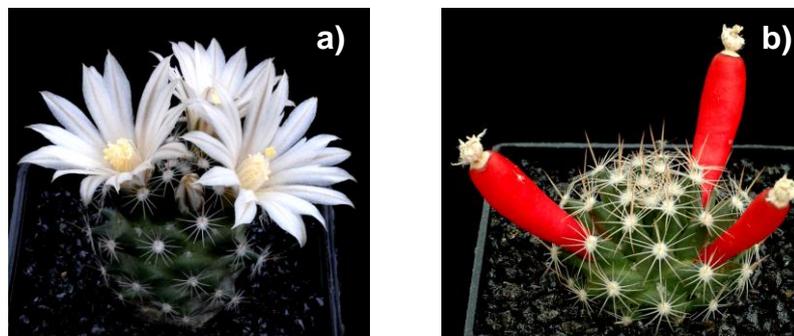


Figura 2. *Mammillaria coahuilensis*: a) flores y b) frutos.
(Tomado de http://www.gargamel-cactus.com/photos/album14/Mammillaria_coahuilensis_ML)

b) Distribución geográfica y problemática

M. coahuilensis es endémica de el estado de Coahuila. La localidad tipo se encuentra en San Pedro de las Colonias, cerca de la Laguna de Viesca (Fig. 3) donde crece conjuntamente con *Ariocarpus kotschoubeyanus* var.

macdowellii y *Coryphantha borwigii* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Guzmán *et al.* (2003) menciona dos subespecies: *coahuilensis* y *albiarmata*.

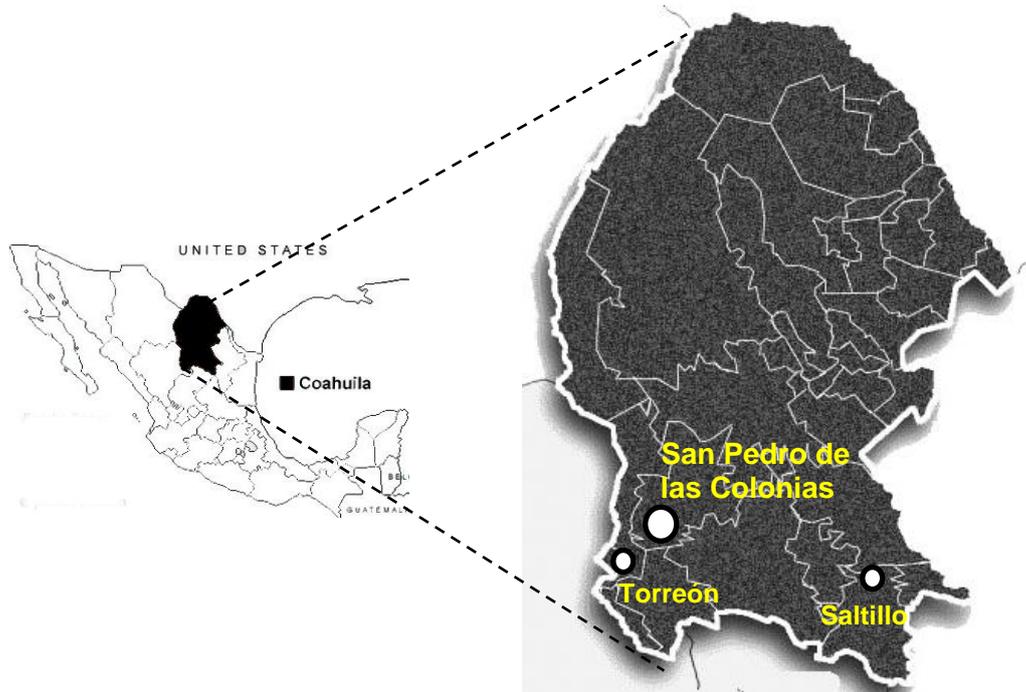


Figura 3. Distribución de *M. coahuilensis*, en la localidad tipo San Pedro de las Colonias, Coahuila (Tomado de <http://www.cefp.gob.mx/intr/siie/Coahuila.html>).

Esta especie está clasificada como Amenazada por la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) y en categoría Vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Walter y Gillett, 1998). Sin embargo en la versión de la IUCN 2004 (Arias *et al.*, 2005) y 2008 ésta no se encuentra clasificada en ninguna categoría debido a que se cuentan con pocos estudios de la especie (Hernández H., comunicación personal). Por otra parte, su comercio se encuentra regulado al estar incluida en el Apéndice II de la CITES (Arias *et al.*, 2005), y a pesar de ello, Alemania, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos son países identificados en el comercio internacional para los cuales se reportan 7 viveros en donde la disponibilidad de esta especie es baja (Bárceñas, 2003). La poca información reportada para la especie y que aún así permite la formulación de marcos jurídicos para su comercio, lamentablemente

encaminan a esta especie a la extinción, una problemática que podría resolverse si se homologara la información para protegerla legalmente a nivel nacional e internacional.

4.- Propagación *in vitro* en el género *Mammillaria*

Existen ya numerosos reportes sobre la propagación *in vitro* en especies de este género (Tabla 1). Minocha y Mehra (1974) realizaron una de las primeras investigaciones morfogénicas y nutricionales en cultivos de callo de *Mammillaria prolifera*, los cuales tuvieron un rápido crecimiento en presencia de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en relativamente altas concentraciones. Los intentos por inducir la diferenciación del callo no fueron exitosas, excepto por la formación esporádica de raíces en algunos cultivos.

La diferenciación de brotes no pudo ser inducida por varias modificaciones del medio y en pocos casos aparecieron embriones en el callo sin embargo, se obtuvieron pocas plántulas de estos embriones cuando fueron transferidos a medio basal. No fue sino hasta 1975 que Kolár *et al.* (1975) publicaron el primer reporte de la obtención de brotes en *M. woodsii*, que se logró al cultivar meristemas apicales en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con K (Kinetina) + AIA (Ácido Indol-acético), ambos fitoreguladores en una concentración de 2 mg L⁻¹. Los brotes se originaron a partir del callo, el cual se obtuvo a las cinco semanas. A partir de entonces se intensificó la exploración de la capacidad regenerativa en este género. Viskot y Jara (1984) describieron una técnica basada en la estimulación hormonal para el crecimiento y desarrollo de las aréolas en *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria prolifera*. En *M. carmenae* la concentración hormonal óptima para la formación

de brotes fue de 1 mg L⁻¹ de ANA (Ácido Naftalenacético) y 2 mg L⁻¹ de BA (Benciladenina) y en *M. prolifera* fue registrado con 0.5 a 1 mg L⁻¹ de BA y ANA. Bajo estas condiciones después de dos a cinco semanas de cultivo se observó la formación de brotes a partir de las aréolas.

Un trabajo similar fue realizado por Retes-Pruneda *et al.* (2007) en *M. carmenae*, *M. carmenae* var. *rubrispina*, *M. herrerae* y *M. theresae* lográndose la formación de brotes a partir de las aréolas en medio MS adicionado con BA o 2-Isopentenil adenina (2iP). Flores (2007) desarrolló la técnica para el establecimiento y propagación *in vitro* de *M. coahuilensis* como una estrategia para su conservación y propagación masiva, la cual se realizó a partir de semillas cultivadas *in vitro* en medio MS. Para la formación de brotes se emplearon dos tipos de explantes: uno apical y dos laterales. La regeneración de brotes ocurrió de forma indirecta y por la activación de aréolas florales en medio MS + BA 0.5 mg L⁻¹.

La propagación *in vitro* de cactáceas a través de la activación de las aréolas es adecuada al permitir la generación de plantas con una alta estabilidad e uniformidad genética, evitando la variación somaclonal que puede generarse al utilizar métodos indirectos de regeneración, cuya primera etapa es la producción de callo. Sin embargo en los trabajos reportados para este género, en donde la formación de brotes ocurre muchas veces a través de las aréolas, no se especifica si esto ocurre a partir de las aréolas vegetativas y/o florales.

La activación de las aréolas se logra mediante la adición de citocininas al medio de cultivo, siendo las más usadas BA, 2iP y K (Hubstenberger *et al.*, 1992 citados por Retes-Pruneda *et al.*, 2007), y generalmente su concentración

varía desde 0.5 mg L⁻¹ hasta 5 mg L⁻¹ dependiendo de los requerimientos de cada especie. Las respuestas morfogénicas *in vitro* de muchas especies reportadas en la literatura exhiben la necesidad de un balance adecuado entre auxinas y citocininas, no obstante, Rubluo *et al.* (2002) reportaron la capacidad regenerativa en *M. san-angelensis* inducida solo por auxinas.

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

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Fitoreguladores (mg L ⁻¹)	Respuesta morfogénica	Número de brotes por explante	Referencia
<i>Mammillaria prolifera</i>	Plántulas, yemas vegetativas y órganos florales	MS	K(1) + 2,4-D(10 y 20)	Callo		Minocha y Mehra, 1974
<i>M. woodsii</i>	Secciones de tallo	MS	K (2) + AIA (2)	Brotos y callo		Kolár <i>et al.</i> , 1975
<i>M. elongata</i>	Tubérculos	MS	2iP (10) + AIB (1)	Brotos		Johnson y Emino, 1979
			2,4-D (2-10) + K+ 2iP (1-2)	Callo		
<i>M. glassii</i>	Yemas axilares	No especificado	BA (1)	Brotos		Starling y Dodds, 1983
<i>M. carmenae</i>	Secciones de tallo	MS	BA (2) + ANA (1)	Brotos y callo		Vyskot y Jára, 1984
<i>M. prolifera</i>			BA + ANA (0.5-1)			
<i>M. gummifera</i>	Secciones de tallo	MS	No especificado	Callo		Ault y Blackmon, 1985
21 especies de <i>Mammillaria</i>	Plántulas	MS	BA + 2,4-D	Brotos y callo		Damiano <i>et al.</i> , 1986
<i>M. san-angelensis</i>	Laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (1) + ANA (0.01)	Brotos a partir de callo	21-35	Martínez-Vázquez y Rublo, 1989
<i>M. gracilis</i> y <i>M. spp.</i>	Yemas laterales	MS	BA (2)	Brotos a partir de callo		Gratton y Fay, 1990
<i>M. haageana</i> <i>M. huitzilopochtli</i> <i>M. san-angelensis</i>	Secciones de tallo	MS	BA (0.1) BA (1)	Brotos y callo		Rubluo <i>et al.</i> , 1993
<i>M. san-angelensis</i>	Plántulas	MS	Sin fitoreguladores	Brotos y callo		Duval, 1995

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

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Fitoreguladores (mg L ⁻¹)	Respuesta morfológica	Número de brotes por explante	Referencia
<i>M. candida</i> <i>M. craigii</i> <i>M. uncinata</i> <i>M. formosa</i> <i>M. obscura</i> <i>M. sphacelata</i>	Laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (1) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) + ANA (0.01)	Brotes	13.25 ± 2.37 4.65 ± 0.349 5.25 ± 0.432 4.42 ± 0.460 4.78 ± 0.510 17.5 ± 2.56	Pérez-Molphe <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bocasana</i>	Meristemos de plantas adultas	MS	BA (10)	Brotes	19.4	Anicua y Rivas, 2000
<i>M. carmenae</i>			K (1)		23.5	
<i>M. pectinifera</i>	Brotes y plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (5)	Brotes y callo	4.38	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>M. san-angelensis</i>	Brotes	MS	AIA (6)	Brotes	26.77	Rubluo <i>et al.</i> , 2002
<i>M. gracilis</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	No especificado	Callo	—	Poljuha <i>et al.</i> , 2003
<i>M. crucigera</i>	Plántulas y brotes regenerados <i>in vitro</i>	MS	BA (0.5)	Brotes y callo	—	Licona <i>et al.</i> , 2004
<i>M. albicoma</i>	Yemas florales	MS	BA (5) +ANA (0.1)	Callo y brotes a partir de callo y perianto	58	Wyka <i>et al.</i> , 2006
<i>M. carmenae</i> <i>M. carmenae</i> va. <i>rubrisprina</i> <i>M. herrerae</i> <i>M. theresae</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (2) , 2iP (3) BA (1) , 2iP (5) BA (0.5) , 2iP (5) BA (2) , 2iP (5)	Brotes y callo	7.7 ± 0.92, 5.6 ± 0.56 6 ± 0.52, 5.7 ± 0.34 8.1 ± 0.85, 4 ± 0.68 4.2 ± 0.44, 8.2 ± 0.64	Retes-Pruneda <i>et al.</i> , 2007
<i>M. coahuilensis</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	BA (0.5)	Brotes a partir de callo y aréolas florales	8.86 ± 8.07	Flores, 2007
<i>M. bocasana</i> <i>M. densispina</i> <i>M. hahniana</i> <i>M. hutchsoniana</i> <i>M. orcutii</i> <i>M. pectinifera</i> <i>M. perbella</i> <i>M. picta</i> <i>M. rhodantha</i> <i>M. zephyranthoides</i>	Secciones de tallo	MS	K (10) + AIA (1) K (10) + AIA (2)	Brotes y callo	4.8 y 4.7	Ramírez-Malagon <i>et al.</i> , 2007

(K) Kinetina
(BA) Benciladenina
(AIA) Ácido Indol-acético
(MS) Murashige y Skoog (1962)

(AIB) Ácido Indol-butírico
(2 iP) 2-Isopentenil adenina
(ANA) Ácido Naftalenacético
(2,4-D) Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

5.- Estudios histológicos en el género *Mammillaria* cultivado *in vitro*

Existen pocos estudios histológicos de estructuras obtenidas por CTV. Duval (1995) realizó el análisis histológico para comprobar la formación *de novo* de los brotes de *Mammillaria san-angelensis* utilizando callo previamente regenerado en medio MS+BA 1mg L⁻¹. A partir de ese experimento, el material fue subcultivado durante más de 5 años en medio MS sin reguladores de crecimiento, obteniendo brotes por organogénesis indirecta, los cuales se hiperhidrataron y reventaron formando callo. Sin embargo, el análisis histológico reveló en las células de callo la presencia de almidón que fue disminuyendo conforme ocurrió la organización y formación de meristemoides, a partir de los cuales, después de 12 días de cultivo, se formaron los brotes. Debido a que los brotes no completaron su desarrollo, solo se hace referencia al meristemo apical de uno de ellos, en el que se observa un primordio foliar y el meristemo de la aréola.

Partiendo de este trabajo, Rubluo *et al.* (2002) observaron las respuestas morfogenéticas inducidas por auxinas en esta misma especie. El análisis histológico de los brotes regenerados *in vitro* no expuestos a auxinas (control) y los sometidos a la acción de AIA, revelaron que estos se originaron por formación *de novo* y por la activación de meristemas axilares. En las células de callo se observaron cloroplastos situados en la periferia, mostrando en su conjunto, un arreglo típico de parénquima. Hacia la superficie del callo, las células fueron más pequeñas con núcleos conspicuos, sin vacuolas y mostraron una apariencia meristemática. Después de 3 a 4 semanas, fueron evidentes los haces vasculares, las células parenquimatosas, los tubérculos y los meristemas axilar y espinífero.

La activación de las aréolas solo se registró en presencia de auxinas, en donde se reporta la activación del meristemo axilar (aréola floral). En esta zona se observó la organización de células pequeñas formando una protuberancia que posteriormente se transformó en un brote, el cual produjo sus propios tubérculos y creció similar a una planta.

Por otra parte, Poljuha *et al.* (2003) realizaron el estudio morfológico y ultraestructural en *Mammillaria gracillis* cultivada *in vitro*. Los resultados mostraron la formación de brotes a partir de callo en medio MS sin hormonas. El análisis histológico hace referencia únicamente a la epidermis en el tallo de esta especie, una aréola con espinas y callo con meristemoides a partir del cual se generarán los brotes.

Liconá *et al.* (2004), reportan el desarrollo ontogenético de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria crucigera*. Se observó la formación de brotes a partir de la reactivación de las aréolas vegetativas del explante entre los 20 y 28 días de cultivo en medio MS + BA 0.5 mg L⁻¹. El análisis histológico reveló células epidérmicas y subepidérmicas de la aréola, que previamente formaron espinas y tricomas, iniciando la formación de diminutos domos meristemáticos que dieron origen a los brotes por organogénesis directa. Brotes completamente diferenciados se observaron a los 47 días en medio basal y a los 60 días en medio con BA, en ambos casos existió una continuidad en los haces vasculares de los nuevos brotes con los del tubérculo del explante.

Wyka *et al.* (2006) determinaron el potencial de las yemas florales de *Mammillaria albicoma* para regenerar brotes, llevándose a cabo un análisis histológico de los resultados de la organogénesis. Las yemas fueron incubadas

en medio MS suplementado con BA y ANA, concluyéndose que los brotes se formaron a partir de callo y directamente del perianto.

Después de 4 semanas de cultivo, en la base de la yema floral se observó callo con divisiones periclinales que después de 18 semanas, a través de centros meristemáticos, comenzaron a formar brotes. Tanto en el callo como en los brotes se identificaron haces vasculares. Por otra parte, después de 5 semanas de cultivo, se identificaron brotes originándose directamente del perianto. Se observaron divisiones celulares en los lóbulos del perianto que condujeron al desarrollo de meristemas individuales, aréolas y brotes sin un estado intermediario de callo. Los meristemas presentaron una forma plana con una capa de túnica y corpus.

Particularmente en *M. san-angelensis* la organogénesis directa se dio a través de las aréolas florales.

6.- Organización y función de los meristemas vegetativos

a) Meristemo apical

En las cactáceas los tallos son los órganos más conspicuos y elaborados de la planta (Mauseth, 1982; 2006), su organización es establecida en etapas muy tempranas del desarrollo en el meristemo apical el cual, al igual que en el resto de las angiospermas, es una estructura dinámica compuesta de una población relativamente pequeña de células que están en constante división celular adicionando nuevas células al cuerpo vegetal primario y simultáneamente organizándolas en el propio arreglo de las hojas, nodos, internodos y yemas axilares (Mauseth, 1983a). La morfología del meristemo

apical de las angiospermas es variable, desde una forma en domo hasta elíptica, aplanada o incluso ligeramente deprimida (Fletcher, 2002), además es posible identificar tres zonas: la zona central del meristemo, la zona periférica y la zona de costilla.

Una o más capas del ápice del tallo que muestran predominantemente las divisiones celulares orientadas anticlinalmente son referidas como la **túnica**, y el **corpus** que se encuentra debajo de la túnica consiste de células que se dividen tanto anticlinalmente como periclinalmente (Fletcher, 2002).

b) Meristemo dimórfico en el género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* se caracteriza por presentar aréolas dimorfas (Bravo-Hollis, 1978). En una aréola en la cual una zona meristemática puede formar flores, tallos, espinas y tricomas es llamado meristemo monomórfico, si hay dos zonas meristemáticas, una de las cuales produce únicamente espinas mientras que la otra forma flores y tallos, la aréola se conoce como dimórfica (Boke, 1955; Mauseth, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Mammillaria coahuilensis es una especie endémica, en la categoría de Amenazada de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001 debido a su restringida distribución geográfica. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han aplicado con éxito lográndose la regeneración de brotes por la activación de aréolas florales, por consiguiente, en el presente trabajo se propuso corroborar su origen a través del estudio morfológico, histológico y micromorfológico que permita contribuir al conocimiento de los procesos que ocurren durante el origen y desarrollo de las estructuras regeneradas *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

General

Determinar el origen y describir el desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.

Particular

Describir morfológica, histológica y micromorfológicamente el origen y la formación de los brotes obtenidos *in vitro* mediante cultivo de tejidos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material biológico

Se utilizaron semillas de *Mammillaria coahuilensis* de tres colectas diferentes, una de ellas del 31 de mayo de 2005 y las otras del 14 y 26 de noviembre del mismo año, todas procedentes de la localidad El Amparo, Coahuila, las cuales se almacenaron a 4 °C durante 16, 21, 23 y 24 meses.

2.- Desinfección y siembra de semillas

El proceso de desinfección es el utilizado por Flores (2007) para la misma especie y se describe a continuación:

Para facilitar su manejo, debido a su diminuto tamaño, las semillas se colocaron dentro de un paquete de papel filtro (Whatman No. 1) y se enjuagaron con detergente líquido (3 gotas de Dawn[®]/50 mL de agua destilada) durante 20 minutos. Posteriormente se desinfectaron con OH al 70% (v/v) 1 minuto y 30 minutos en NaOCl al 30% (v/v) (6% cloro activo) más 3 gotas de Tween 80. Todo el proceso en agitación continua. En la campana de flujo laminar se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada esterilizada 1 minuto cada uno. Se realizaron 7 siembras de 30 semillas cada una, distribuyendo 5 semillas por cada frasco tipo Gerber[®] con 25 mL de medio MS al 50% de todos sus componentes (MS 50%), sacarosa 15 g L⁻¹, pH 5.7-5.8 y agar bacteriológico Bioxon[®] 8 g L⁻¹ (Anexo II), esterilizado durante 18 minutos en autoclave a 1.5 Kg/cm². Los cultivos se incubaron en cámaras de ambiente controlado a 25±2 °C, fotoperiodo 16/8 h e intensidad luminosa de 30-35 μmol

m⁻² s⁻¹. El porcentaje de germinación se evaluó diariamente durante los 30 días posteriores a la siembra.

3.- Elongación de plántulas (medio líquido)

Debido a que el tallo de algunas plántulas germinadas no alcanzaron la talla deseada para permitir la obtención de los explantes, se transfirieron 152 de ellas a medio líquido MS basal con puentes de papel filtro (Tapia, 2006), con el fin de promover su elongación.

Las condiciones de incubación fueron las mismas que para la germinación de semillas. Las plántulas permanecieron 26 días en el medio líquido y después fueron nuevamente transferidas a medio sólido por 5 días antes de ser seccionadas para la obtención de explantes.

4.- Inducción de brotes

Las plántulas con longitud de 0.5 a 1 cm, provenientes del medio MS 50% y del medio MS líquido (MSL), fueron seccionadas eliminándoles la raíz para obtener 2 tipos de explantes, uno apical y dos laterales (Fig. 4).

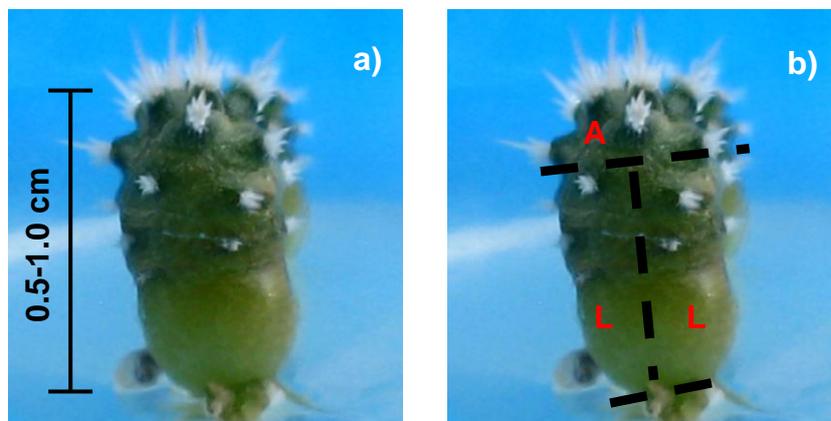


Figura 4. Obtención de explantes: **a)** Plántula, **b)** explante apical y explantes laterales.
Abreviaturas: (A) apical y (L) lateral.

Un explante apical y 2 laterales (1 plántula) fueron sembrados por cada frasco tipo Gerber® con 25 mL de medio MS + BA 0.5 mg L⁻¹ (medio de inducción), sacarosa 30 g L⁻¹, pH 5.7-5.8 y 8 g L⁻¹ agar bacteriológico Bioxon®, condiciones que reportó Flores (2007) como el mejor tratamiento para la proliferación de brotes de *M. coahuilensis*. Los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones ambientales utilizadas en la germinación y fueron evaluados semanalmente para observar las respuestas morfogénicas previas y posteriores a la formación y proliferación de los brotes, las cuales se registraron fotográficamente antes de la cosecha de los explantes para el análisis histológico.

5.- Microtecnica

Para estudiar los cambios microestructurales que ocurren en los tejidos cultivados *in vitro* los explantes de *M. coahuilensis* fueron cosechados a los 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días de cultivo en el medio de inducción. Se utilizaron por lo menos 2 explantes apicales y 4 laterales (2 plántulas) para cada tiempo de cosecha; posteriormente fueron fijados en FAA incluidos en LR White para su estudio posterior en microscopía de luz, otros explantes fueron procesados para el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Los tiempos de permanencia en el medio de inducción fueron determinados con base en lo reportado por Flores (2007) para la misma especie y ajustados de acuerdo a la velocidad de las respuestas morfogénicas obtenidas durante el desarrollo de este experimento. Como control se utilizó una plántula germinada *in vitro* de 2 meses de edad, que después de ser fijada siguió el mismo proceso de los brotes estudiados en microscopía de luz.

a) Inclusión en LR White

Después de la fijación en FAA, el material se lavó bajo el chorro de agua corriente por 30 minutos y se deshidrató en una serie de alcoholes graduales: 30%, 50%, 70%, 85% y 96% durante 15 minutos cada uno y tres cambios en alcohol 100% por 20 minutos cada uno. Para la preinclusión el material se embebió en las siguientes proporciones de LR White y alcohol 100% respectivamente: 1:3, 1:1, 3:1 y LR White puro, cada uno por 24 h a 4 °C (López *et al.*, 2005, modificado por Esquivel H., comunicación personal).

Posteriormente se colocaron las muestras de tejido en cápsulas de gelatina, donde se orientaron de acuerdo al corte deseado, finalmente se llenaron con LR White puro y se etiquetaron. La polimerización se realizó en ausencia de oxígeno a 56 °C por un tiempo máximo de 24 h. Se realizaron los cortes histológicos (1-3 µm) en un micrótopo y fueron teñidos con azul de Toluidina; se realizó el registro fotográfico.

b) Pruebas histoquímicas

En los cortes histológicos se aplicaron dos pruebas histoquímicas:

➤ Reactivo de Lugol

Para identificar almidón se aplicó una gota de Lugol en la muestra y se dejó actuar por 30 segundos, después el exceso del reactivo se retiró con un papel filtro dejándose secar la preparación. Para corroborar la presencia del almidón se realizó microscopía de polarización.

➤ **Reactivo de Schiff**

Para identificar polisacáridos insolubles se colocó una gota del reactivo sobre la muestra y se dejó actuar por 50 minutos, posteriormente el exceso se retiró con agua destilada. Se seleccionaron las laminillas de ambas pruebas histoquímicas y se tomaron fotografías.

6. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Parte del material biológico fijado en FAA se deshidrató de la misma forma como se hizo para el estudio de la microestructura. Posteriormente las muestras se desecaron a punto crítico con CO₂ en un Samdri-795, Sample drying at the critical point, se cubrieron de una capa fina de oro en un Fine Coat Ion Sputter-JFC-1100 para su observación en un microscopio JEOL JSM-6360 LV, y finalmente se determinaron las zonas a fotografiar.

En la figura 5 se muestra el diagrama del método empleado en este trabajo.

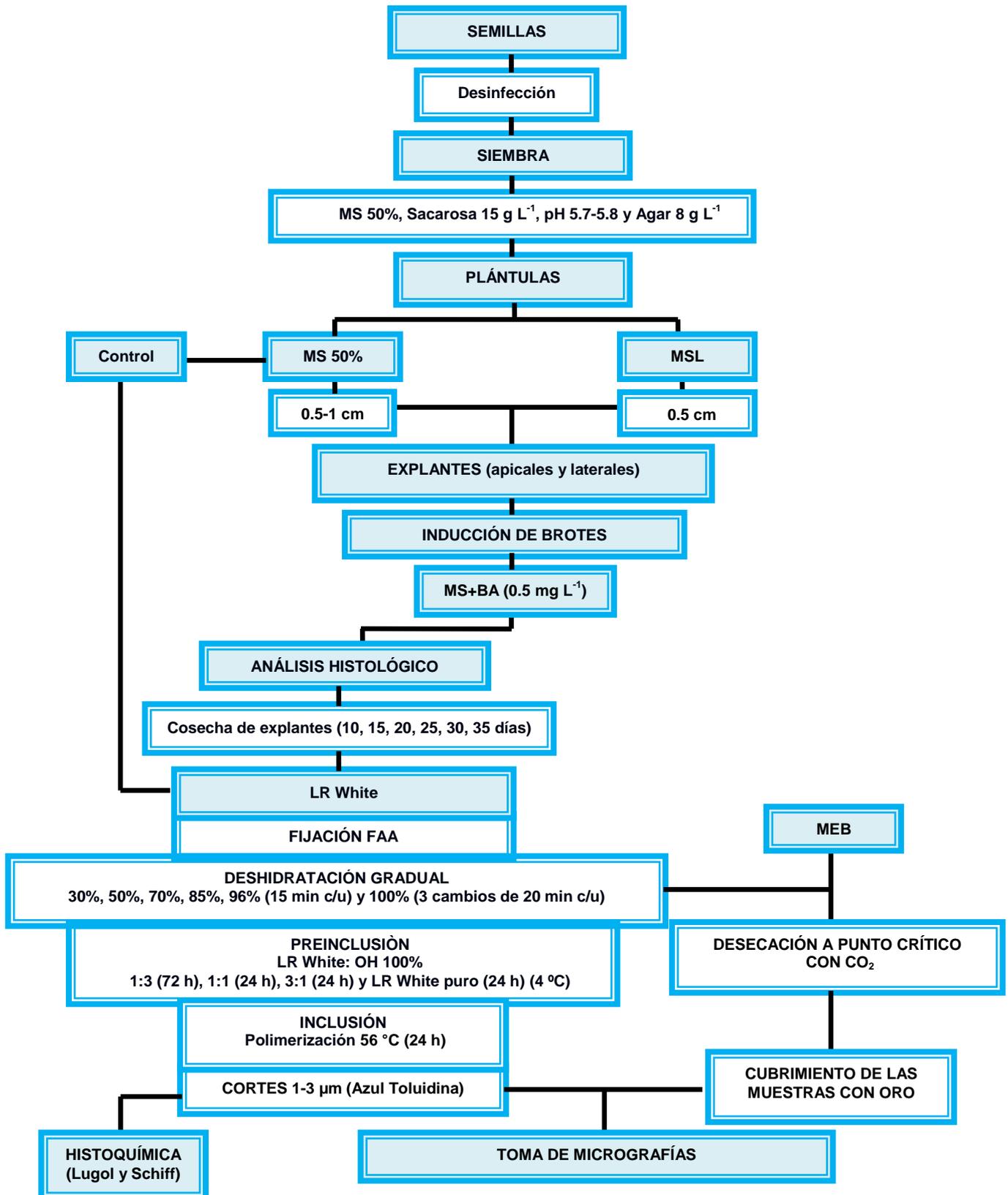


Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento realizado para el análisis histológico y micromorfológico de brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Germinación

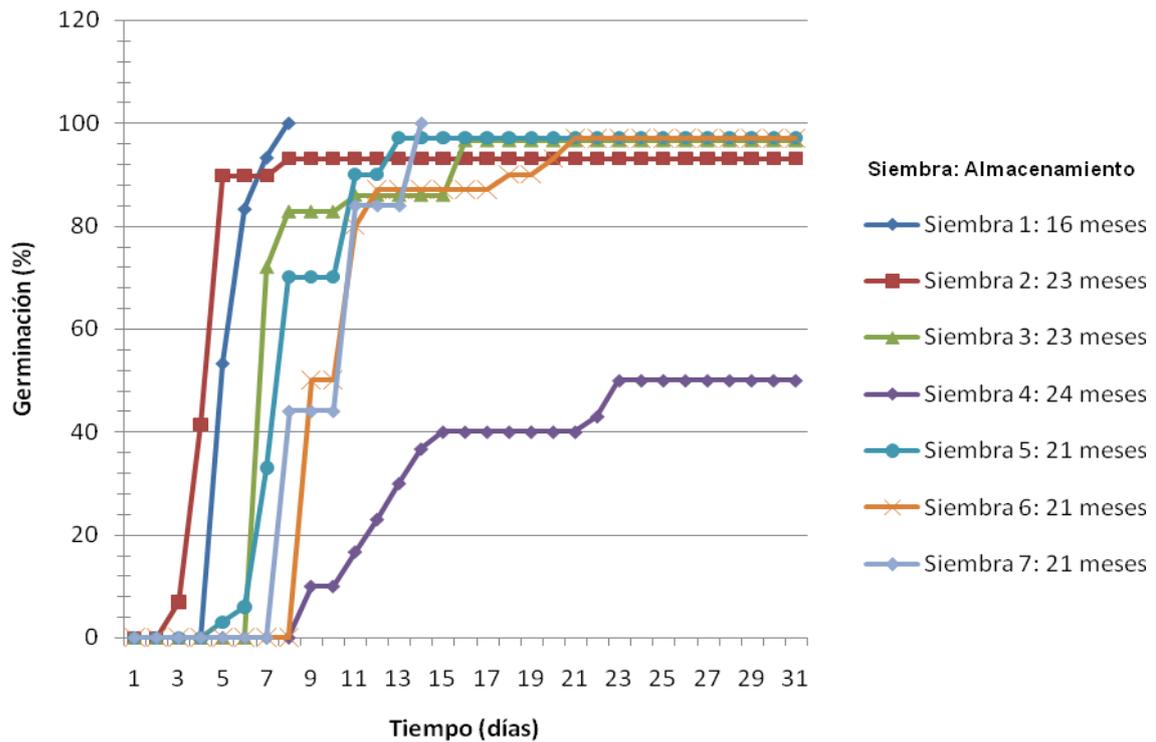
El inicio de la germinación fue variable, en la siembra 2 (23 meses de almacenamiento) (7%) ocurrió al tercer día, mientras que en las siembras 4 (24 meses de almacenamiento) (10%) y 6 (21 meses de almacenamiento) (50%) a los 9 días.

Sólo en las siembras 1 (16 meses de almacenamiento) y 7 (21 meses de almacenamiento) se alcanzó el máximo porcentaje (100%) entre los 8 y 14 días y en la siembra 4 (24 meses de almacenamiento) (50%) a los 30 días. Fue posible observar la influencia que tiene el tiempo de almacenamiento de las semillas con relación al porcentaje de germinación obtenido en las diferentes siembras.

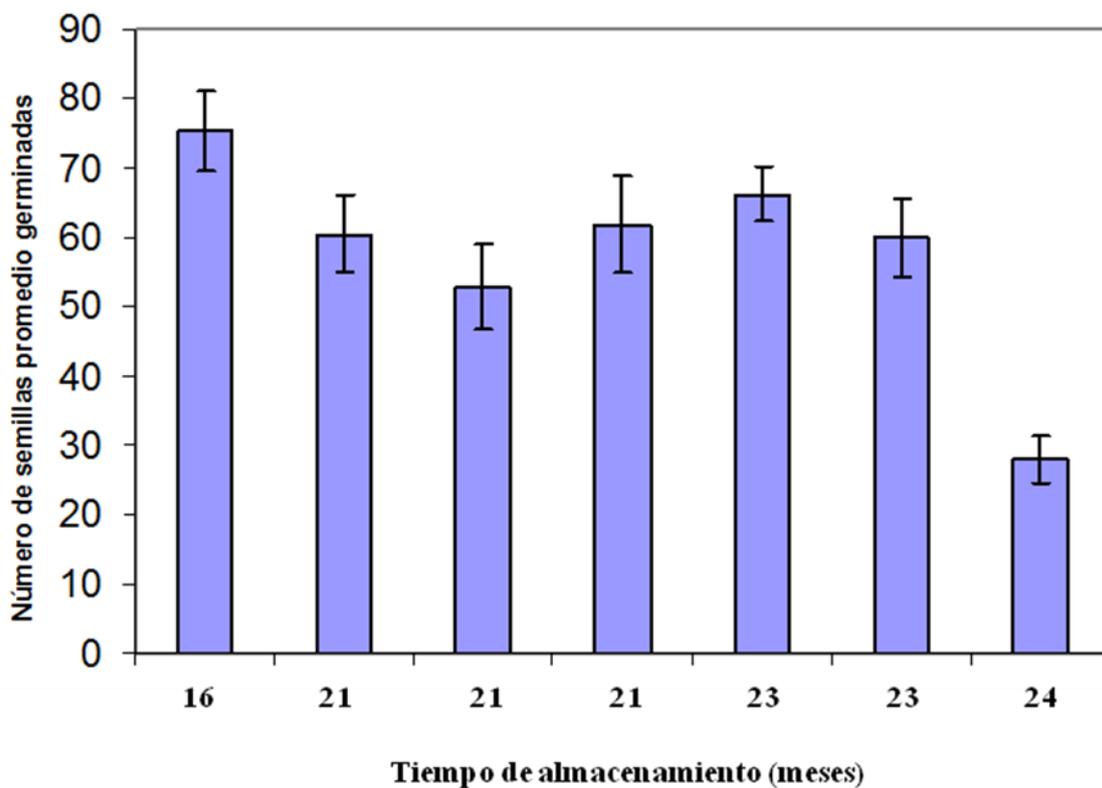
En semillas con 16, 21 y 23 meses de almacenamiento (4 °C) se obtuvo del 93 al 100% de germinación entre los 8 y 30 días. No obstante en semillas con 24 meses de almacenamiento (4 °C) se redujo drásticamente el porcentaje de germinación al 50% (30 días) (Gráfica 1).

Flores (2007) reportó para la misma especie un máximo del 90% de germinación en semillas almacenadas durante 6 meses y del 38.7% en aquellas que permanecieron almacenadas 50 meses.

Se realizó una ANOVA de una vía con un α de 0.05, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($F=7.397$, $p=.000$), en donde las siembras de 16, 21 y 23 meses de almacenamiento no presentaron diferencias estadísticamente significativas, siendo la siembra de 24 meses la única que presentó diferencias con respecto al resto de las siembras (Gráfica 2).



Gráfica 1. Germinación acumulada de semillas de *M. coahuilensis* en medio MS 50% de todos sus componentes.



Gráfica 2. Comparación de medias de semillas germinadas *in vitro* de *M. coahuilensis* en medio MS 50% de todos sus componentes.

Se han reportado porcentajes de germinación bajo las mismas condiciones *in vitro* para otras especies de cactáceas, tal es el caso de *Astrophytum ornatum*, el cual alcanzó el 82.2% después de 30 días de incubación (Mendoza, 2007) y *Echinocactus grusonii* donde se obtuvo el 96% después de 14 días de incubación (Martínez, 2007). Dichos porcentajes son similares a los obtenidos en *M. coahuilensis*, del 93 al 100% entre los 8 y 30 días, y altos con respecto a *M. pectinifera* (23%), aunque no se menciona el tiempo en el cual se alcanzó dicho porcentaje (Giusti *et al.*, 2002).

La temperatura y humedad son factores que afectan la viabilidad de las semillas durante su almacenamiento (Hartmann y Kester, 1975), probablemente estas condiciones influyeron en la viabilidad de las semillas de esta especie. Algunas semillas almacenadas a temperaturas entre 0 y 5 °C con una elevada humedad relativa pueden disminuir su viabilidad debido a que cuando son transferidas a temperaturas más altas incrementan su contenido de humedad que puede deteriorarlas (Hartmann y Kester, 1975; Bewley y Black, 1985).

Las condiciones óptimas para almacenar semillas de varias especies de cactáceas por un largo periodo de tiempo es desconocido sin embargo, muchas de ellas tienen un comportamiento de almacenamiento ortodoxo, lo cual permitiría almacenarlas a una baja temperatura (-18 °C) y humedad relativa (5%) manteniendo su viabilidad por años (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Por lo tanto la composición del medio de cultivo *in vitro*, el tiempo de almacenamiento de las semillas y factores como la temperatura, luz y humedad, son elementos importantes para que la germinación se efectúe de una manera más fácil y rápida.

2.- Desarrollo de plántulas

Como criterio de germinación se tomó en cuenta el rompimiento de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula (Baskin y Baskin, 1998). En promedio para las 7 siembras (Fig. 6a) el rompimiento de la cubierta ocurrió a los 6 días, en la zona dorsal tal como lo reporta Flores (2007) para la misma especie, emergiendo inicialmente la radícula y posteriormente un embrión esférico de aproximadamente 1.5 mm de longitud y de color blanco a verde pálido (Fig. 6b). A los 15 días el hipocótilo verde claro presentó forma cilíndrica, de aproximadamente 4 mm de largo por 3 mm de ancho.

Transcurridos 26 días la mayoría de éstos se torna café claro en el ápice y a los 33 días de edad comienzan a diferenciarse los cotiledones, cabe mencionar que el epicótilo aún no era visible (Fig. 6c). A los 41 días comenzó a ser evidente el epicótilo, las aréolas que sustentan a las primeras espinas y tricomas, a simple vista, parecieron ser un pequeño punto blanco (Fig. 6d), y una semana después se comenzó a observar la diferenciación de los tubérculos (Fig. 6e). Transcurridos 56 días la plántula presentó el epicótilo y el hipocotilo bien delimitado, donde el epicótilo adquirió color verde oscuro y las aréolas y espinas fueron más evidentes (Fig. 6f); a los 63 días la plántula alcanzó una longitud promedio de 7 mm (Fig. 6g).

Durante el proceso de la germinación se presentaron diversos eventos que no permitieron el completo desarrollo de las plántulas, lo que redujo a su vez el número de explantes. Dichos eventos se describen a continuación:

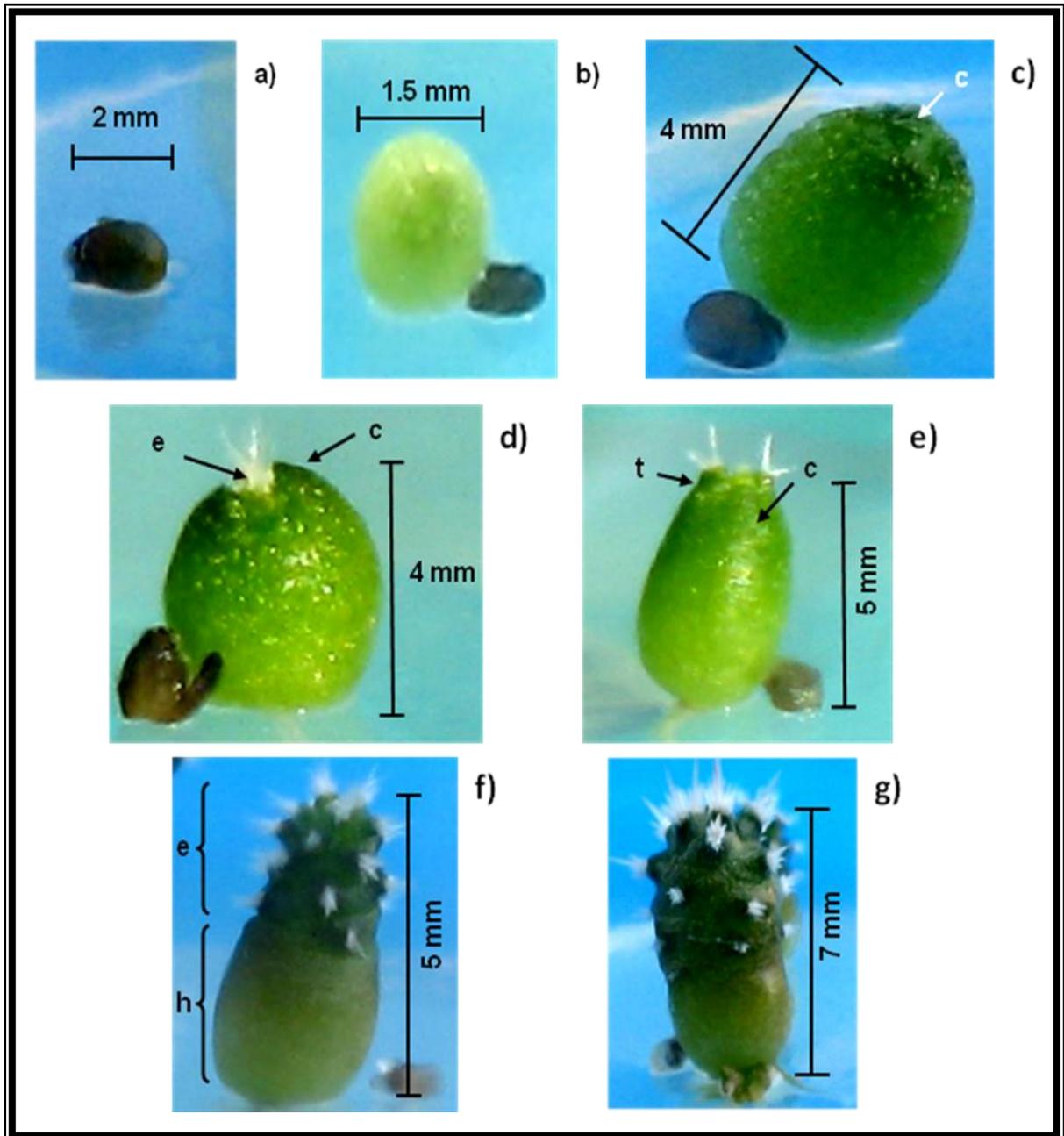


Figura 6. Secuencia de la germinación *in vitro*: **a)** Semilla, **b)** Embrión esférico (6 días), **c)** Hipocotilo cilíndrico y diferenciación de cotiledones (33 días), **d)** Surgimiento del epicótilo (41 días), **e)** Diferenciación de tubérculos (46 días), **f)** Plántula con epicótilo e hipocótilo (56 días), **g)** Plántula de 63 días. **Abreviaturas:** (c) cotiledones, (e) epicótilo, (h) hipocótilo, (t) tubérculos.

a) Hiperhidratación

Después de la germinación, de 3 a 7% de las plántulas se hiperhidrataron desorganizándose en callo (Fig. 7), dichos porcentajes fueron menores con respecto a lo reportado por Flores (2007) para la misma especie

(8.2 a 11.4%), y los reportados por Giusti *et al.* (2002) para *M. pectinifera* (62 %). Por lo tanto el medio utilizado para la germinación de semillas de *M. coahuilensis* se conservó con los mismos componentes iniciales. El callo presentó consistencia desmenuzable y regiones rojizas debido posiblemente a la presencia de betalainas tal como lo reporta Pérez Molphe Balch *et al.* (1998) para *M. candida*, *M. craigii*, *M. obscura*, *M. uncinata*, *M. formosa* y *M. sphacelata*.

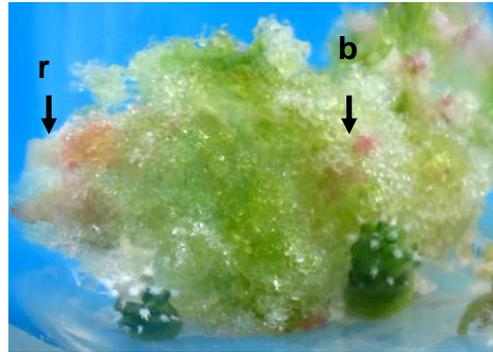


Figura 7. Hiperhidratación y formación de callo en una plántula germinada *in vitro*.
Abreviaturas: (r) raíz, (b) betalainas.

b) Oxidación

La oxidación reportada (3%), identificada por el color café rojizo de las plántulas (Fig. 8), fue relativamente baja comparada con el porcentaje máximo (38%) reportado por Flores (2007). Las plántulas que presentaron oxidación limitaron la obtención de explantes y por consiguiente las respuestas morfogénéticas.



Figura 8. Oxidación de una plántula germinada *in vitro* (Tomado de Flores, 2007).

Cuéllar *et al.* (2006) reportaron la oxidación en plántulas germinadas *in vitro* de *Hylocereus undatus* y Mendoza (2007) en explantes y brotes de *Astrophytum ornatum*, sin embargo, en ambos casos no se indica el porcentaje de oxidación.

Éste fenómeno puede deberse a las condiciones de temperatura, humedad e intensidad luminosa en las que se encontraba el cultivo, las cuales

podieron promover la formación de compuestos, como los fenólicos, reactivos al oxígeno y que posteriormente resultan en un estrés oxidativo (Cassells y Curry, 2001; Giusti *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2002).

3.- Elongación de plántulas (medio líquido)

Después de 9 meses y medio se transfirieron las plántulas germinadas a medio líquido en las cuales, al cabo de un mes de permanecer en el medio, se observó la elongación del epicótilo. Las plántulas alcanzaron en promedio 8 mm de longitud en contraste con aquellas que se dejaron en el medio sólido las cuales conservaron en promedio una longitud de 4 mm. Las plántulas que fueron transferidas a medio líquido (3 mm de longitud promedio) tuvieron un incremento promedio de 5 mm (Fig. 9).

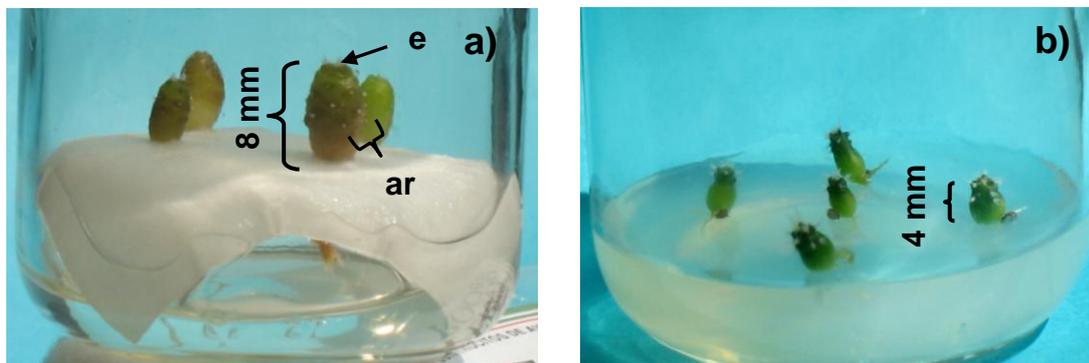


Figura 9. Comparación de la elongación de plántulas en: **a)** Medio MS líquido con puentes de papel filtro y en **b)** Medio MS 50%. En medio líquido se observa la elongación del epicótilo al doble de tamaño que en medio sólido y la separación entre sí de las aréolas. **Abreviaturas:** (**e**) epicótilo, (**ar**) aréolas.

Debido a que las cactáceas son plantas que por naturaleza almacenan agua, una de las desventajas presentadas al utilizar medio líquido con puentes de papel filtro fue la hiperhidratación de las plántulas (Fig. 10), por lo que se sugiere que el tiempo máximo de permanencia de las plántulas de *M. coahuilensis* en medio líquido sea de 15 a 20 días, pues el tiempo propuesto

por Díaz (2007) para *Thelocactus rinconensis* de un mes o mes y medio para evitar éste desorden fisiológico no es el adecuado para la especie en estudio.

El porcentaje de hiperhidratación para *M. coahuilensis* (7.2 %) fue bajo con respecto a lo reportado por Díaz (2007) para *T. rinconensis* siendo éste de un 17%. Ante estos síntomas de hiperhidratación y una elongación asincrónica de las plántulas de *M. coahuilensis*, se sugiere que estas sean retiradas del medio líquido de acuerdo a la respuesta de elongación o antes del tiempo máximo sugerido.

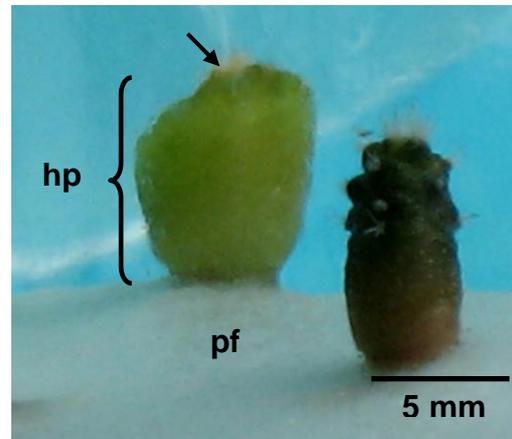


Figura 10. Hiperhidratación de una plántula en medio líquido con puente de papel filtro. Se observa el hipocótilo hiperhidratado y la reducción del epicótilo (flecha). **Abreviaturas:** (pf) puente de papel filtro, (hp) hipocótilo hiperhidratado.

4.- Respuestas morfogénéticas

a) Plántulas en medio líquido

Aproximadamente después de dos meses, plántulas elongadas en medio líquido que fueron transferidas a su medio inicial (MS 50%) formaron brotes por organogénesis directa a través de la activación de yemas preexistentes (aréolas), tal como lo reporta Díaz (2007) para *T. rinconensis*. Es posible distinguir en los brotes los tubérculos y en el ápice de éstos las espinas, las radiales de color blanco y más pequeñas que la espina central de color café claro. Los brotes surgieron de la parte apical, donde están situadas las aréolas (Fig. 11). Esta respuesta probablemente es debida a la estimulación de las aréolas a través del medio líquido que probablemente hizo más disponibles a

los nutrimentos y que junto con las hormonas endógenas provocaron que existiera una mayor proliferación de brotes.

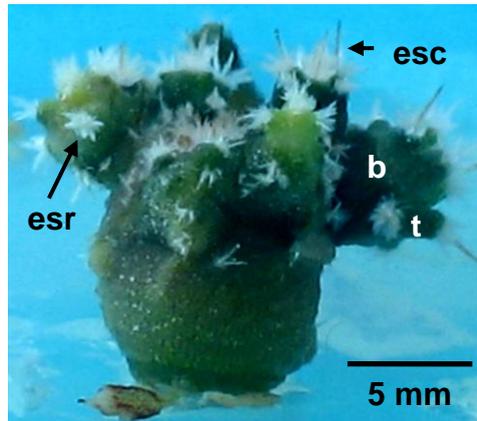


Figura 11. Activación de las aréolas en plántulas elongadas en medio MSL: brotes distribuidos en la parte apical, en los que se distinguen los tubérculos y en ellos las espinas radiales y centrales. **Abreviaturas:** (b) brotes, (t) tubérculo, (esr) espinas radiales, (esc) espina central.

b) Explantes apicales

Después de 15 días en el medio de inducción, en la base de los explantes apicales se desarrolló callo verde traslúcido y de consistencia desmenuzable (Fig. 12a) y 5 días después, alrededor de un 70% de los explantes, se comenzaron a elongar en su polo apical, cicatrizando en la zona de corte y formando raíces en la base, constituyendo una planta completa (Fig. 12b).

Los tipos de explante (apical y lateral) al ser segmentos de la plántula, llevan consigo zonas meristemáticas, las aréolas. El meristemo vegetativo (MV) se localiza en el ápice de los tubérculos del explante (TE) y el meristemo floral (MF) en la base o axila de los mismos. Ambas zonas potencialmente pueden responder a la formación de brotes.

En el presente estudio el MF de los explantes apicales respondieron a la formación de brotes tal como lo reportó Flores (2007). Después de 4 a 5 semanas de inducción se observaron diminutas protuberancias en la base o

axila de los TE, las cuales continuaron su desarrollo, y entre la séptima y décima semanas pudieron identificarse como brotes definidos, caracterizándose por presentar una forma globosa con pequeños tubérculos (Tubérculos del Brote: TB).

El MV no formó brotes, probablemente debido a que las auxinas endógenas inhibieron el crecimiento de las yemas laterales promoviendo así que se conservara la dominancia apical.

c) Explantes laterales

Las respuestas morfogénicas observadas fueron la formación de callo, raíces y brotes.

El callo se originó a partir de la desorganización de brotes previamente formados que se hiperhidrataron (Fig. 12c). Las raíces se formaron (20 días) en la zona de corte en contacto con el medio de cultivo y en la base de los explantes, correspondiente al extremo donde se ubicaba la raíz principal de la plántula (Fig. 12d).

La formación de callo, la dominancia apical y la rizogénesis son producto del efecto de las auxinas (Gaspar *et al.*, 1996; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999) sin embargo, para estas respuestas no fue necesario adicionarlas y muy probablemente las respuestas morfogénicas fueron producto de la actividad de las auxinas endógenas (producidas por el propio tejido).

En los explantes laterales no se observó la formación de brotes a partir de los MF sin embargo, Flores (2007) registró esta respuesta entre la cuarta y sexta semana de incubación en el medio de inducción.

Como en el resto de las especies del género *Mammillaria*, la distribución de las flores en el tallo de *M. coahuilensis* se concentra cerca del ápice, lo cual

implica que cerca de esta zona los MF están activos. Es posible que en los explantes apicales cultivados *in vitro* con BA se manifestara esta predisposición genética al formar brotes que surgieron de los MF. Al contrario, en los explantes laterales, al estar más lejos del ápice, esto no ocurrió, formándose los brotes a partir de los MV, aunado al efecto del rompimiento de la dominancia apical.

Sin embargo, Flores (2007) sí reporta la formación de brotes a partir de los MF en explantes laterales, por lo que es posible que en el presente experimento se pudieron haber formado en concentraciones más altas de BA y/o mayor tiempo de inducción o por la edad fisiológica de los tejidos.

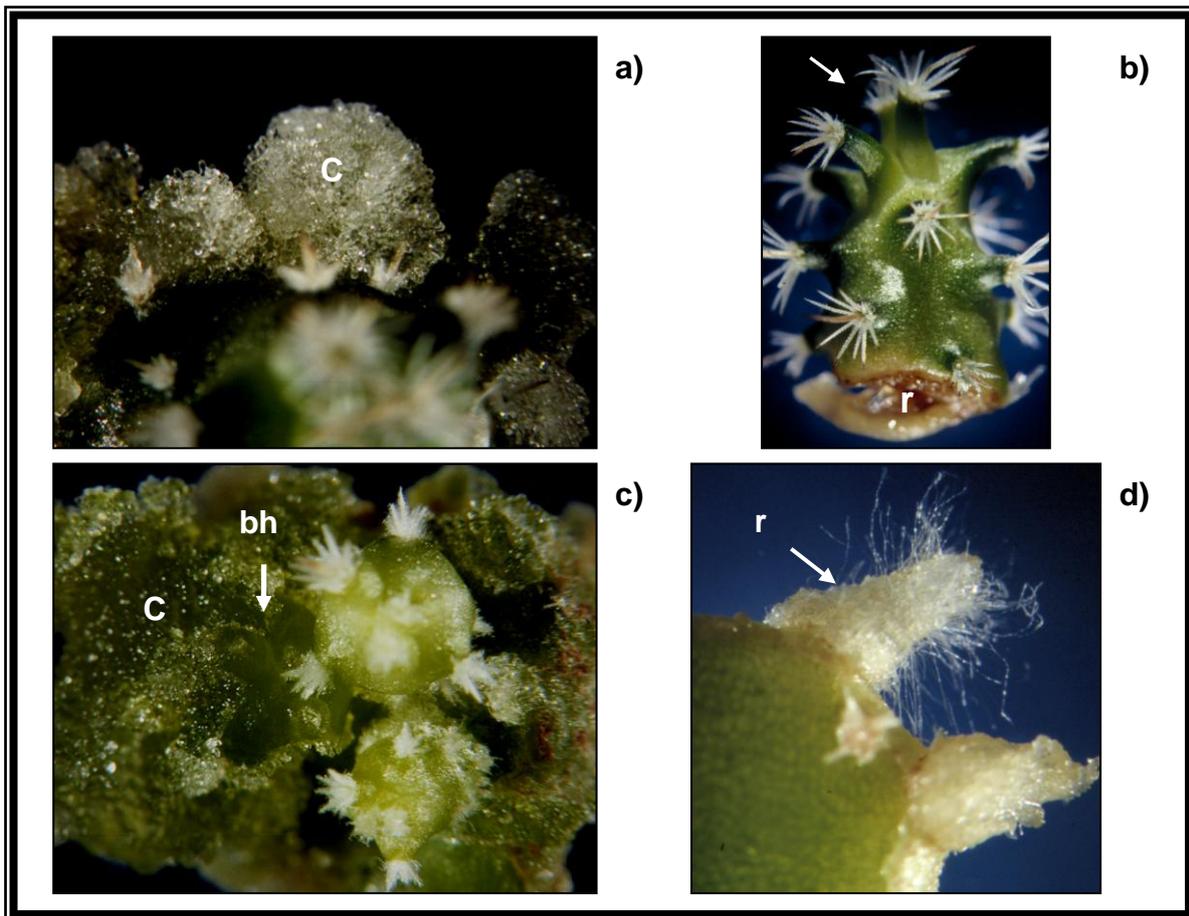


Figura 12. Respuestas morfogénicas en explantes apicales y laterales: Explantes apicales, **a)** formación de callo en la zona de corte, **b)** raíz en la base del explante y elongación por dominancia apical (flecha). Explantes laterales, **c)** formación de callo a partir de la desorganización de un brote hiperhidratado, **d)** raíz en los costados. **Abreviaturas:** (c) callo, (r) raíz, (bh) brote hiperhidratado.

En contraste, la formación de brotes a partir del MV en este explante, ocurrió aproximadamente después de 10 días de inducción, la respuesta ocurrió en menos tiempo con respecto a la formación de brotes del MF, donde el explante tiene que permanecer de cuatro a seis semanas hasta que está fisiológicamente listo para la expresión conspicua de dicha respuesta. La formación de brotes a partir del MV en el explante lateral es producto del rompimiento de la dominancia apical y por ende de la expresión o brotación de las yemas laterales estimuladas por la BA. Es importante mencionar que la respuesta del explante se encuentra determinada también por otros factores como el medio de cultivo (nutrimentos), el tipo de explante así como las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad) (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

En el cultivo *in vitro* la hiperhidratación fue un problema frecuente presentándose no solo en las plántulas sino también en los brotes regenerados (12%), tal como lo reportó Mendoza (2007) para *A. ornatum* en donde más del 50% de los brotes regenerados con BA/ANA presentó este desorden fisiológico. Así mismo Giusti *et al.* (2002) reportó para *Peleciphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera* porcentajes de hiperhidratación de 63.7% y 62.4% en diferentes combinaciones de 1-phenyl-3-(1-2-3-thidiazol-5-YL) urea Thidiazuron (TDZ) con 2,4-D, porcentajes que son muy altos en comparación con lo reportado para la especie de estudio.

Un tejido puede oxidarse debido a que cuando es herido libera una gran cantidad de compuestos que intervienen en el proceso de cicatrización y defensa en contra de patógenos, la mayoría de los cuales pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, y muchos de estos compuestos al estar en

contacto con la atmosfera tienden a ser oxidados causando un oscurecimiento del tejido (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

En *M. coahuilensis* se observó la oxidación en explantes apicales y laterales (Fig. 13), en ambos el porcentaje fue de (4%).

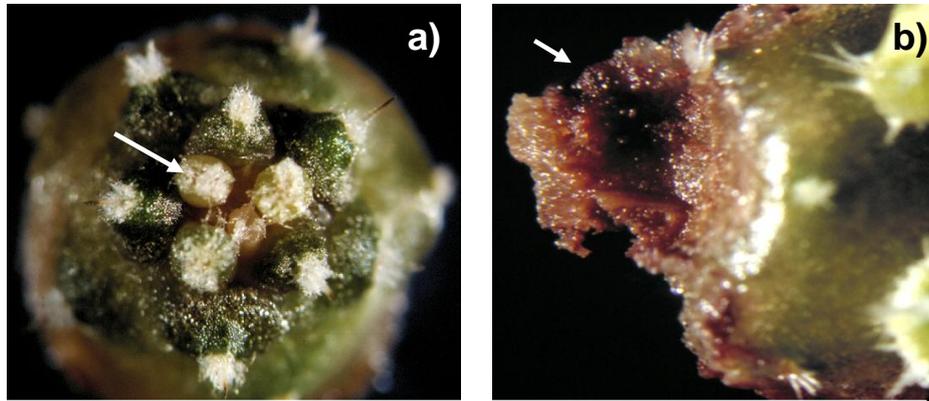


Figura 13. Oxidación (flecha) en explantes: **a)** apicales, **b)** laterales

5.- Análisis histológico del tallo de una plántula germinada *in vitro*

a) Epidermis

La epidermis es un tejido derivado de la túnica (Fletcher, 2002) que entre otras funciones, a través de los estomas, en las cactáceas regula el movimiento del dióxido de carbono y el oxígeno con una mínima pérdida de agua (Mauseth, 1984), una característica vital para este tipo de plantas que habitan en regiones áridas.

La epidermis de *M. coahuilensis* presentó estomas de tipo paracítico. El complejo estomático está formado por dos células guarda u oclusivas y entre ellas el ostiolo y dos pares de células subsidiarias o acompañantes orientadas en paralelo al eje mayor del estoma (Fig. 14a) y la cámara subestomática. El complejo de células guarda y células subsidiarias están localizados al mismo nivel que las células epidérmicas (Fig. 14b).

Estos tipos de estomas han sido reportados por Loza *et al.*, 2003; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2005; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2007 para *Stenocereus*

queretaroensis, *Cephalocereus senilis* y *Cephalocereus columna-trajani*, respectivamente.

Las células epidérmicas en *M. coahuilensis* tienen paredes sinuosas (Fig. 14a) tal como ocurre en *Mammillaria brandegeei* que de acuerdo a Mauseth (1984) es por medio de éstas que las células se expanden y contraen para que las cactáceas puedan absorber y perder agua.

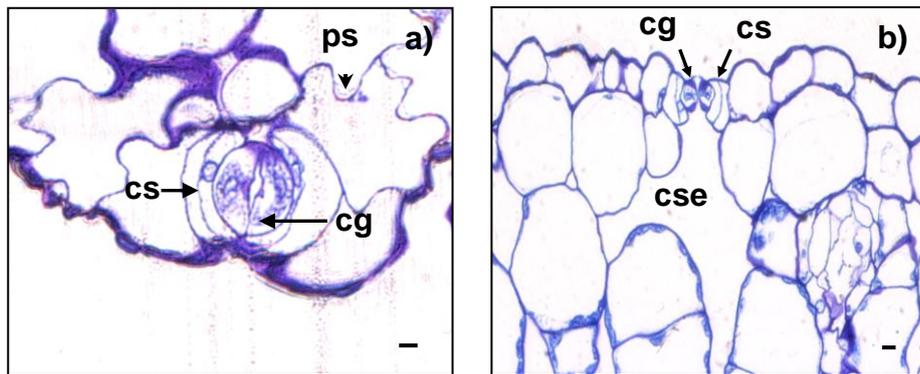


Figura 14. Estoma paracítico en la epidermis de *M. coahuilensis*: **a)** Corte transversal del estoma formado por dos células guarda en las cuales se observa el núcleo y entre ellas la cavidad formada, el ostiolo, y dos paredes de células subsidiarias. Las paredes de las otras células epidérmicas son sinuosas, **b)** Corte longitudinal en donde se observan células subsidiarias y células guarda al mismo nivel que las otras células epidérmicas y la cámara subestomática. **Abreviaturas:** (cg) células guarda, (cs) células subsidiarias, (ps) paredes sinuosas, (cse) cámara subestomática. **Barra:** a y b= 10 μ m.

b) Laticíferos

Los laticíferos son células que secretan y almacenan látex, un fluido que es difícil de definir debido a su composición física y química variable, puede contener sustancias las cuales son tan diversas como aceites, resinas, alcaloides, enzimas, cristales, almidón y ácidos orgánicos (Esau, 1977; Fahn, 1990); su consistencia es “lechosa” y puede ser blanco, negro, de colores brillantes o transparentes. Estas células secretoras pueden ser usualmente más grandes que las células del parénquima (Mauseth, 1978); que resultan de

la lisis celular (espacios lisógenos) o de la separación de una célula con otra (espacios esquizógenos) formando una cavidad (Esau, 1977).

Al seccionar el tallo con los tubérculos de *M. coahuilensis*, se observó la secreción de látex de consistencia lechosa y blanquecina (Fig. 15a) y en los cortes histológicos se identificó que estos laticíferos son de tipo esquizógeno (Fig. 15b).

En las cactáceas existe látex en varios miembros de los géneros *Coryphantha*, *Leuchtenbergia* y *Mammillaria* (Bravo-Hollis, 1978), para éste último se han reportado en *M. heyderi*, *M. applanata*, *M. hemispherica*, *M. meiacantha* (Boke, 1953), *M. sartorii* (Mauseth, 1978) y *M. magnimamma* (Mauseth, 1983b).

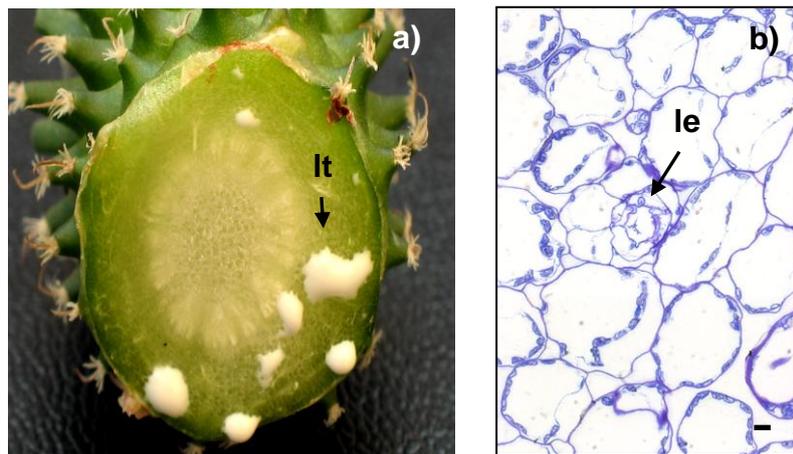


Figura 15. **a)** Corte transversal del tallo de *M. coahuilensis* en donde se muestra las gotas de látex (Imagen: Patricia Olgún), **b)** Corte transversal de un laticífero esquizógeno. **Abreviaturas:** (lt) látex, (le) laticífero esquizógeno. **Barra:** b= 10 μ m

c) Meristemas

➤ Meristemo apical

El meristemo apical del tallo consiste en un domo de células que se encuentran en constante división celular teniendo a los costados primordios foliares en los que se reconoce el procambium. De acuerdo a Boke (1953) los

primordios foliares se ensanchan en su base y forman los tubérculos, los cuales se arreglan en espiral en una secuencia acropétala, es decir, que se forman del ápice hacia la base, característica distintiva en las cactáceas.

El meristemo de la aréola aparece al mismo tiempo en que se forma el primordio foliar, se origina directamente de los costados del meristemo apical y llega a ser visible como una depresión tal como lo reporta Boke (1953, 1958) para *Mammillaria heyderi* y *M. lasiacantha*. En el domo meristemático fue posible distinguir la zonación túnica-carpus con una capa biestratificada que presentó divisiones celulares orientadas anticlinalmente formando a la túnica, mientras que las células que se encontraban por debajo de ésta, que presentaron divisiones tanto anticlinales como periclinales, formaron el corpus (Fig. 16a).

➤ **Meristemo dimórfico**

Acorde a lo que señala Mauseth (2006) en las *Mammillarias* se presentan dos zonas meristemáticas, una en el ápice del tubérculo que únicamente produce espinas y otra en la axila del tubérculo que produce flores y ramas laterales, en *M. coahuilensis* se observó esta disposición (Fig. 16b), el meristemo vegetativo (MV) en el ápice del tubérculo (Fig. 16c) y el meristemo floral (MF) en la axila (Fig. 16d).

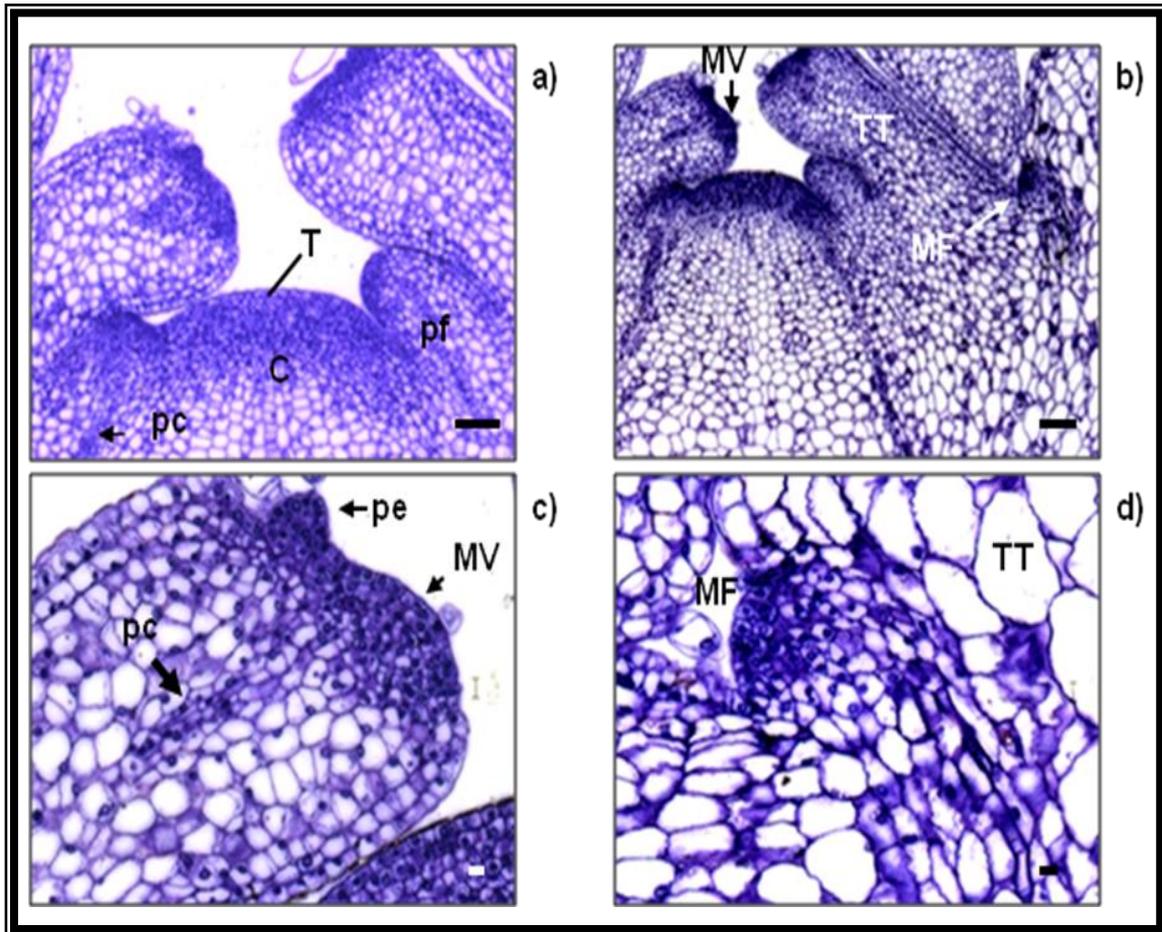


Figura 16. **Meristemo apical y dimórfico del tallo:** Cortes longitudinales, **a)** Meristemo apical que muestra una forma en domo con túnica biestratificada, corpus y primordios foliares a los costados en los que se observa una hebra de procambium, **b)** Meristemo dimórfico en donde se observa el meristemo vegetativo en el ápice de un tubérculo y el meristemo floral en la axila de otro, **c)** Ápice del tubérculo mostrando el procambium y el meristemo vegetativo con un primordio de espina, **d)** La axila de un tubérculo mostrando el meristemo floral. **Abreviaturas:** (pc) procambium, (pe) primordio de espina, (T) túnica, (C) corpus, (MV) meristemo vegetativo, (MF) meristemo floral, (TT) tubérculo del tallo. **Barra:** a= 50 μ m, b= 100 μ m, c y d= 10 μ m.

6.- Desarrollo de los brotes regenerados *in vitro*

a) Aréola vegetativa

En los explantes laterales la activación de las aréolas vegetativas ocurrió en promedio a los 10 días de iniciado el cultivo en el medio de inducción MS + BA (0.5 mg L^{-1}) y se caracterizó por la proliferación de numerosas espinas y tricomas debido al efecto de la citocinina (Fig. 17a). Este evento precedió al surgimiento de los nuevos brotes en el ápice del TE. En la figura 17b se puede

observar cómo a los 10 días de inducción ya comenzaban a emerger los primordios foliares del nuevo brote, y a los 15 días fue fácil distinguir a simple vista a los diminutos brotes de color verde más claro con respecto al explante, con sus primordios foliares que desplazaron hacia los costados a las espinas y tricomas del TE dejándolos en la base del brote (Fig. 17c). Después de 10 días el brote continuó creciendo y alcanzó la superficie, provocando al mismo tiempo un ensanchamiento en el ápice del TE, quedando nuevamente los tricomas en la base del brote (Fig. 17d).

Probablemente el MV en el TE, por efecto de la interacción de las hormonas endógenas y exógenas añadidas al medio (citocinina), respondió generando primordios foliares a partir del meristemo que normalmente genera las espinas. Lo referido anteriormente es similar a lo reportado por Mauseth (2006), quien menciona que la zona meristemática que se encuentra en el ápice de los tubérculos en el género *Mammillaria*, con altos niveles de citocinina, puede ser inducida a formar primordios foliares.

En los cortes histológicos se observó el ápice del TE formado por células parenquimatosas y en la parte superior uno de los TB (Fig. 17e). Los brotes presentaron un meristemo apical (MAB) en forma de domo con el arreglo túnica-corpora, característico de las angiospermas. En ambos lados de éste se formaron los primordios foliares que posteriormente se desarrollaron en los TB de forma cónica y de distribución en espiral (Fig. 17f). Los brotes continúan su desarrollo y aproximadamente entre los 30 y 35 días de incubación alcanzan en promedio una longitud de 4 mm.

Se observó histológicamente que existe una conexión entre el brote y el explante a través de haces vasculares y que la zona que está en contacto con

el medio de cultivo es un parénquima de almacenamiento (Fig. 18a). En esta zona se realizó la prueba histoquímica con reactivo de Shiff y se identificó una gran cantidad de polisacáridos insolubles (PI) en paredes celulares y algunos cuerpos dentro de la célula que correspondieron a almidón (Fig. 18b).

Para identificar el almidón se realizó la prueba con Lugol la cual fue dudosa, debido a que el grosor de los cortes fue muy delgado (2 μm), sin embargo, su presencia se corroboró con microscopia de polarización con la cual se identificaron las cruces de malta características de éste (Fig. 18c).

Estos materiales de reserva constituyen una fuente de energía que será utilizada para la formación y desarrollo de los brotes.

En los explantes laterales los brotes se formaron solamente en las aréolas vegetativas, situadas en el ápice de los tubérculos del explante.

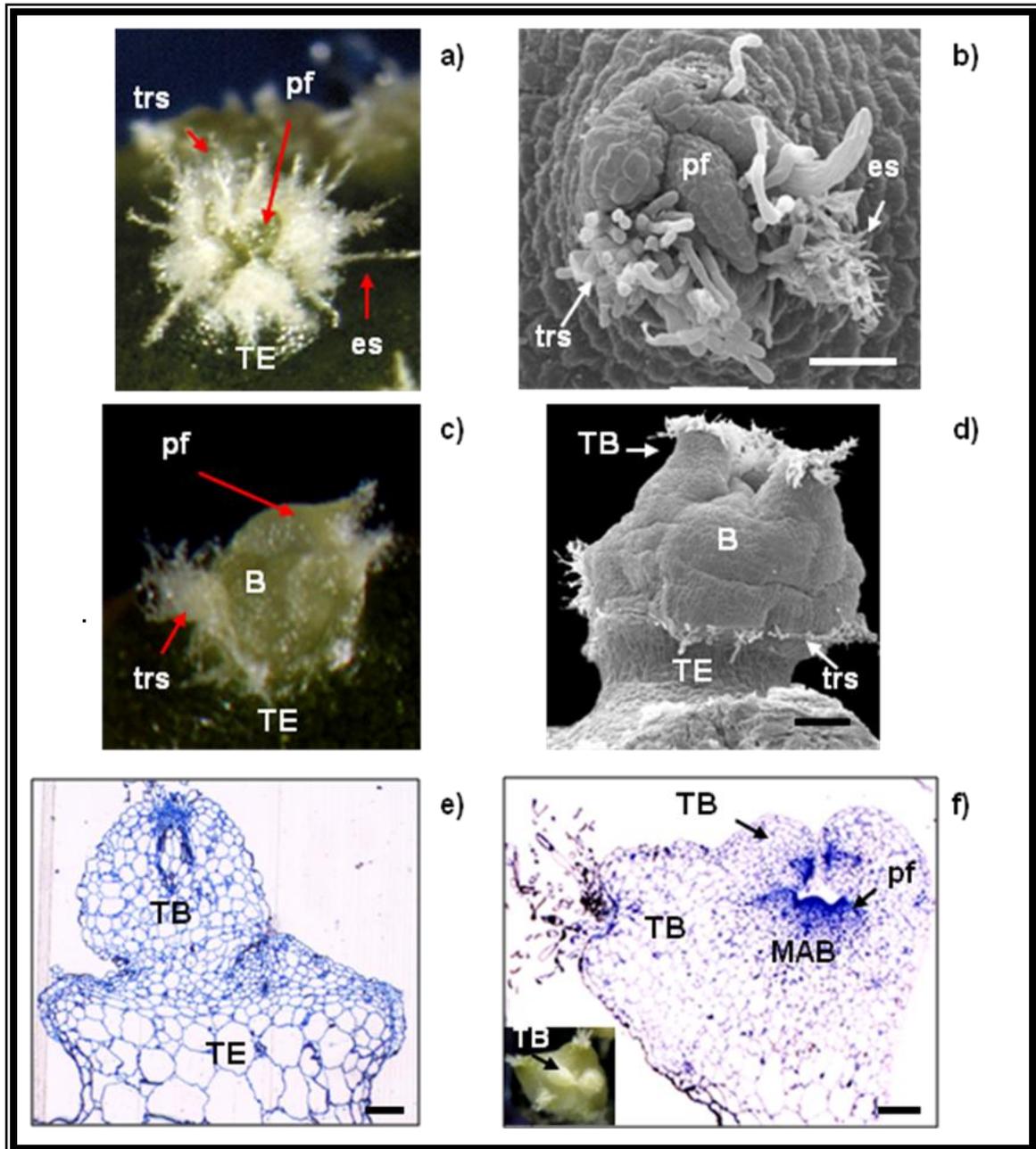


Figura 17. **Morfología del origen y desarrollo de un brote regenerado *in vitro* por activación de la aréola vegetativa:** **a)** Aréola con numerosos tricomas y espinas que rodean al primordio foliar del nuevo brote, **b)** Vista apical del tubérculo del explante que muestra el primordio foliar, tricomas y espinas (MEB) (10 días), **c)** Brote con primordios foliares y en su base los tricomas del tubérculo del explante (15 días), **d)** Brote con tubérculos conspicuos y ensanchamiento en el ápice del tubérculo del explante (MEB), **e)** Corte longitudinal del ensanchamiento del ápice del tubérculo del explante formado por células parenquimatosas y en la parte superior un tubérculo del brote, **f)** Corte longitudinal del meristemo apical de un brote con primordios foliares y tubérculos a los costados (25 días).

Abreviaturas: (trs) tricomas, (pf) primordio foliar, (es) espina, (B) brote, (TB) tubérculo del brote, (TE) tubérculo del explante, (MAB) meristemo apical del brote. **Barra:** b, e y f = 200 μ m, d = 500 μ m.

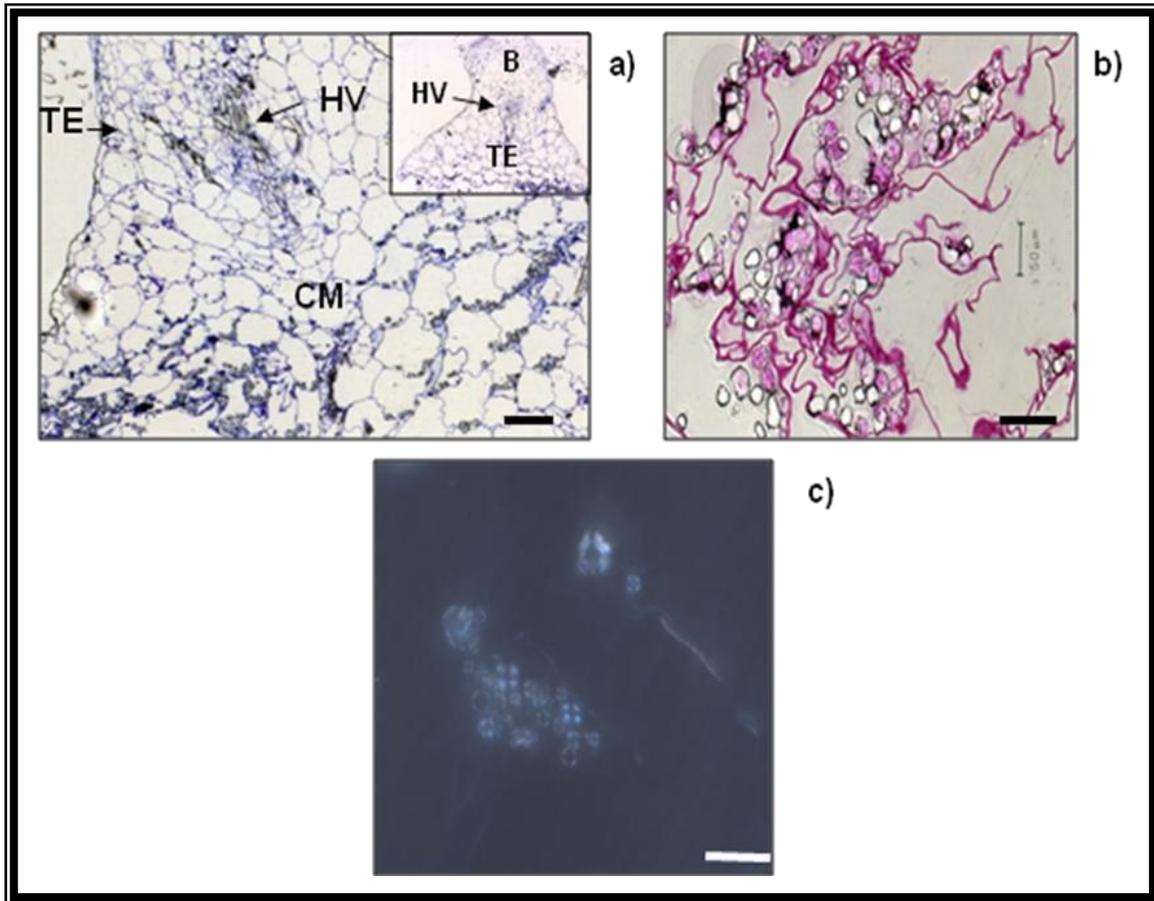


Figura 18. **Morfología del tubérculo del explante y la zona de contacto con el medio de cultivo:** Cortes longitudinales, **a)** Tubérculo donde se observan haces vasculares que conectan con el brote y parénquima de almacenamiento en la zona de contacto con el medio, **b)** Parénquima de almacenamiento mostrando polisacáridos insolubles (Shiff), **c)** Gránulos de almidón, observados bajo luz polarizada. **Abreviaturas:** (B) brote, (TE) tubérculo del explante, (HV) haces vasculares, (CM) zona de contacto con el medio. **Barra:** a= 200 μm, b= 50 μm y c= 25 μm.

b) Aréola floral

La activación de las aréolas florales en los explantes apicales se manifestó por la presencia de diminutas protuberancias en forma de domo, en cuyo ápice se desarrollaron tricomas. Estos domos se ubicaron en la base (axila) de los tubérculos del explante (Fig. 19 a y b). De manera similar a lo reportado por Flores (2007), la aparición de estas estructuras ocurrió entre la cuarta y quinta semana de inducción.

Al realizar los cortes histológicos de las protuberancias, se observó que por debajo del ápice de dichos abultamientos se encontraban brotes en desarrollo, los cuales presentaron un meristemo apical bien definido con sus primordios foliares (Fig. 19 c y d). Lo anterior indica que previo al reconocimiento visual de las protuberancias ya existió un proceso de diferenciación de los brotes promovido por la citocinina.

Posteriormente un primordio foliar emergió (Fig. 20a), desplazando los tejidos de la protuberancia y formando un reborde, el cual rodeó junto con los tricomas, al primordio foliar (Fig. 20b).

Al remover los tejidos circundantes al primordio foliar, se observó que el resto de los primordios foliares se encontraban ya en formación (Fig. 20c). A nivel celular este detalle se aprecia claramente identificando el MAB y los primordios foliares, uno de los cuales aumenta de tamaño y emerge hacia la superficie (Fig. 20d), una característica distintiva con respecto a la emergencia de los primordios foliares en la aréola vegetativa, en la cual todos los primordios emergen prácticamente al mismo tiempo sin que haya un aumento considerable en el tamaño de uno de ellos.

Conforme ocurrió el desarrollo de los brotes, los primordios foliares continuaron emergiendo hacia la superficie (Fig. 20e) y entre la séptima y décima semana se identificó conspicuamente el brote de forma globosa, con tubérculos que se acomodan en secuencia espiralada (Fig. 20f).

En los explantes apicales la formación de brotes ocurrió exclusivamente en las aréolas florales, ubicadas en la base (axila) de los tubérculos del explante.

En los trabajos histológicos de Duval (1995), Rubluo *et al.* (2002) y Poljuha *et al.* (2003) no existe una secuencia completa del desarrollo de los brotes.

Para *M. san-angelensis* la formación de brotes ocurrió a través de las aréolas florales. Sin embargo, a pesar de que en este reporte se hace referencia a la aréola floral como meristemo axilar del cual se generan brotes, los cortes presentados permiten realizar una interpretación somera del origen y desarrollo de estas estructuras. Se reitera nuevamente la necesidad de realizar más estudios sobre las estructuras que son generadas a través del CTV, con la finalidad de tener bases más sólidas que permitan optimizar la propagación y conservación de estas especies.

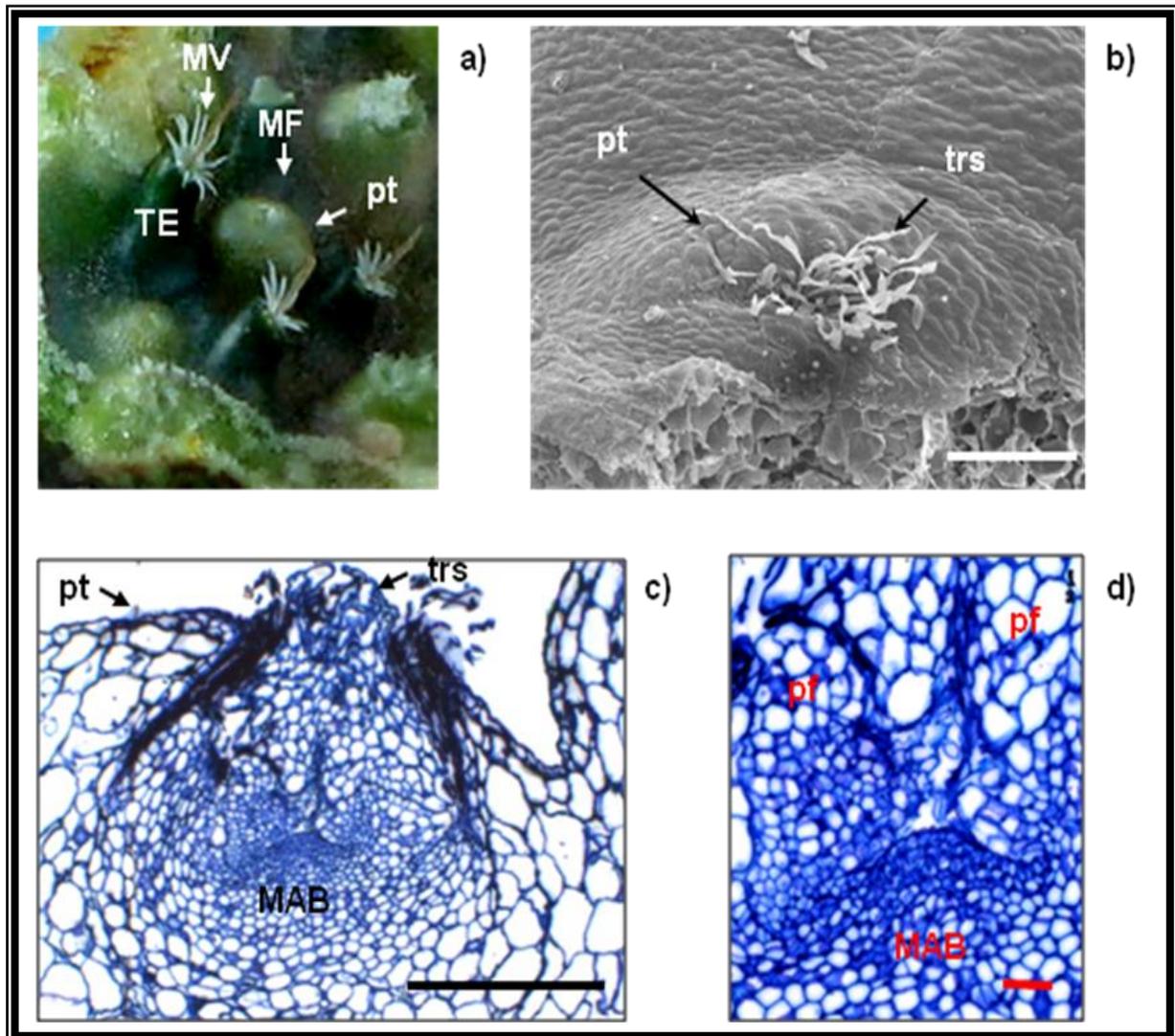


Figura 19. **Morfología del origen de un brote regenerado *in vitro* por activación de la aréola floral:** **a)** Protuberancia en forma de domo ubicada en la base (axila) del tubérculo del explante (Tomada de Flores, 2007), **b)** Protuberancia en cuyo ápice se desarrollan tricomas, **c)** Corte transversal de la protuberancia que muestra los tricomas que cubren el meristemo que potencialmente formará un brote, **d)** Meristemo del brote que muestra células pequeñas formando un domo y a sus costados primordios foliares. **Abreviaturas:** (MV) meristemo vegetativo, (MF) meristemo floral, (TE) tubérculo del explante, (MAB) meristemo apical del brote, (trs) tricomas, (pt) protuberancia, (pf) primordio foliar. **Barra:** b= 500 μ m, c= 400 μ m y d= 50 μ m.

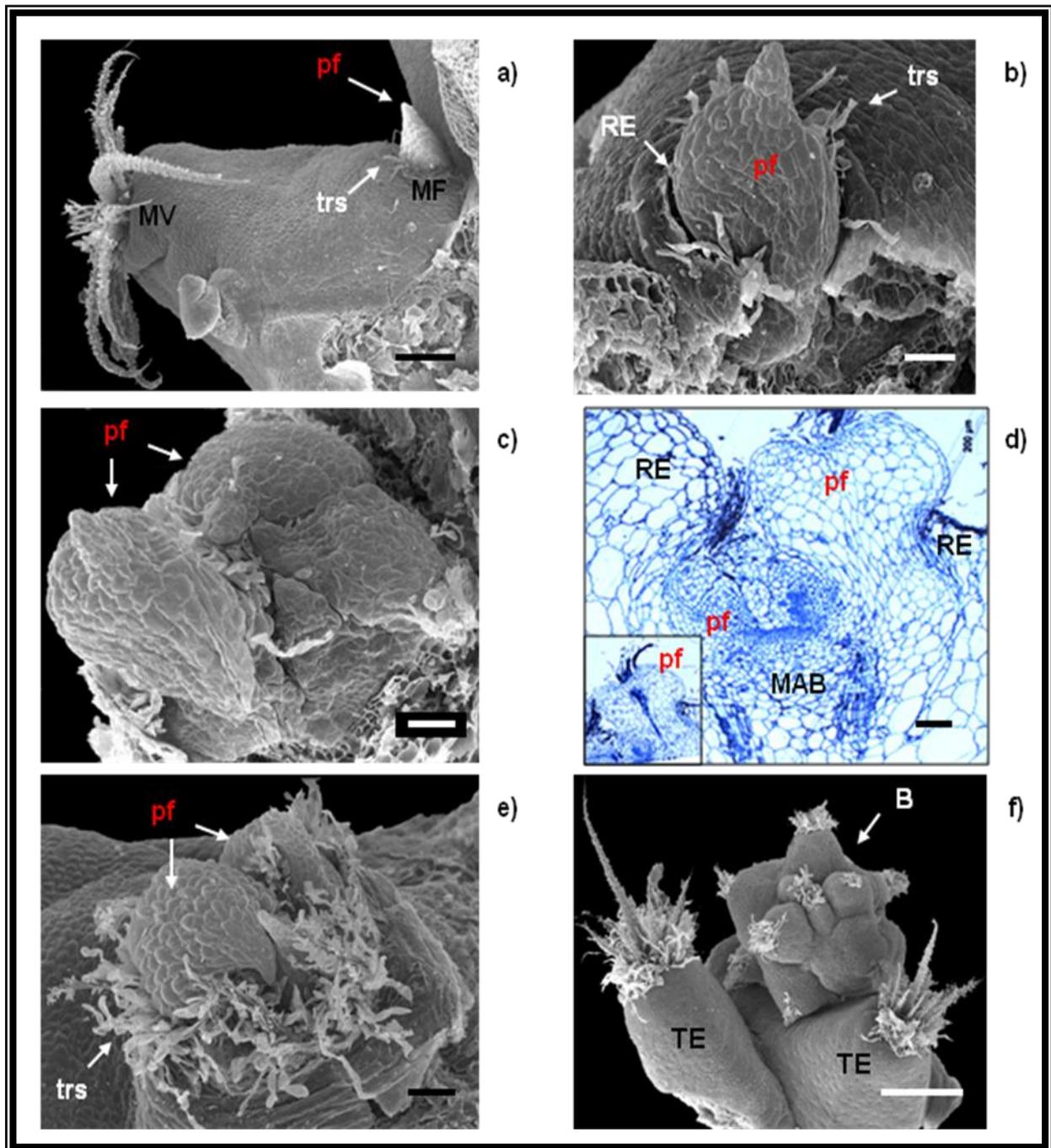


Figura 20. **Morfología del desarrollo de un brote regenerado *in vitro* por activación de la aréola floral:** **a)** Emergencia de un primordio foliar a partir del meristemo floral, **b)** Detalle del primordio foliar emergiendo de la aréola, **c)** Detalle de los primordios foliares del brote, **d)** Meristemo apical del brote formando primordios foliares uno de los cuales aumenta de tamaño y crece hacia la superficie (4-5 semanas), **e)** Emergencia de los primordios foliares, se observan numerosos tricomas, **f)** Brote de forma globosa con tubérculos arreglados en secuencia espiralada (7-10 semanas). **Abreviaturas:** (MV) meristemo vegetativo, (MF) meristemo floral, (TE) tubérculo del explante, (RE) reborde, (MAB) meristemo apical del brote, (B) brote, (trs) tricomas, (pf) primordio foliar. **Barra:** a= 500 μm ; b, c, d y e = 200 μm y f = 1 μm .

VII. CONCLUSIONES

Se observó que la viabilidad de las semillas de *M. coahuilensis* disminuye con respecto al tiempo de almacenamiento.

La elongación de las plántulas se promueve empleando medio líquido con puentes de papel filtro para así obtener explantes.

Las células de la aréola dimórfica de *M. coahuilensis* mostraron su habilidad para producir brotes en ambos meristemas: el vegetativo y el floral.

En el presente trabajo los explantes apicales solo produjeron brotes de los meristemas florales, a diferencia de los laterales que los formaron a partir de los vegetativos. En ambos casos los brotes, en etapas posteriores de cultivo, se desarrollaron en plantas completas.

El análisis anatómico reveló también que el inicio de la formación de los brotes ocurre antes de que éstos puedan ser visibles a simple vista. Las células meristemáticas de las aréolas dimórficas de *M. coahuilensis* manifestaron su capacidad totipotente por el efecto de las hormonas endógenas y exógenas que probablemente promovieron la activación de ciertos genes dirigiendo la vía de diferenciación y especialización de las células para la formación y desarrollo de los brotes.

Este es el primer trabajo en el cual se determinó y describió el origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *M. coahuilensis*.

Anexo I. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

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

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b)



Tallo simple, pequeño, de unos 4 cm de diámetro, con una parte del tallo subterránea, con el ápice aplanado. **Tubérculos** dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, flojamente dispuestos, con jugo lechoso, prominentes, hasta de 12 mm de longitud, de sección triangular. **Axilas** con algo de lana. Aréolas elípticas, al principio lanosas, después desnudas. Espinas radiales normalmente 16, de 6 mm de longitud, las de la parte superior de la aréola más cortas, delgadas, algo suaves, de color blanco grisáceo, extendidas horizontalmente, radiantes en forma de estrella. **Espina central** 1, de unos 6 mm de longitud, recta, acicular, de color castaño, ligeramente pubescente. **Flores** campanulado-infundibuliformes, de 3 cm de diámetro; segmentos exteriores del perianto de color rosa claro, con la línea media de color café; segmentos interiores del perianto casi blancos, con la línea media de color rosa, lanceolados, agudos; estilo rosado; lóbulos del estigma 5, de color amarillo verdoso claro. **Fruto** claviforme. **Semillas** de color café claro, algo rojizo, de 1 mm de diámetro, gruesamente foveoladas; hilo basal pequeño.

**Anexo II. FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MS Y MS 50%
(Murashige y Skoog, 1962)**

	MS mg L ⁻¹	MS 50% mg L ⁻¹
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	220
MICROELEMENTOS		
KI	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.20	3.1
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	11.15
(MnSO ₄ .H ₂ O)	16.89	8.445
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	4.3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125
SOLUCIÓN DE Fe		
Na ₂ .EDTA .2H ₂ O	37.30	18.65
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	13.90
COMPUESTOS ORGÁNICOS		
VITAMINAS		
Ácido nicotínico (B ₃)	0.50	0.25
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.50	0.25
Tiamina-HCl (B ₁)	0.10	0.05
INOSITOL		
myo - Inositol	100.00	50
GLICINA		
Glicina	2.00	1
Sacarosa	30 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹
pH	5.7 - 5.8	5.7 - 5.8
Agar	8 g L ⁻¹	8 g L ⁻¹

LITERATURA CITADA

- Anderson, E. 2001.** The cactus family. Timber Press. USA.
- Anicua F. J. y V. B., Rivas. 2000.** Micropropagación y Evaluación del Estatus Metabólico *in vitro* de tres especies de Cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de Extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de licenciatura. UNAM, ENEP-Iztacala, México. 70 pp.
- Arias M., S. 1997.** Distribución General. En: Valles S. C. y L. Rodríguez. Suculentas Mexicanas: Cactáceas. CONABIO, SEMARNAP, UNAM, UAM, CUCC y CVS. México, D. F. 143 pp.
- Arias M., S. , S. Gama y L. U. Guzmán. 1997.** Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 14. Cactaceae A. L. Juss. CONABIO y UNAM. México, D. F. p. 27.
- Arias M., S. , U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005.** Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción: una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), la lista roja (IUCN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50(4): 100-125.
- Ault, J. y W. Blackmon. 1985.** *In vitro* propagation of selected native cacti species (Abst). HortScience 20: 541.
- Bárceñas, 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.). Comercio espinoso: Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. 65 pp.

- Baskin, C. y J. Baskin. 1998.** Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press. San Diego, California. 666 pp.
- Becerra, R. 2000.** Las Cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. 6 (32): 2-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002.** Las cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 40(6): 8-11.
- Bewley, J. D. y M. Black. 1985.** Seeds Physiology of Development and Germination. Plenum Press. New York, USA. 367 pp.
- Boke, H. N. 1953.** Tubercle development in *Mammillaria heyderi*. *American Journal of Botany*. 40 (4): 239-247.
- Boke, H. N. 1955.** Dimorphic areoles of *Epithelantha*. *American Journal of Botany*. 42: 725-733.
- Boke, H. N. 1958.** Areola histogenesis in *Mammillaria lasiacantha*. *American Journal of Botany* 45(6): 473-479.
- Bravo-Hollis, H. 1978.** Las cactáceas de México. Vol. I. 2ª ed. UNAM. México, D. F. 743 pp.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991a.** Las Cactáceas de México. Vol. II. UNAM. México D. F. p. 103-104.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991b.** Las Cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México D. F. 643 pp.
- Cassells, A. C. y R. F. Curry. 2001.** Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for

micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.

Castro-Gallo I., E. Meza-Rangel, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch.

2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4(2): 5-24.

Collin, H. A. y S. Edwards. 1998. Plant Cell Culture. Springer. New York. USA. p: 121-122.

Cuéllar, L., M. Morales y J. Treviño. 2006. La germinación *In vitro* una Alternativa para obtener Explantes en Cactáceas. En González, S., M. La Torre-Cuadros y R. Linares-Palomino (Eds). *Zonas Áridas* (10):129-133.

Chávez, V. M., C. O. González, P. W. Juárez, C. Sánchez, M. Mata, J. Flores, C. Guzmán, J. Reyes, C. Mandujano, R. Cruz, E. Sandoval, E. Calderón, A. Martínez y L. Márquez. 2006. Conservación de cactáceas mexicanas en peligro de extinción. Memorias del V Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Hermosillo, Son. pp. 561-596.

Damiano, C., P. Curir, T. Cosmi y B. Ruffoni. 1986. Tissue culture of *Mammillaria* spp (Abstr). *HortScience* 2(3): 804.

Duval, H. K. 1995. Organogénesis *de novo* en *Mammillaria san-angelensis* Sánchez–Mejorada, especie cultivada *in vitro*. Tesis de Licenciatura (Biología), ENEP Iztacala, UNAM. México. 58 pp.

Díaz, R. B. 2007. Propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México. 63 pp.

- Esau, K. 1977.** Anatomy of seed plants. 2da ed. John Wiley Sons. New York. 550 pp.
- Fahn, A. 1990.** Plant anatomy. 4ta ed. Pergamon Press. New York. 588 pp.
- Fletcher, J. C. 2002.** The vegetative meristem. En: McManus M.T. y B.E. Veit. (Eds.). Meristematic Tissues in Plant Growth and Development. Sheffield Academic Press. pp. 16-49.
- Flores, R. D. Y. 2007.** Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed) Moran, especie amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México. 61 pp.
- Gaspar, T., T. Franck, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J.F. Hausman y J. Domes. 2002.** Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe. 1996.** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 32: 272-289.
- George, E. F., M. A. Hally y G-J. De Klerk. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. I. The Background. 3ra ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 501 pp.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002.** *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003.** Catálogo de Cactáceas Mexicanas, UNAM, CONABIO, México, D. F. 315 pp.

- Gratton J. y Fay M. 1990.** Vegetative Propagation of Cacti and Other Succulents *in vitro*. In: Pollard J. y M. Walker (Eds.), Plant Cell and Tissue Culture Methods in Molecular Biology. Ohio University Press. Columbia. 6:219-225.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester. 1975.** Propagación de plantas, principios y prácticas. Ed. Prentice Hall. México, D. F. 810 pp.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies y R. L. Geneve. 1997.** Plant Propagation: principles and practices. 6ta ed. Ed. Prentice Hall. New Jersey, USA. 770 pp.
- Hernández, H. y H. Godínez. 1994.** Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- IUCN 2009.** 2009 IUCN Red List of Threatened Species. Página en red: <http://www.iucnredlist.org> [27 de Mayo de 2009].
- Johnson, J. L. y E. R. Emino. 1979.** *In vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14(5): 605-606.
- Kolár, Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1975.** Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experienta* 32: 668-669.
- López, M., J. Márquez y G. Murguía. 2005.** Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias, UNAM. 178 pp.
- Loyola-Vargas, V. M. y F. Vázquez-Flota. 2006.** Plant Cell Culture Protocols. 2da ed. Ed. Humana Press. New Jersey, USA. 393 pp.
- Loza, S., T. Terrazas, L. López y C. Trejo. 2003.** Características Morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus*

queretaroensis (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia* 28 (2):83-89.

Licona S., O., L. P. Olguín-Santos, y J. Márquez-Guzmán. 2004. Ontogenia de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria crucigera* Martius (Cactaceae). Memorias del XVI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxaca, México.

Martínez, R. A. Y. 2007. Evaluación fisiológica de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México. 76 pp.

Martínez-Vázquez 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.

Martorell, C. y E. Peters. 2009. Disturbance-Response Analysis: a Method for Rapid Assessment the Threat Species in Disturbed Areas (Abstr). *Conservation Biology* 23(2): 337-387.

Mauseth, J.D. 1978. The structure and development of an unusual type of articulated laticifer in *Mammillaria* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 65 (4): 415-420.

Mauseth, J.D. 1982. Introduction to cactus anatomy. Part 1. Introduction. *Cactus and Succulent Journal*. 54: 263-266.

Mauseth, J.D. 1983a. Introduction to cactus anatomy. Part 2. Apical meristems. *Cactus and Succulent Journal*. 55: 18-21, 42- 43.

- Mauseth, J.D. 1983b.** Introduction to cactus anatomy. Part 5. Secretory cells. *Cactus and Succulent Journal*. 55: 171-176.
- Mauseth, J.D. 1984.** Introduction to cactus anatomy. Part 7. Epidermis. *Cactus and Succulent Journal*. 56: 33-37.
- Mauseth, J.D. 2006.** Structure-Fuction Relationships in Highly Modified Shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 98: 901-926.
- Mendoza, M. G. 2007.** Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), UAEH. Hidalgo. 87 pp.
- Minocha, S. C. y P. N. Mehra. 1974.** Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany* 61(2): 168-173.
- Murashige, T. y F. Skoog 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ortega-Baes, P. y H. Godínez-Alvarez. 2006.** Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15: 817-827.
- Paunescu, A. 2009.** Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14(1): 4095-4103 (Abstr).
- Pérez Molphe Balch, E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y J. Lizalde. 1998.** Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34: 131-135.
- Pérez Molphe Balch, E., R. Ramírez, H. Nuñez y N. Ochoa. 1999.** Introducción al cultivo de tejidos vegetales. UAA. México. 179 pp.

Poljuha, D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubescic y M. Kirsnik-Rasol. 2003.

Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 117-123.

Ramírez-Malagon, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Perez-Moreno,

J.L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 43(6): 660-665.

Retes-Pruneda, J. L., M. L. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-

Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 9-16.

Robbins, C. 2003. Parte I. Los cactus del Desierto Chihuahuense en los Estados

Unidos: Una evaluación del comercio, la administración y las prioridades de conservación. Página en red: <http://www.wwf.org.mx>

Rojas-Aréchiga, M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a

review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.

Rubluo, A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for

the recover of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.

Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán.

2002. Auxin induced morphogenetic responses in long term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Scientia Horticulture* 95: 341-349.

- Sánchez, E. 1995.** Avances en la propagación *in vitro* de Cactáceas. Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Querétaro, ITESM-Campus Querétaro y Sociedad Mexicana de Cactología-Capítulo Querétaro.39 p.
- Scheinvar, L. 2004.** Flora Cactológica del estado de Querétaro, diversidad y riqueza. F. C. E. col. Sección de Obras de Ciencia y Tecnología. México, D. F. 390 pp.
- Starling R. y H. Dodds. 1983.** Tissue culture propagation of cacti and others succulents. *Bradleya* 1: 84-90.
- SEMARNAT (Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de especies en Riesgo. Página en red: [http:// www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx) [6 de Marzo de 2002].
- Tapia, D. M. 2006.** Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), UAEH. Hidalgo. 73 pp.
- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas y S. Arias. 2005.** Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62 (2): 153-161.
- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas y S. Arias. 2007.** Morphology and anatomy of the *Cephalocereus columna-trajani* cephalium: why tilting?. *Plant Systematics and Evolution*. 265: 87-99.

Villareal-Quintanilla, J. A. y J. A. Encina-Domínguez. 2005. Plantas Vasculares endémicas de Coahuila y algunas áreas adyacentes, México. *Acta Botánica Mexicana* 70: 14-46.

Vyskot B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 59(3): 449-452.

Walter, K.S. y Gillett, H.J. (eds) (1998). 1997 IUCN *Red List of Threatened Plants*. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Wyka, T. P., M. Hamerska y M. Wróblewska. 2006. Organogénesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 27-32.