



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“PROPAGACIÓN POR CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES DE *Epithelantha micromeris*
(ENGELMANN) WEBER EX BRITTON ET ROSE
ESPECIE SUJETA A PROTECCIÓN ESPECIAL”

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:

REBECA HERNÁNDEZ CONTRERAS



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS
2013



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.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	8
• Generalidades de la Familia Cactaceae.....	8
• Problemática de conservación.....	9
○ Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).....	11
○ Ventajas y Desventajas del CTV.....	14
○ Fitorreguladores utilizados en CTV.....	15
○ Respuestas morfogénicas.....	16
○ Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas.....	18
• <i>Epithelantha micromeris</i> (Engelm.) Weber ex Britton et Rose (Cactaceae).....	22
○ Problemática de conservación.....	23
○ Cultivo <i>in vitro</i>	24
JUSTIFICACIÓN.....	25
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
• Material biológico.....	26
○ Escarificación, desinfección y siembra de semillas.....	26
○ Obtención y siembra de explantes.....	27
• Brotes previamente regenerados <i>in vitro</i>	28
• Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
• Germinación de semillas <i>in vitro</i>	31
• Respuestas morfogénicas.....	36
○ Explantes apicales.....	36
○ Explantes laterales.....	41
• Brotes previamente regenerados <i>in vitro</i>	43
• Análisis estadístico.....	46
CONCLUSIONES.....	51
ANEXO I.....	53
ANEXO II.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

ABREVIATURAS

2iP	N ⁶ -(2-Isopentenil)/adenina
AIA	Ácido Indol-3-acético
AIB	Ácido Indol-3butírico
ANA	Ácido 1-Naftalen/acético
BA, BAP	6-Benciladenina, 6-Bencilaminopurina
CA	Carbón Activado
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
K	Kinetina; 6-Furfurilaminopurina
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
MS50%	Medio de cultivo MS a la mitad de su concentración

RESUMEN

Epithelantha micromeris es una especie de la Familia Cactaceae que se encuentra bajo protección especial por la NOM-059-ECOL-2010 y en el Apéndice II de la CITES, debido a la sobreexplotación a la que ha sido sometida por tratarse de una especie ornamental con alto valor comercial, además de su distribución casi endémica en México.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración óptima de kinetina (K) para proliferar brotes a partir de plántulas germinadas *in vitro* y de brotes previamente regenerados *in vitro*.

Se utilizaron semillas procedentes de frutos de plantas silvestres, las cuales se escarificaron con H_2SO_4 , se desinfectaron y sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) al 50% para obtener plántulas de 0.5-1 cm de longitud. Cada plántula se seccionó en un explante apical y dos explantes laterales. Dichos explantes se colocaron en medio de inducción Murashige y Skoog (MS) adicionado con kinetina (K) (0, 0.5, 1, 2, 8 mgL^{-1}), sacarosa 30 gL^{-1} y agar Bioxon® 8 gL^{-1} con un pH de 5.7-5.8.

También se experimentó con brotes regenerados previamente *in vitro*. Estos brotes se subcultivaron en medio Murashige y Skoog con carbón activado (MS+CA) (1 gL^{-1}) para su proliferación y elongación; al alcanzar la talla de 0.5-1 cm fueron seccionados para obtener un explante apical y dos laterales de cada uno, que se sembraron en el mismo tipo de medio y con las mismas concentraciones de kinetina (K) y bajo las mismas condiciones que los explantes procedentes de plántulas germinadas *in vitro*.

La formación de brotes fue por organogénesis indirecta en los explantes apicales de plántulas, y en los explantes apicales y laterales de brotes previamente regenerados. Para los explantes laterales de plántulas el desarrollo de brotes inició por organogénesis directa y se desdiferenciaron en callo, del cual posteriormente se regeneraron brotes por organogénesis indirecta.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

En los explantes procedentes de plántulas germinadas *in vitro* la mejor concentración fue K 8 mgL⁻¹ tanto en apicales (42 brotes/explante), como en laterales (30 brotes/explante). Para los explantes de brotes previamente regenerados *in vitro*, la mejor concentración en apicales fue K 2 mgL⁻¹ (9.5 brotes/explante), y para laterales K 8 mgL⁻¹ (3.25 brotes/ explante).

La técnica de propagación *in vitro* de *Epithelantha micromeris* quedó establecida al utilizar la hormona kinetina, la cual demostró ser eficiente en la inducción para formar brotes.

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es endémica de América y abarca prácticamente todo el continente, excepto regiones por encima de los 5,600 msnm. Incluye unos 110 géneros y aproximadamente 1,500 especies, siendo México el país con la mayor cantidad de especies y endemismos (Becerra, 2000). De 48 géneros y 563 especies reconocidas en nuestro país, el 31.3 % se encuentran estrictamente restringidos a su territorio y 20 géneros son casi endémicos, entendiendo bajo este concepto que una o varias de las especies de un género determinado, pueden extenderse hasta áreas adyacentes al territorio mexicano, principalmente en el suroeste de los Estados Unidos (Hernández y Godínez, 1994).

De todos los géneros de nuestro país, el 72.9% se contemplan como endémicos. Algunos ejemplos de las regiones áridas y semiáridas con alta diversidad florística de cactáceas en México son el valle de Tehuacán-Cuicatlán, localizado en los estados de Puebla y Oaxaca; el altiplano potosino y sur de Nuevo León; los valles intermontanos de Hidalgo y Querétaro y los bosques deciduos y espinosos de Tehuantepec (Mandujano *et al.*, 2002).

Las características peculiares del grupo de las cactáceas, tales como los tallos gruesos y suculentos, las hojas modificadas en espinas, las flores delicadas de vistosos colores que resaltan en contraste con la robustez de la planta, y jugosos frutos, las han convertido en presa de coleccionistas a nivel mundial,

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

posicionándose actualmente, en un sitio importante dentro de las plantas más codiciadas del planeta (Becerra, 2000).

Algunas de las especies de esta familia están amenazadas de extinción, en primer lugar debido a la extracción de las plantas de su hábitat, por su atractivo como plantas de ornato para comercializarlas en mercados nacionales e internacionales. En segundo lugar, las cactáceas se encuentra en poblaciones muy pequeñas de distribución restringida (Hernández *et al*, 2007), sometidas a la destrucción del entorno natural debido al desarrollo humano, por la conversión de terrenos para usos agrícolas y/o pecuarios (Becerra, 2000). Las cactáceas son plantas de lento crecimiento y ciclos de vida largos, características que les predisponen a la extinción, coartando a las poblaciones depredadas que no tienen una tasa de regeneración suficientemente rápida (Anderson, 2001).

Las características mencionadas ubican a la familia Cactaceae como un grupo cuya biodiversidad requiere de atención a la brevedad posible y esfuerzos especiales para su conservación, empezando con un estudio extenso de las especies y ecosistemas que se desean preservar, incorporando a este esfuerzo el método de propagación *in vitro* como herramienta funcional y efectiva para proliferar plantas suculentas (Bárcenas, 2006).

La presión ejercida sobre las poblaciones silvestres puede disminuir, e incluso desaparecer, cuando existe una oferta abundante de ejemplares reproducidos artificialmente; ya sea por técnicas de micropropagación o

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

vegetativas, para transacciones comerciales y de científicos especialistas (CITES, 2013).

Se ha comprobado que la práctica del Cultivo de Tejidos Vegetales, resulta benéfica para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción, principalmente cactáceas y otras suculentas (Steinhart, 1962; Fay y Gratton, 1992; Rojas-Arechiga y Vázquez-Yanes, 2000; Papafotiou *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002; George *et al.*, 2008); para el mejoramiento de plantas (alimenticias y ornamentales); la propagación masiva; la hibridación somática; la ingeniería genética en cuestión de mejoramiento de cultivos vegetales y la biosíntesis de productos secundarios e inclusive, el estudio de aspectos patológicos en plantas (Collin y Edwards, 1998; Moebius-Goldammer, *et al.*, 2003; Dávila *et al.*, 2005; Mohamed, 2002; Villavicencio *et al.*, 2011).

Más de 500 millones de plantas se producen por cultivo de tejidos cada año (Vasil, 1994). Estas técnicas, que consiste en depositar sobre un medio nutritivo bajo condiciones asépticas y ambientales controladas, fragmentos de cualquier estructura vegetal, ya sean semillas, embriones, órganos, tejidos ó células (George, 1993), lo que hace posible la obtención de numerosos propágulos, disminuyendo así las desventajas de la propagación convencional de cactáceas, tales como la obtención de menos ejemplares (Fay, 1994).

En el presente trabajo se utilizó una de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, la micropropagación *in vitro* de *Epithelantha micromeris* (Cactaceae).

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

Las plantas así obtenidas contribuirán a amortiguar su explotación, al reducir las presiones de colecta de ejemplares silvestres y posiblemente satisfaciendo la demanda comercial.

ANTECEDENTES

- Generalidades de la Familia Cactaceae

El territorio mexicano alberga un gran número de grupos de plantas, con abundancia de endemismos y vasta diversidad, situando a nuestro país como lugar de origen y desarrollo para la flora (Rzedowski, 1998).

Enmarcada en la diversidad florística de México, la familia Cactaceae destaca por su amplia representatividad a nivel de género y especies (Arias, 1993). Prolifera en zonas áridas y semiáridas, que representan más de la mitad del territorio nacional. Un ejemplo es el desierto Chihuahuense, que abarca parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, así como Nuevo México y Texas en Estados Unidos, con un área aproximada de 453 000 Km² (Barbour y Christensen, 1993, Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Las cactáceas se han adaptado a ambientes áridos y semiáridos para su supervivencia, principalmente en su capacidad de absorber y retener agua en sus tallos suculentos por períodos extensos de sequía. De la misma manera el desarrollo de estructuras protectoras tales como espinas o pelo fino (“lana”) en contra de los herbívoros y disminuyen el efecto estresante que la luz solar ejerce sobre la temperatura y humedad de la planta, así como protegerlas de las bajas temperaturas por las noches. Además dentro de sus ecosistemas, las cactáceas

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

juegan importantes roles a través de numerosas interacciones establecidas con otras plantas y animales (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006).

Las cactáceas, al igual que las demás angiospermas, tienen meristemas localizados en el sitio donde se une la hoja con el tallo. Estos meristemas, denominados yemas axilares se desarrollan en aréolas y las hojas que producen estas yemas axilares corresponden a las espinas. Los tubérculos que sostienen a las aréolas, son análogos a la base de las hojas de las demás plantas con flores (Johnson y Emino, 1979a; Mauseth, 1979). Las aréolas normalmente son inactivas después de que se han formado las espinas, sin embargo, pueden ser reactivadas *in vitro* para producir brotes (Mauseth, 1979; Bonness *et al*, 1993).

9

- Problemática de conservación

La familia Cactaceae tiene una distribución amplia y posee gran importancia ecológica, evolutiva, biológica y etnobotánica. Sin embargo, se considera amenazada debido a que muchas de sus especies están desapareciendo de sus ecosistemas, principalmente por el comercio ilegal, tráfico internacional y la alteración y destrucción de su hábitat, producto de las actividades humanas (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006; Martorell y Peters, 2009).

Las adaptaciones adquiridas para protegerse dentro de su hábitat natural hacen a las cactáceas vulnerables ante los seres humanos, quienes las emplean como alimento, en medicina tradicional, en la elaboración de dulces y para la decoración, pues tanto sus formas de vida como el hecho de poseer vistosas flores las convierten en objeto de los cactófilos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Robbins, 2003). Es así como poblaciones completas de estas peculiares plantas han desaparecido o se han visto reducidas drásticamente en cuanto al número de individuos que las componen (Hernández y Godínez, 1994; Becerra, 2000; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Benítez y Dávila, 2002; Mandujano *et al.*, 2002;).

El saqueo a poblaciones silvestres de este tipo de plantas por parte del comercio ilegal es continuo (Anderson, 2001), a pesar de que las leyes mexicanas prohíben su recolección, atenta directamente contra la conservación de las poblaciones naturales, contra los productores establecidos que cumplen con todos los requerimientos de ley y contra la población en general, al no pagar impuestos y crear las condiciones para el empobrecimiento irremediable de la diversidad biológica nacional (Bárceñas, 2006).

Esta problemática tiene varios orígenes, tales como la falta de los viveros en donde se propaguen especies raras y amenazadas, que abastezcan la demanda internacional, así como leyes confusas respecto al saqueo de poblaciones silvestres, que llegan a ser insuficientes e inclusive inexistentes (Benítez y Dávila, 2002; Bárceñas, 2006; Hernández *et al.*, 2007; López, 2009). Además para consolidar

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

un proyecto de producción de cactáceas los numerosos trámites, casi siempre resultan muy complicados, convirtiéndose en una barrera prácticamente infranqueable, aunado a los actos de corrupción por parte de algunas autoridades (Bárceñas, 2006).

Las especies raras y amenazadas de esta familia son alrededor de 100. Muchas muestran una baja producción y deficiencias en la germinación de semillas, lo que hace de la propagación *in vitro* una alternativa factible para la multiplicación y conservación de su germoplasma (Medeiros *et al.*, 2005). Además es una alternativa para promover su comercialización, ya que la posición de México en el ámbito legal del comercio internacional de cactáceas es ciertamente lamentable en relación con la diversidad de especies (Bárceñas, 2006).

11

- Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales comprende un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo aséptico de células aisladas, embriones, meristemas, ápices o fragmentos de órganos (tallos, hojas y raíces) llamados explantes, en medios de cultivo. Estos son mantenidos bajo condiciones ambientales controladas (temperatura, fotoperiodo e intensidad luminosa). Una de sus múltiples aplicaciones, es la propagación de nuevos individuos que, dependiendo de su origen, pueden ser o no genéticamente idénticos a la planta progenitora (Hartmann *et al.*, 1997). Si provienen de estructuras como óvulos o

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

polen, estos son resultado de una recombinación genética y no son idénticos a la planta madre. La base teórica del CTV es la totipotencialidad celular, la cual consiste en que prácticamente cualquier célula vegetal con las condiciones ambientales y nutricionales adecuadas puede originar una planta completa (Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

La micropropagación es una de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales que puede ser de particular valor en la propagación de especies raras o amenazadas, especialmente cuando no se cuenta con semillas viables. Además, la propagación y subsecuente distribución de esas especies que se ven amenazadas por sobreexplotación, puede mitigar la presión que sufren las poblaciones silvestres (Gratton y Fay, 1999).

La micropropagación de una nueva planta completa comprende cinco etapas o fases críticas para lograr una exitosa multiplicación (Razdan, 2003; George *et al.*, 2008):

- ✓ **Fase 0 (preparativa).** Es el paso inicial e indispensable para que la micropropagación sea real y repetible. Consiste en la selección y mantenimiento de plantas donantes para el inicio del cultivo. Dichas plantas deben crecer y permanecer bajo condiciones de cuidadoso monitoreo, para reducir la contaminación microbiana en los cultivos y maximizar la diversidad genética de las plantas que serán micropropagadas.

- ✓ **Fase 1 (establecimiento).** Se refiere a la iniciación y establecimiento de cultivos asépticos y tiene como pasos principales: la obtención del explante, a partir de tejido joven, ya que al ser menos diferenciado se obtiene una mejor respuesta *in vitro*. La desinfección de la superficie del explante y lavado adecuado del mismo, así como su establecimiento en un medio de cultivo apropiado.
- ✓ **Fase 2 (multiplicación).** Esta fase consiste en colocar los explantes en un medio de cultivo determinado para la formación y multiplicación de brotes o para la formación de embriones somáticos.
- ✓ **Fase 3 (enraizamiento).** Se induce ya sea la formación de raíces, o bien la germinación de embriones somáticos, mediante la transferencia de los brotes o embriones a un medio con fitorreguladores para producir los resultados esperados.
- ✓ **Fase 4 (aclimatización).** Se trata de transferir a las plantas a condiciones *ex vitro* en suelo esterilizado y un ambiente controlado de invernadero. Este procedimiento tiene la intención de que las plantas gradualmente adquieran características normales de estructura y fisiología, hasta adaptarse a condiciones ambientales parecidas a las de su hábitat natural.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Ventajas y Desventajas del CTV

El cultivo de tejidos vegetales ofrece ventajas importantes en términos de propagación, entre ellas, podemos destacar la alta uniformidad fenotípica, la producción eficiente de un gran número de plantas y de ejemplares libres de patógenos; además de reducir en cierto grado la explotación de ejemplares silvestres, pudiendo obtener cantidades que garanticen su demanda comercial (Johnson y Emino, 1979a).

Por otro lado, también se presentan una serie de desventajas, como la contaminación, uno de los principales problemas en cultivos iniciales, que es producido por contaminantes endógenos de tejidos intactos, como virus, bacterias y hongos debido a la aplicación de una técnica de desinfección deficiente (Collin y Edwards, 1998). La contaminación de los cultivos se produce frecuentemente debido a que se usan medios de cultivo muy ricos en nutrientes, en los que pueden proliferar múltiples tipos de microorganismos (Hartmann *et al.*, 1997).

Otro problema es la hiperhidratación, un fenómeno fisiológico que ocurre debido a la presencia de altos niveles de humedad dentro del envase de cultivo, que deforma el crecimiento y la formación de tejidos bien definidos, debido a una elevada presión osmótica del medio que produce un desarrollo anormal haciendo al tejido más grueso y translúcido, con células turgentes, hipolignificado y frágil (Collin y Edwards, 1998).

Además la oxidación fenólica, que sucede cuando al obtener explantes para el cultivo *in vitro*, se provocan heridas en el tejido vegetal, las cuales generan excreción de sustancias que colaboran en la cicatrización y defensa ante patógenos. Estas sustancias son compuestos fenólicos. Dichos compuestos al entrar en contacto con la atmósfera se oxidan, produciendo quinonas que resultan muy tóxicas para los tejidos vegetales (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Conjuntamente, los compuestos fenólicos contenidos en las vacuolas, interactúan con las polifenoloxidasas de otros organelos, que son enzimas oxidorreductoras que oscurecen el tejido y que al ser inhibidas por dichos compuestos pueden causar la muerte de los explantes (Hu y Wang, 1983).

Este fenómeno se expresa como ennegrecimiento del explante en la zona de contacto directo con el medio de cultivo que puede extenderse a todo el tejido y al medio y frenar su crecimiento, hasta alcanzar la muerte. Lo anterior se convierte en un problema para el establecimiento exitoso del cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998; González *et al.*, 2000; Cassells y Curry, 2001; Gaspar *et al.*, 2002; Giusti *et al.*, 2002).

- Fitorreguladores utilizados en CTV

Una variable importante en el cultivo de tejidos vegetales es la inclusión de reguladores de crecimiento vegetal o fitorreguladores, ya que contribuyen a las cinco áreas para las que se emplea el CTV, que son: 1) desarrollo celular, 2)

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

modificación y desarrollo de las plantas, 3) producción de plantas libres de patógenos y conservación del germoplasma, 4) propagación clonal, y 5) formación de metabolitos secundarios (Thorpe, 1990). Los reguladores de crecimiento rara vez actúan de manera individual, y en la mayor parte de los procesos deben interactuar entre sí para producir el efecto final que se espera. Además de los reguladores usuales: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, se han descubierto sustancias con estructuras químicas novedosas que actúan de modo similar a los reguladores de crecimiento clásicos (Gaspar *et al.*, 1996). De los reguladores de crecimiento vegetal, los más importantes en las condiciones del cultivo *in vitro* para la determinación de una respuesta de los tejidos vegetales son las auxinas, tales como el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido indol-3-butírico (AIB) que en altas concentraciones inducen la formación de raíces, y las citocininas como la kinetina (K) y la bencilaminopurina (BAP) que en altas concentraciones propician la formación de brotes (Starling y Dodds, 1983, Gaspar *et al.*, 1996, Castro-Gallo *et al.*, 2002, Domínguez *et al.*, 2008).

- Respuestas morfogénicas

En la micropropagación de tejidos vegetales podemos obtener un gran número de brotes o individuos a partir de cantidades mínimas de tejido. Por lo que estos tejidos pueden tener diferentes respuestas morfogénicas (Pierik, 1993; Collin y Edwards, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Las células vegetales tienen la capacidad de desdiferenciarse tanto en su estado funcional como estructural y generar una nueva ruta de desarrollo que las dirija hacia un resultado morfogénético diferente. Se pueden distinguir dos secuencias de desarrollo que dirigen la organogénesis. La primera consiste en que al ser cultivados en un medio con reguladores de crecimiento, los tejidos vegetales desarrollan de manera directa órganos tales como hojas, raíces y tallos, proceso conocido como organogénesis directa, que consiste en una activación de meristemas ya presentes pero latentes. Por otra parte algunos tejidos pasan por una etapa en la que las células conforman una masa desorganizada y desdiferenciada, presentan una proliferación continua y acelerada obtenida a partir de un determinado tejido, originando una masa celular amorfa conocida como callo, dentro de la cual algunas células pueden derivar en brotes dando paso a la proliferación de plantas nuevas, proceso conocido como organogénesis indirecta. En ocasiones se presenta el fenómeno de embriogénesis somática, el cual consiste en el desarrollo de embriones que no proceden de la fusión gamética y surgen directamente del explante o indirectamente a partir de callo (Smith, 1992; Hartmann *et al.*, 1997; Gómez, 1998; Pérez, 1998; Schwarz y Beaty, 2000; Razdan, 2003).

En los organismos vegetales las rutas morfogénéticas están determinadas por la relación entre auxinas y citocininas. Por tanto, cuando hay una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas resulta mayor formación de brotes, por otra parte, con una alta concentración de auxinas y baja

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

concentración de citocininas se originan raíces, así el tener una concentración equilibrada de estos elementos origina callo. Se ha demostrado que en el meristemo axilar se encuentra dominancia de citocininas, mientras que en el meristemo apical de auxinas (Mauseth, 1979; Taiz y Zeiger, 2002).

- Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas

Las cactáceas presentan a menudo, dependiendo de la especie, una limitada producción de semillas y probablemente se desconocen los métodos de propagación artificiales eficientes para cada una de las especies en particular. Por tanto es conveniente desarrollar protocolos para la propagación *in vitro* y la aclimatización para cubrir la demanda de colectores profesionales y aficionados, reduciendo el riesgo de colecta ilegal de poblaciones silvestres. Las plantas micropropagadas también podrían ser reincorporadas en sus hábitats naturales, como una remota contribución a su conservación (Giusti *et al.*, 2002), aunque es un tema discutido y se considera una posibilidad poco factible.

La propagación a través de semillas es un método importante pues permite que la diversidad genética de poblaciones y especies sea mantenida. Aún se sabe poco sobre las condiciones que se requieren para la germinación de semillas de muchas especies de cactáceas, sobre su viabilidad y longevidad. Los estudios sobre la germinación y el establecimiento de estas plantas son importantes para entender estrategias reproductivas, para su propagación artificial y su conservación

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

(Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Incluso, el desarrollo de plántulas *in vitro* puede ser extremadamente rápido en comparación con el desarrollo de plántulas proveniente de semillas germinadas en invernadero (Kolár *et al.*, 1976; Mauseth, 1977; Paunescu, 2008).

Existen múltiples trabajos acerca de la propagación *in vitro* en cactáceas, la mayoría se enfocan en especies comerciales que resultan fáciles de propagar ya sea mediante semillas o explantes. También existe un grupo de especies raras y en peligro que han sido buenas candidatas para ser propagadas mediante cultivos *in vitro* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Fay, 1991; Medeiros *et al.*, 2005; Altare *et al.*, 2006; Wyka, 2008), y en el que, como ejemplo, se puede incluir a géneros como *Turbincarpus*, endémico del norte de México, protegido por la Norma Oficial Mexicana y ubicado en el Apéndice I de la CITES (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), propagado mediante organogénesis directa usando N^6 -(2-isopentenil)/adenina (2iP), así como a *Lophophora williamsii* (peyote) de importancia ritual y económica que fue propagada a partir de aréolas y a través de organogénesis directa en medio MS con kinetina y ácido naftalenacético (ANA) (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997). También se han reportado trabajos de reproducción *in vitro* de brotes de *Schlumbergera truncata* (Cactus de Navidad) en medio MS a partir de aréolas de fracciones de tallo y por organogénesis directa (Pérez *et al.*, 1999), y de la micropropagación *in vitro* de *Cereus peruvianus*, especie de importancia industrial que fue cultivada en medio MS a partir de aréolas de explantes apicales y laterales por organogénesis indirecta usando 6-

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

benciladenina (BA), kinetina (K) en combinación con ácido naftalén acético (ANA) (Machado y Prioli, 1996).

Algunas otras cactáceas han sido propagadas satisfactoriamente, debido en gran medida a la incorporación de fitorreguladores al medio de cultivo, la mayor parte de los resultados obtenidos concuerdan al utilizar citocininas en concentraciones de 0.1 a 10 mgL⁻¹, promueven mayor formación de brotes (Tabla 1). Cabe destacar que algunas ocasiones la formación de brotes es indirecta, es decir a partir de callo, implicando desdiferenciación y rediferenciación celular.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

Tabla 1. Algunas especies de la Familia Cactaceae propagadas por cultivo de tejidos.

ESPECIE	EXPLANTE	FITORREGULADORES (mgL ⁻¹)	RESPUESTA MORFOGENÉTICA	No. BROTES/ EXPLANTE	REFERENCIA
<i>Mammillaria carmenae</i>	Secciones de tallo	BA(2)+ ANA(1)	Brotos y callo	NR	Vyskot y Jára, 1984
<i>Ferocactus acanthodes</i>	Ápices	K(10)+ANA(1)	Callo y brotes	NR	Ault y Blackmon, 1987
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	BA(1)+ANA(0.01)	Brotos a partir de callo	21-35	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989
<i>Mammillaria huitzilopochtli</i>	Secciones de tallo	BA(0.1)	Brotos y callo	NR	Rubluo <i>et al.</i> , 1993
<i>Cereus peruvianus</i>	Apicales y laterales	BA(1)+ANA(1) K(1)+ANA(1)	Brotos a partir de callo	NR	Machado y Prioli, 1996
<i>Lophophora williamsii</i>	Aréolas	ANA(0,0.1,1) +BAP(0,0.1,1) ANA(0,0.1,1) +K(0,0.1,1)	Brotos y callo	NR	Ortíz-Montiel y Alcántara, 1997
<i>Schlumbergera truncata</i>	Secciones de tallo	BAP(0,1,5,10,20)	Brotos	1-10	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Epithelantha micromeris</i>	Brotos	K(8), 2iP(4), ANA(0.1)	Brotos	14.5-17.5	Velázquez y Soltero, 2001
<i>Epithelantha micromeris</i>	Brotos	K(1.2mM), AIB(1.03)	Brotos	14.81	Villavicencio <i>et al.</i>, 2012
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Brotos	AIA(6)	Brotos	26.77	Rubluo <i>et al.</i> , 2002
<i>Turbincarpus laui</i>		BA(0.7-1.1)	Brotos	14	Dávila-
<i>T. pseudopectinatus</i>		2iP(4-5)		19.7	Figueroa <i>et al.</i> , 2005
<i>T. lophophoroides</i>	Apicales,			14	
<i>T. shmedickeanus</i>	laterales,			13.8	
<i>subsp. flaviflorus</i>	longitudinales				
<i>T. shmedickeanus</i>	y			13.8	
<i>subsp. klinkerianus</i>	transversales				
<i>T. shmedickeanus</i>				9	
<i>subsp. shmedickeanus</i>					
<i>T. subterraneus</i>				13	
<i>T. valdezlanus</i>				7.8	
<i>Mammillaria albicoma</i>	Meristemos florales	BA(5)+ANA(0.1)	Callo y brotes a partir de callo y perianto	58	Wyka <i>et al.</i> , 2006

NR=no reportado

(K) Kinetina

(BA) Benciladenina

(BAP) Bencilaminopurina

(ANA) Ácido Naftalenacético

(MS) Murashige y Skoog (1962)

(2iP) 2-Isopentenil adenina

(AIB) Ácido Indol-3butírico

- *Epithelantha micromeris* (Engelm.) Weber ex Britton et Rose (Cactaceae).

El nombre genérico de *Epithelantha micromeris* significa “flor sobre el tubérculo” (Glass, 1998) (Fig. 1). Se trata de un género monotípico. Se distingue por ser una planta pequeña, simple o algo cespitosa (Anexo1), con dificultades para propagarse debido a su lento desarrollo en estado silvestre (Hernández y Godínez, 1994) y por la escasa producción de semillas por fruto, entre 1 y 5, de manera similar a *Pereskia aculeata* (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yañez, 2000).



Figura 1. Ejemplar de *Epithelantha micromeris* en floración vista apical (a) y lateral (b). Ejemplares con frutos (c). (Tomado de <http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-knoch>).

Se distribuye al norte de nuestro país en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas y sur de los Estados Unidos, (Guzmán *et al.*, 2003) (Fig. 2).

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”



Figura 2. Distribución de *Epithelantha micromeris* en México. (Tomado y modificado de www.chapurkids.com/ev/geografia/mapasdemexico.htm)

23

- Problemática de conservación

Además de su distribución casi endémica en nuestro país, *Epithelantha micromeris* se encuentra bajo protección especial (Pr) de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010). También está incluida en el Apéndice II de la CITES (Arias *et al.*, 2005, CITES, 2013), a causa de la sobreexplotación a la que se ha expuesto pues se trata de una planta ornamental con un alto valor comercial (Velázquez y Soltero, 2001), que incluso es comercializada en páginas en internet (cactimex, 2013; foroantiguo, 2013; forums, 2013; verdi, 2013), con precios que van desde \$110.00 a \$270.00 para plantas adultas y paquetes con 40 semillas con precio de \$4.50 US Dólares.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Cultivo *in vitro* de *Epithelantha micromeris*

Las cactáceas han sido trabajadas en Cultivo de Tejidos en las últimas décadas, sin embargo los reportes de cultivo *in vitro* de *Epithelantha micromeris* son escasos.

Velázquez y Soltero en 2001 establecieron la técnica de micropropagación mediante la proliferación de brotes axilares en medio MS como medio basal, suplementado con la mezcla de vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979, citado por Velázquez y Soltero, 2001), sacarosa 30gL⁻¹, agar 10gL⁻¹ y pH 5.8, y la adaptación de las plantas a condiciones de invernadero. Los tratamientos con mejores resultados fueron los de K 8 mgL⁻¹ (17.25 brotes/explante) y 2iP/ANA 4/0.2 mgL⁻¹ (14 brotes/explante).

24

En otro reporte realizado en 2012 por Villavicencio y colaboradores, se desarrolló un protocolo para la micropropagación de *Epithelantha micromeris*, mediante la proliferación de brotes usando segmentos de epicótilo como explantes, en medio de cultivo MS50% con tratamientos de citocinina/auxina 10:1 en diferentes niveles de concentración. Determinaron que el tipo y la concentración de fitohormona influyen en la tasa de multiplicación, pues se formaron 14.81 brotes por explante en promedio al usar kinetina/ácido indol-3butírico (K/AIB) en concentraciones de 1.2mM /1.03μM (equivalente a K 258.252 mgL⁻¹).

Por lo anterior en el presente trabajo se evaluó la formación de brotes de esta especie utilizando kinetina, pues de acuerdo a lo reportado es la citocinina

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

inductora más regenerativa. Y se exploró la capacidad regenerativa de la especie empleando brotes regenerados previamente como fuente de explante, obtenidos en un ensayo preliminar de proliferación *in vitro* con concentraciones de kinetina de 0.1, 0.5, 0.8, 1 y 2 mgL⁻¹.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Epithelantha micromeris* se encuentra sujeta a protección especial de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2010, tiene baja tasa de recuperación en poblaciones silvestres, baja producción de semillas, es sobrecolectada y vendida por Internet por su valor ornamental, por tanto se considera un buen candidato para reproducción *in vitro* y que a su vez sea una herramienta útil que contribuya a su propagación y conservación.

25

OBJETIVOS

General

Establecer la técnica de propagación *in vitro* de *Epithelantha micromeris*.

Particular

Determinar la concentración óptima de Kinetina para la formación de brotes a partir de plántulas germinadas *in vitro* y brotes previamente regenerados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Material biológico**

Se utilizaron semillas de frutos de plantas silvestres de la localidad El Kelso, Coahuila (carretera Saltillo-Monterrey). Dichas plantas se colectaron el 19 de julio de 2004 y posteriormente se mantuvieron en el invernadero de la Facultad de Ciencias. Los frutos fueron cosechados en septiembre de 2004 y en abril de 2005.

- Escarificación, desinfección y siembra de semillas

Las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 15 segundos y se enjuagaron con agua destilada. Para manipularlas con mayor facilidad debido a su tamaño (0.8 mm de espesor) se colocaron en un paquete de papel filtro (Wathmann #1) y se procedió a lavarlas con agua destilada (50 mL) más tres gotas de detergente líquido Dawn® durante 20 minutos; después se desinfectaron con etanol al 70% durante un minuto, y posteriormente con hipoclorito de sodio al 20% (v/v NaOCl 6% de cloro activo) más tres gotas de Tween 80 durante 30 minutos. Todo el proceso en agitación continua. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada dentro de la campana de flujo laminar. Las semillas se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS)(1962) al 50%, sacarosa 30 gL⁻¹, agar bacteriológico Bioxón® 10 gL⁻¹ y pH 5.7-5.8 (Anexo II). Se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25

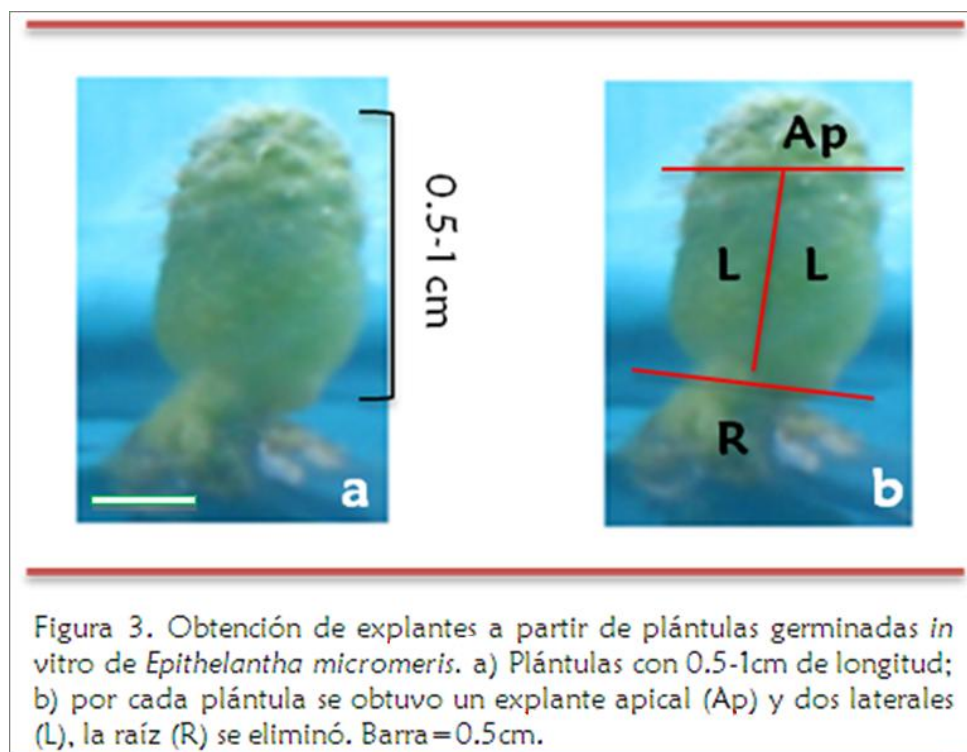
“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

$\pm 2^{\circ}$ C, con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad con una intensidad luminosa de $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En abril de 2007 se realizaron dos siembras (siembra 1 = 30, siembra 2 = 58) provenientes de las cosechas de frutos antes mencionadas. Se evaluó el porcentaje de germinación, considerando a la semilla germinada cuando emergiera la radícula (Moreno, 1984, Baskin y Baskin, 1998).

- Obtención y siembra de explantes

Cuando las plántulas alcanzaron 0.5-1cm de longitud, 30 de ellas fueron seccionadas para obtener, por cada una de ellas, un explante apical y dos laterales, eliminando la raíz (Fig. 3). Se colocaron estos explantes (un apical y dos laterales) por cada frasco y se realizaron cinco repeticiones para el control y cada tratamiento.

27



“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

El medio de inducción de brotes fue MS adicionado con kinetina en concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 y 8 mgL⁻¹, sacarosa 30 gL⁻¹, agar Bioxón® 8 gL⁻¹ y pH 5.7-5.8.

Se evaluó el número de brotes obtenidos por explante y por tratamiento, el número de brotes hiperhidratados por explante y por tratamiento, el tipo de explante más regenerativo, y el tipo de respuesta morfogénica (organogénesis indirecta, organogénesis directa por activación de aréolas (yemas axilares), y/o la formación de callo).

Los explantes permanecieron en medio de inducción cuatro meses y posteriormente fueron subcultivados a medio MS basal con carbón activado (1gL⁻¹) (MS+CA) para la diferenciación de brotes.

28

- **Brotos previamente regenerados *in vitro***

Debido a la escasa producción de frutos y semillas en esta especie, se utilizó como fuente de explantes, brotes regenerados *in vitro* obtenidos en ensayos previos. Estos fueron subcultivados en medio MS+CA (1gL⁻¹) para promover su proliferación y elongación e incubados en las mismas condiciones que se utilizaron para la germinación de semillas. Los brotes con talla de 0.5-1 cm se seccionaron para obtener explantes apicales y laterales que fueron sembrados en el mismo tipo de medio y mantenidos en las mismas condiciones de incubación que los explantes

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

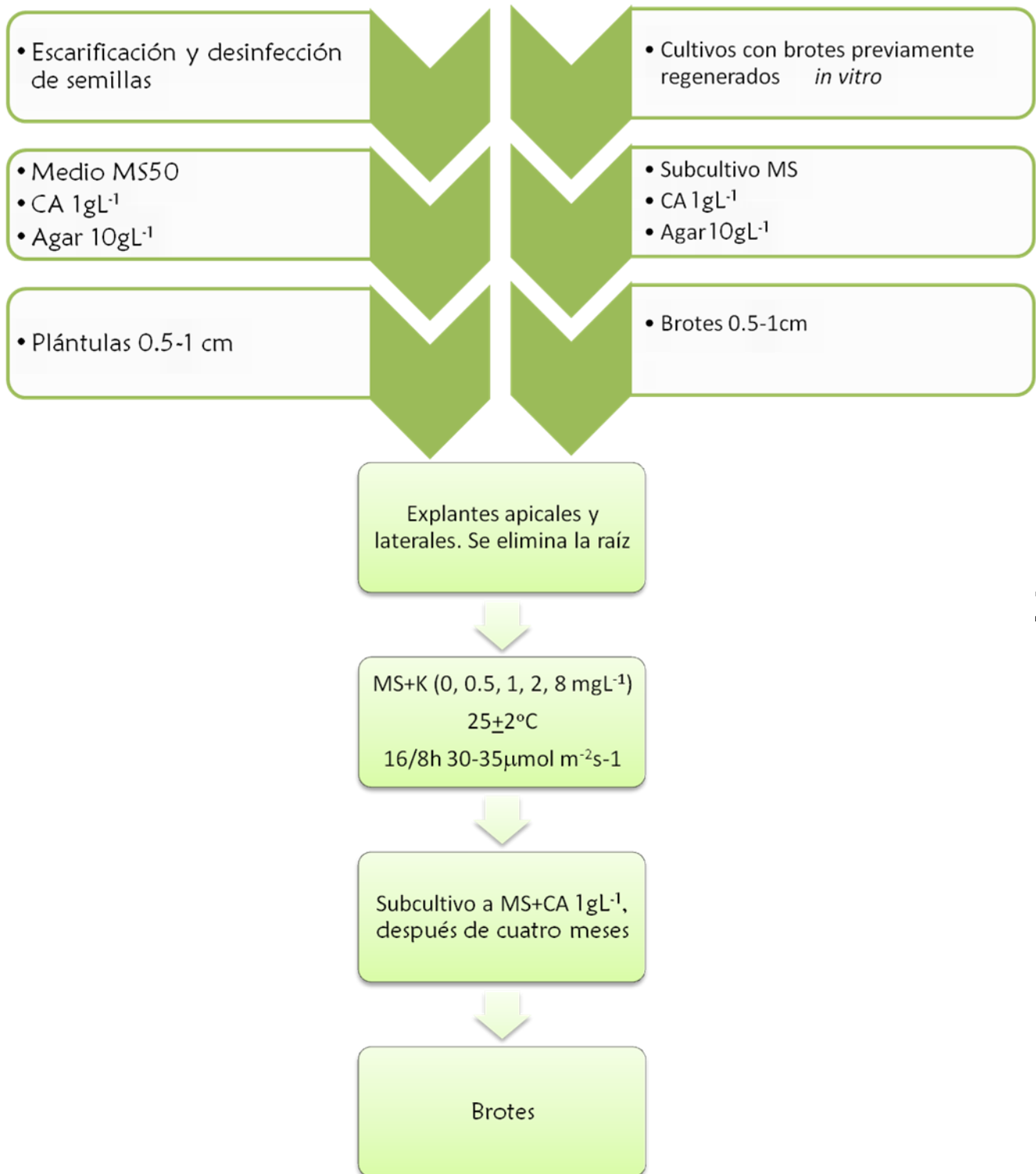
provenientes de plántulas germinadas, las respuestas morfogénicas a evaluar fueron las mismas.

Los explantes procedentes de brotes ya diferenciados también permanecieron en el medio de inducción cuatro meses y posteriormente fueron transferidos a medio MS+CA (1gL^{-1}) para su diferenciación. La metodología empleada se muestra en la figura 4.

- **Análisis estadístico**

Los datos fueron expresados como promedio y desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron evaluados mediante la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0. Además las diferencias entre los grupos se establecieron mediante el método de máxima verosimilitud, cuando el valor de p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”



30

Figura 4. Procedimiento para la propagación *in vitro* de *E. micromeris* a partir de explantes apicales y laterales de plántulas germinadas *in vitro* y brotes regenerados previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Germinación de semillas *in vitro***

La germinación inició entre el cuarto y el quinto día después de la siembra alcanzando su máximo para la siembra uno el día 14 (86.66%) y el día 20 (89.65%) para la siembra dos (Fig. 5). Los resultados obtenidos de ambas siembras están por arriba de lo reportado para otras especies de cactáceas tales como *Ariocarpus retusus* (63.8%) (Olguín, 1994), *Mammillaria schiedeana* subsp. *schiedeana* (76%) (Soria, 2006), *Thelocactus rinconensis* (85%) (Díaz, 2007), *Turbincarpus laui* (28.1%) (Mata et al., 2001) y *Cephalocereus senilis* (4%) (Tapia, 2006). Aunque las semillas tenían de 2-3 años de almacenamiento cuando se pusieron a germinar, tanto el porcentaje como las características morfológicas de las plántulas obtenidas fueron aceptables (Fig. 6).

31

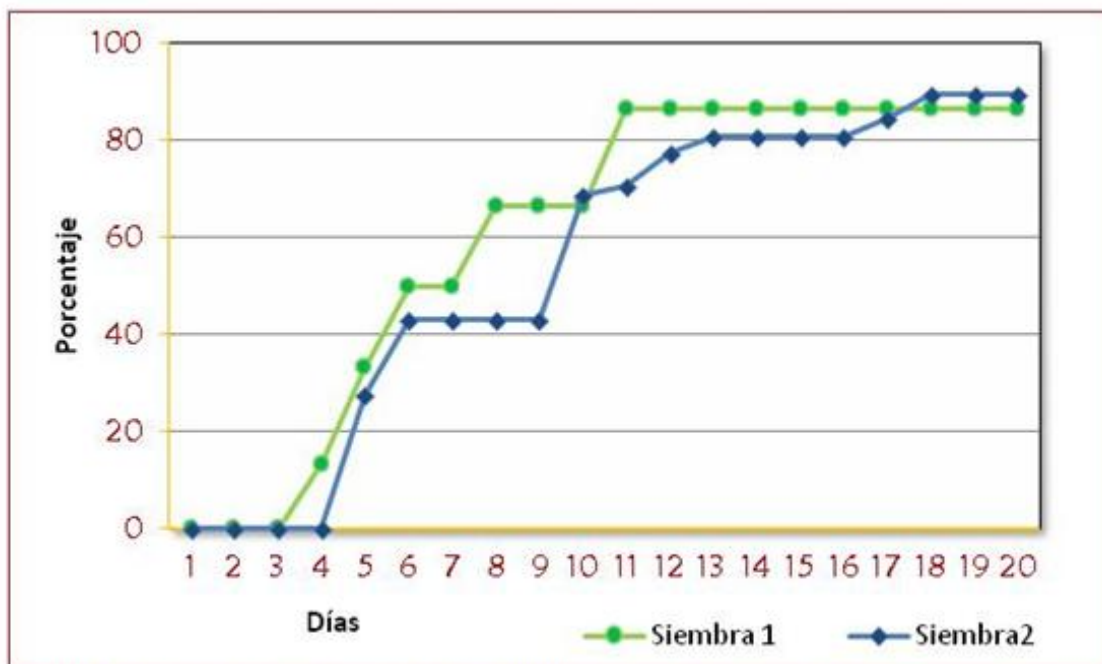


Figura 5. Porcentaje de germinación acumulada *in vitro* de semillas de *E. micromeris*.

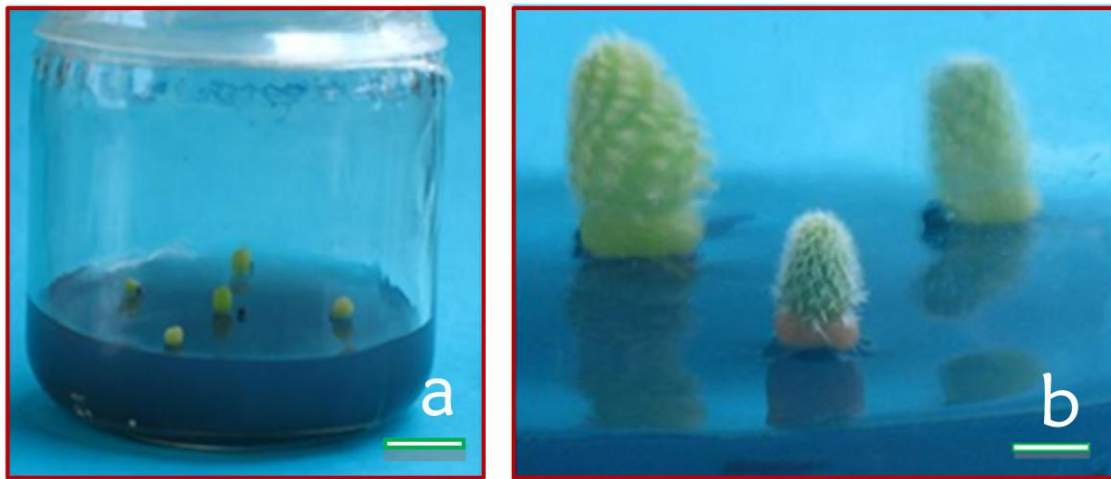


Figura 6. Plántulas de *E. micromeris* germinadas *in vitro*. a) Hipocótilos de cuatro semanas (1.5 mm de diámetro). b) Plántulas de ocho semanas (3 mm de diámetro). Barra=0.5cm

La escarificación con ácido sulfúrico (H_2SO_4) mostró resultados positivos en la germinación, ratificando que este tipo de escarificación química permite incrementar los porcentajes de germinación *in vitro* de semillas (Altare *et al.*, 2006). Sin embargo, el hecho de que poco menos del 20% de las semillas de *E. micromeris* nunca germinaron a pesar del proceso de escarificación, sugiere que la falta de respuesta puede deberse no sólo a la dureza y la impermeabilidad de la testa de la semilla, o la falta de viabilidad, sino a la influencia probable de otros inhibidores, todavía desconocidos. Problema que autores como Méndez (2007) resuelve empleando tratamientos con soluciones de calcio, para romper la dormancia de las semillas, ya que este elemento mineral juega un importante papel en el inicio del proceso fisiológico y como segundo mensajero en la modulación de hormonas. El porcentaje de germinación de *E. micromeris* en

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

medio MS50% (88%) fue superior a lo reportado por Mata *et al.* (2001) para *Turbincarpus laui* quienes reportaron un resultado de 28.1 % usando el mismo medio, tratándose del menor porcentaje reportado en su estudio, pues también utilizaron medio MS basal y MMS donde obtuvieron 41.7% y 40% respectivamente. La germinación también ocurrió gradualmente pero se obtuvieron mejores resultados en el presente estudio. También en el caso de *T. laui* inició hasta la tercera semana. Es importante tomar en consideración que el grosor y dureza de la cubierta seminal de cada especie, son factores determinantes la germinación.

Se han obtenido resultados favorables para la germinación *in vitro* de cactáceas aplicando tratamientos de escarificación con H_2SO_4 y posteriormente sembrándolas en medio MS50%, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Escarificación y uso de medio MS50% en la germinación *in vitro* de semillas de cactáceas.

Especie	Escarificación con H ₂ SO ₄	MS50 %	Germinación (%)	Referencia
<i>Ariocarpus retusus</i>	SI	SI	63.8	Olguín, 1994
<i>Turbincarpus laui</i>	SI	SI	28.1	Mata <i>et al.</i> , 2001
<i>Epithelantha micromeris</i>	NR	NR	NR	Velázquez y Soltero, 2001
<i>Opuntia ficus-indica</i>	SI	NR	58.6	Altare <i>et al.</i> , 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	SI	SI	94	Rodríguez, 2006
<i>Mammillaria schiedeana</i> subsp. <i>schiedeana</i>	SI	SI*	76	Soria, 2006
<i>Cephalocereus senilis</i>	SI	SI	4	Tapia, 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	SI	SI	96	Martínez, 2007
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	NO	SI*	83.3	Flores, 2007
<i>Thelocactus rinconensis</i>	SI	SI*	85	Díaz, 2007
<i>Thelocactus bicolor</i>	SI	SI*	96.66	Zamora, 2007

NR=no reportado

*=MS50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa

El porcentaje de hiperhidratación en plántulas germinadas (Fig. 7) de ambas siembras fue bajo (3-10%) comparado con el reportado para otras especies, como *Mammillaria coahuilensis*, en la que la hiperhidratación fue uno de los principales problemas para el crecimiento de las plántulas y la posterior obtención de explantes (Flores, 2007).

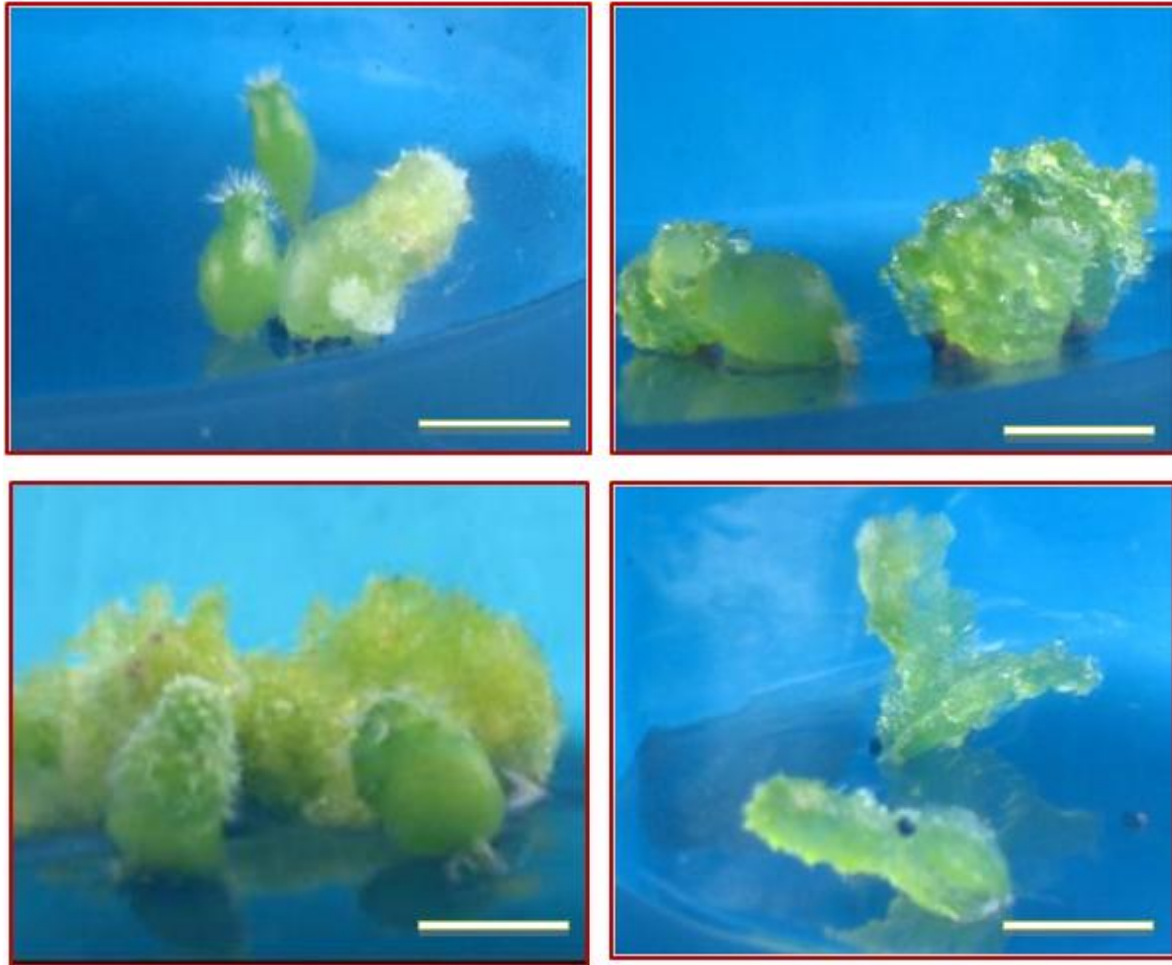


Figura 7. Plántulas hiperhidratadas de *Epithelantha micromeris* germinadas *in vitro*. Barra=0.5cm

Fue hasta después de siete meses que las plántulas alcanzaron de 0.5 a 1 cm de longitud, tamaño mínimo requerido para la obtención de los explantes (Fig. 8). El tiempo transcurrido demuestra su lento crecimiento *in vitro*, lo que sucede en condiciones naturales, lo cual es una de las dificultades para propagarse (Hernández y Godínez, 1994). Especies como *Thelocactus bicolor* (Zamora, 2007) después de 20 días, presenta tubérculos de 0.1 cm de longitud con formación de espinas en su extremo distal y las plántulas alcanzaron 0.5 cm de largo en tan solo cinco semanas.

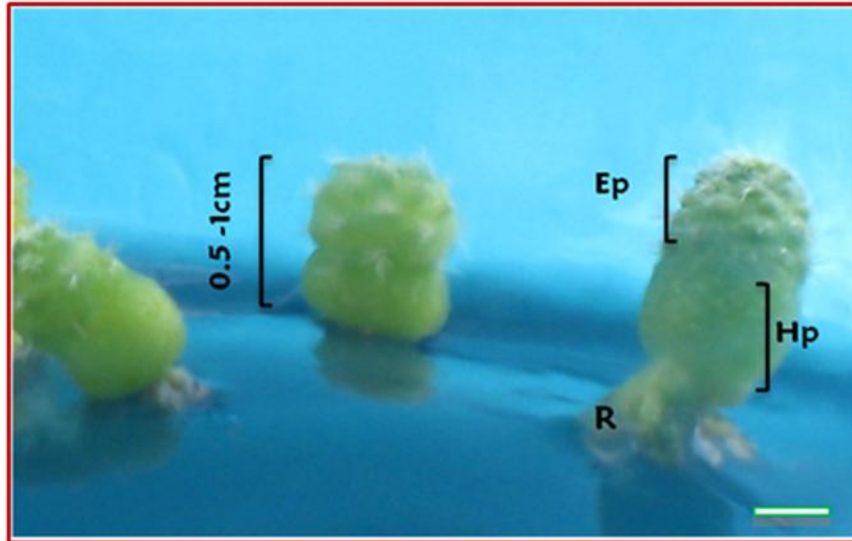


Figura 8. Plántulas germinadas *in vitro* de *E. micromeris* en medio MS50%, sacarosa 30 gL⁻¹, agar bacteriológico Bioxón® 10 gL⁻¹. Ep=epicotilo, Hp=hipocotilo, R=raíz. Barra=0.5cm.

El medio MS50 resultó óptimo para la germinación, ya que al trabajar con algunas otras cactáceas como *Echinocactus grusonii*, debido a que existen en el medio MS más solutos disueltos y menor potencial hídrico que restringe la posibilidad de las semillas para tomar agua (Rodríguez, 2006). Al mismo tiempo es recomendable para el desarrollo de las plántulas, pues la disponibilidad de nutrientes es mayor (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004).

- Respuestas morfogénicas
 - Explantes apicales

Después de 45 días de haber sido sembrados los explantes apicales en medio adicionado con K, éstos no formaron brotes, sino que los tejidos se

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

hiperhidrataron y como consecuencia de su posterior desorganización celular formaron callo, aún cuando el medio de cultivo no contenía auxinas, que son fitorreguladores que inducen la formación de callo tanto *in vitro* como *in vivo*, cuando existe un corte en la raíz o en las ramas (Brown, 1990). Se puede asumir que la formación de callo en los explantes apicales de *E. micromeris*, se debió a la presencia de auxinas endógenas en los tejidos del explante que incluían al meristemo apical, sumado al efecto de la escisión de los tejidos, pues de acuerdo con Taiz y Zeiger (2002) la combinación proporcionada de auxinas y citocininas en estos cultivos favorece la formación de callo.

La proliferación de brotes adventicios ocurrió cuando el medio de cultivo se fue agotando y perdiendo humedad, hasta quedar como una capa delgada en el fondo del frasco que contenía el callo, tal como reportan Bonness *et al.* (1993) para *Cephalocereus senilis*, quienes mencionan que los cultivos de callo permanecieron sin subcultivarse por meses sin algún cambio significativo de apariencia hasta agotar el medio en que se encontraban sembrados. Para los explantes apicales de *E. micromeris* que formaron callo, esto ocurrió a los cuatro meses, momento en el que dicho callo se subcultivó a medio MS sin el fitorregulador.

37

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

Después de cuatro semanas del subcultivo al medio MS+CA basal (sin fitorreguladores), en los explantes apicales que formaron callo comenzaron a diferenciarse estructuras globulares de color verde y de aspecto translúcido (Fig. 9), los cuales posiblemente son nódulos con centros de actividad meristemática que probablemente fueron los precursores de ápices de brotes, ó primordios de raíces que fueron definiéndose conforme el callo incrementó su tamaño, tal y como lo describen Evans *et al.* (2003); en su manual para cultivo de células vegetales, para cultivos de callo cuando el objetivo es la formación de brotes a partir de organogénesis indirecta.



Figura 9. a) Estructuras globulares formadas en el callo de *Epithelantha micromeris* después de cuatro semanas del subcultivo en medio basal. Barra=0.5cm.

La formación de brotes y raíces a partir de explantes apicales fue por organogénesis indirecta (Fig. 10) después de permanecer 30 días en medio MS basal, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.

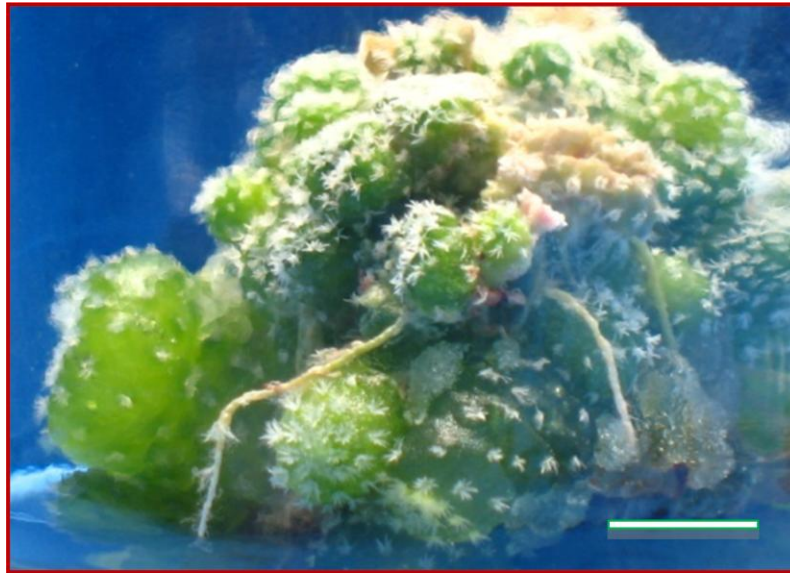


Figura 10. Los explantes apicales formaron brotes y raíces por organogénesis indirecta. Barra=0.5cm.

Tabla 3. Respuesta de los explantes apicales en medio MS+CA (1mgL⁻¹) a los 60 días de subcultivo.

K (mgL ⁻¹)	Explantes con brotes	Promedio de brotes por explante	No. de brotes por tratamiento	% de brotes hiperhidratados/tratamiento	% de explantes con callo
0	2/6	4.83	29	6.9	66.67
0.5	4/6	6.83	41	7.3	50
1	4/6	16.17	97	30.9	83.33
2	4/6	6.5	39	20.5	83.33
8	6/6	42	252	0.8	66.67

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

El tratamiento que presentó mayor regeneración de brotes fue K 8 mgL⁻¹, obteniéndose un promedio de 42 brotes/explante, seguido de K 1 mgL⁻¹ con 16.17 brotes/explante. Estos datos coinciden con lo publicado por Velázquez y Soltero (2001), al utilizar la misma concentración de K, para la cual obtuvieron 17.25 brotes/explante, siendo que como explante utilizaron un brote completo. Villavicencio y colaboradores (2012) usando altas concentraciones de kinetina utilizando como explantes segmentos de epicótilo obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro*. Al comparar ambos resultados, puede determinarse que la concentración óptima para obtener brotes/explante es K 8 mgL⁻¹, ya que también el proceso de organogénesis indirecta resultó más regenerativo.

Para la mayoría de las cactáceas propagadas *in vitro*, se reporta que las citocininas son indispensables para promover inducción de brotes. Ault y Blackmon (1987) reportaron para *Ferocactus acanthodes* el uso de K (10 mgL⁻¹) en combinación con ANA (1 mgL⁻¹) para proliferar brotes; obteniendo en promedio 7.9 ± 2.2 brotes por explante. Para *Cereus peruvianus* Machado y Prioli (1996) reportaron el uso de BA (1mgL⁻¹)/ANA (1mgL⁻¹) y K (1mgL⁻¹)/ANA (1mgL⁻¹) para regenerar brotes a partir de callo mediante la activación de aréolas, obteniendo 82 brotes/explante y 61 brotes/explante respectivamente. Mientras que para *Mammillaria albicoma* usando BA (5 mgL⁻¹)/ANA (0.1 mgL⁻¹) Wyka *et al.* (2006) reportaron la formación de callo y brotes a partir del mismo, usando meristemas florales, sin embargo no reportan el número obtenido.

En el presente trabajo, todas las concentraciones utilizadas de K (0.5, 1, 2, 8 mgL⁻¹) favorecieron la organogénesis indirecta de brotes, pues el número de brotes

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

en cada uno de los tratamientos fue mayor que en el control (4.8 brotes/explante).

- Explantes laterales

Los explantes laterales tuvieron escasa proliferación de brotes por organogénesis directa, a partir de aréolas durante las primeras semanas (Fig. 11a). Después de 45 días en el medio de inducción con K, éstos comenzaron a desdiferenciarse y a formar callo (Fig. 11b). Este fenómeno se explica, ya que, aunque el uso de citocininas como BA, en bajas concentraciones es efectivo para la activación de aréolas (Mauseth, 1979) y favorece la formación de brotes y la elongación de los mismos (García-Saucedo *et al.*, 2005). Además, puede inducir otro tipo de respuestas anormales en los explantes (Dabekaussen *et al.*, 1991) antecediendo la formación de callo a la de brotes (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Malda *et al.*, 1999). Cabe mencionar que autores como Johnson y Emino, 1979b, usaron K en bajas concentraciones (1-2 mg L⁻¹) con cultivos *in vitro* de *Mammillaria elongata* para la inducción exitosa de callo, como una de las respuestas morfogénicas para dicha especie, utilizado para la posterior regeneración de brotes de manera indirecta.

Después de cuatro meses de permanecer en el medio MS adicionado con K, los explantes laterales que formaron callo fueron subcultivados a medio MS+CA (1mgL⁻¹). Tras cuatro semanas de permanecer en éste medio, el callo comenzó a diferenciarse hasta la obtención de brotes (Tabla 4) (Fig. 11c, d).

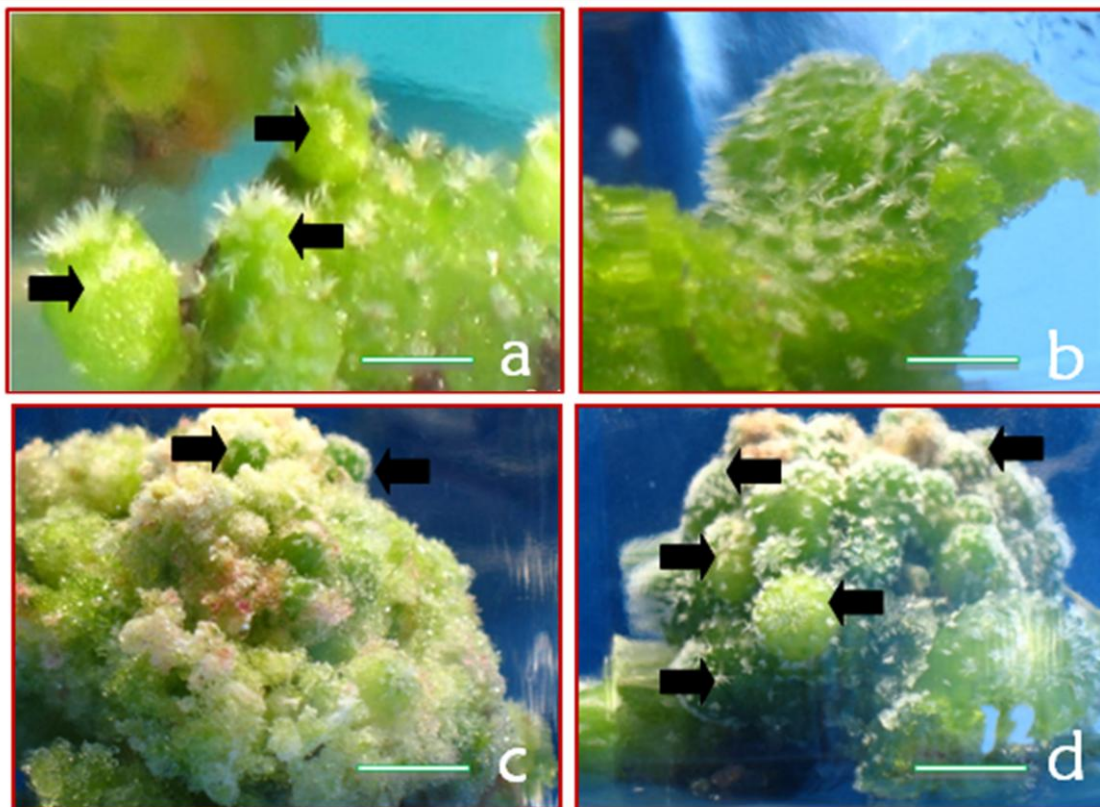


Figura 11. Secuencia del desarrollo de brotes en explantes laterales. a) Brotes originados por organogénesis directa (→); b) los brotes y los tejidos del explante se desdiferenciaron en callo (45 días); c) después de 30 días en medio MS+ CA, inicia la rediferenciación de los brotes (→); d) brotes obtenidos por organogénesis indirecta a partir de callo subcultivado en MS+CA. Barra=0.5cm.

42

Tabla 4. Respuesta de los explantes laterales en medio MS+CA (1mgL⁻¹) después de 60 días de subcultivo.

K (mgL ⁻¹)	Explantes con brotes	Promedio de brotes por explante	No. de brotes por tratamiento	% de brotes hiperhidratados/ tratamiento	% de explantes con callo
0	6/12	6.75	81	7.4	66.67
0.5	8/12	10.92	131	10.7	83.33
1	7/12	8	96	64.6	58.33
2	6/12	6.17	74	6.8	66.67
8	11/12	30.08	361	33.2	41.67

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

Al igual que en los explantes apicales, en los explantes laterales el tratamiento con el mayor promedio de brotes fue K 8 mgL⁻¹ de 30.08. Sin embargo, esta alta concentración de fitorregulador, produjo un porcentaje mayor al 30% de brotes hiperhidratados, porcentaje superior al reportado para otras especies de cactáceas propagadas *in vitro*, como *Echinocactus grusonii* (Rodríguez, 2006) y *Thelocactus bicolor* (Zamora, 2007) donde se obtuvieron 3.6% y 26.6% respectivamente. Este inconveniente se manifestó a pesar de agregar CA, pues la adición de este compuesto al medio de cultivo contrarresta la hiperhidratación de los tejidos (Pan y van Staden, 1998). La hiperhidratación también podría contrarrestarse al aumentar la cantidad de agar al medio para reducir el aporte de agua disponible.

43

Comparado con los explantes laterales, los apicales fueron el tipo de explante más regenerativo con un promedio de 42 brotes por explante, en la misma concentración K 8 mgL⁻¹. Además en éstos, se observó el menor porcentaje de brotes hiperhidratados (0.8%).

- **Brotes previamente regenerados *in vitro***

Después de la transferencia de los brotes obtenidos en ensayos previos de *E. micromeris* a medio MS con CA, se obtuvieron más de 100 nuevos brotes de talla adecuada (0.5-1 cm) para ser seccionados en explantes y sembrados en medio de inducción con Kinetina.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

Los explantes apicales y laterales procedentes de brotes previamente regenerados *in vitro* tuvieron altos porcentajes de respuesta a formación de callo (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Respuesta de los explantes apicales en medio MS+CA(1mgL⁻¹) después de 60 días de subcultivo.

K (mgL ⁻¹)	Explantes con brotes	Promedio de brotes por explante	No. de brotes por tratamiento	% de brotes hiperhidratados/tratamiento	% de explantes con callo
0	1/6	0.67	4	0	16.67
0.5	3/6	3.67	21	52.4	100
1	2/6	2.17	13	7.7	100
2	3/6	9.5	57	14	66.67
8	4/6	5.83	35	0	66.67

44

En los explantes apicales, el tratamiento K 2 mgL⁻¹ fue el que generó mayor respuesta a inducción de brotes/tratamiento (57) y un promedio de 9.5 brotes/explante. En general el porcentaje de brotes hiperhidratados fue bajo, excepto para la concentración de 0.5 mgL⁻¹ (52.4%), lo cual puede deberse a los múltiples subcultivos realizados en los ensayos previos.

Tabla 6. Respuesta de los explantes laterales en medio MS+CA(1mgL⁻¹) después de 60 días de subcultivo.

K (mgL ⁻¹)	Explantes con brotes	Promedio de brotes por explante	No. de brotes por tratamiento	% de brotes hiperhidratados/tratamiento	% de explantes con callo
0	1/12	0.17	2	100	33.33
0.5	3/12	1.58	18	0	25
1	3/12	1.58	19	0	75
2	2/12	0.42	5	0	75
8	5/12	3.25	39	15.4	66.67

En los explantes laterales, el mejor tratamiento fue también K 8 mgL⁻¹ donde se obtuvo la mejor respuesta a inducción de brotes (39 brotes/tratamiento y 3.25 brotes/explante). El porcentaje de brotes hiperhidratados fue bajo, excepto para el control (100%), que además presentó muy baja proliferación de brotes (2 brotes/tratamiento).

En este trabajo la regeneración de brotes a partir de explantes procedentes de brotes previamente regenerados fue menor, como en *Mammillaria schiedeana* subesp. *schiedeana*, para la cual se obtuvieron 3 veces menos el número de brotes utilizando brotes previamente regenerados que al usar plántulas germinadas *in vitro* (Soria, 2006).

Tanto en los explantes obtenidos de brotes previamente regenerados y los explantes de plántulas de semillas germinadas *in vitro* que se cultivaron en concentraciones bajas de kinetina, se observó formación de brotes en poco

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

tiempo (45 días), sin embargo, al permanecer dos semanas más en el medio de inducción los brotes comenzaron a desdiferenciar sus tejidos y formar callo. Por lo tanto, es recomendable realizar el subcultivo a medio MS basal antes de la formación de callo, entre las cuatro y seis semanas de permanecer en medio de inducción, para obtener una respuesta favorable en menor tiempo.

- **Análisis estadístico**

Se determinó estadísticamente que en los explantes apicales procedentes de las plántulas germinadas hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F=7.441$, $p=0.000$). La prueba de Tukey muestra que la concentración de 8 mgL^{-1} de K es la que genera un mayor promedio de brotes por explante (Fig. 12).

46

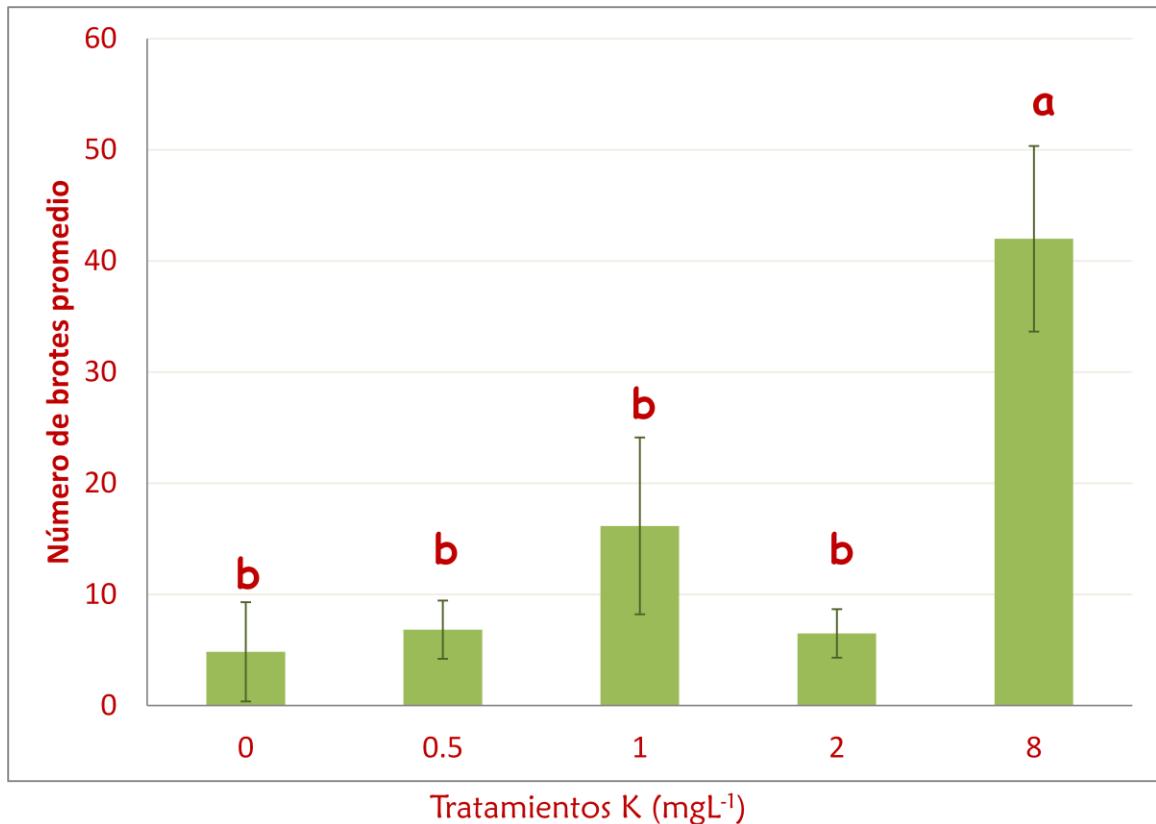


Figura 12. Número de brotes promedio por tratamiento a partir de ápices de plántulas germinadas *in vitro* de *Epithelantha micromeris*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

47

Respecto a los explantes laterales procedentes de plántulas germinadas también se registran diferencias estadísticamente significativas ($F=5.889$, $p=0.001$). Y la prueba de Tukey muestra que la concentración de 8 mgL^{-1} de K es en la que se obtuvieron mayor número de brotes regenerados en promedio, seguida de 0.5 mgL^{-1} de K con 30 y 10 brotes por tratamiento respectivamente (Fig. 13).

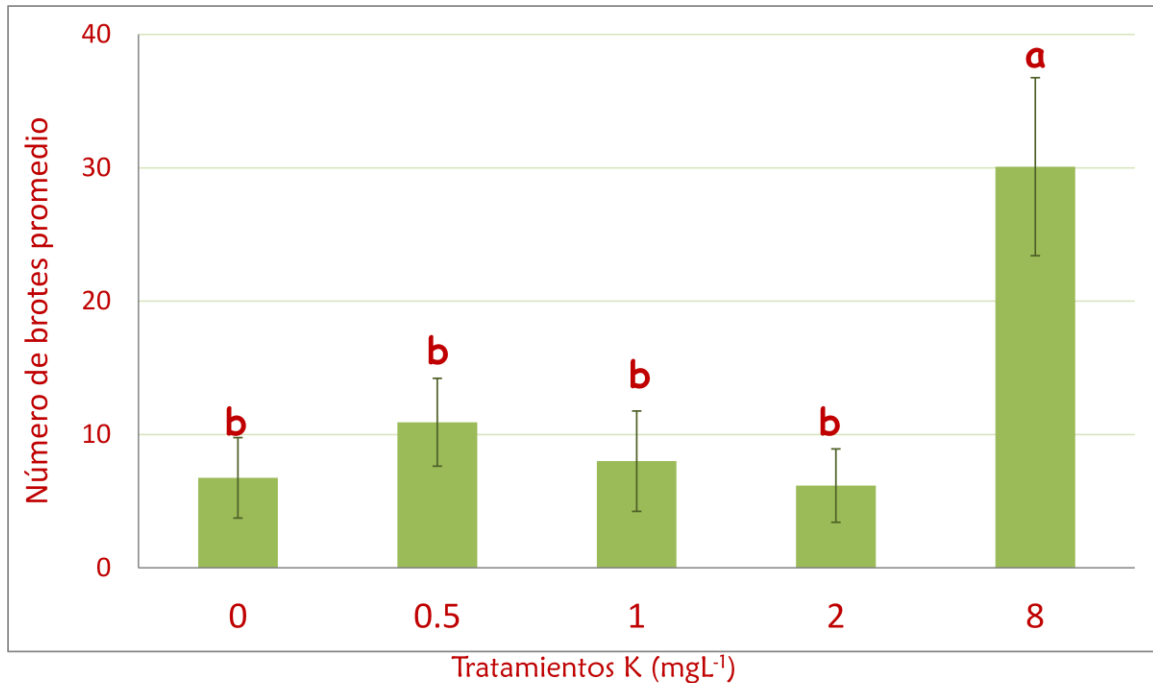


Figura 13. Número de brotes promedio por tratamiento a partir de explantes laterales de plántulas germinadas *in vitro* de *Epithelantha micromeris*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Para los explantes apicales procedentes de un ciclo previo de regeneración *in vitro* no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F=1.356$, $p=0.277$)(Fig. 14). Aunque el tratamiento de 2 mgL^{-1} de K es el que generó el mayor número de brotes promedio por explante 9.6, seguido de 8 mgL^{-1} de K con 5.8

Al igual que los explantes apicales de los brotes regenerados previamente, los explantes laterales no resultaron ser tan regenerativos, ya que no muestran diferencias estadísticamente significativas ($F=1.657$, $p=0.173$) y mayor número promedio de brotes promedio se obtuvo con 8 mgL^{-1} de K con 3.25 brotes por promedio (Fig. 15).

Los resultados de los explantes de brotes previamente regenerados señalan que son menos regenerativos, a pesar de que se colocaron en la misma concentración del fitorregulador, la respuesta es distinta y está influenciada por el origen del explante, pues se trata de brotes que poseen cantidades variables de K que han incorporado tras las siembras de exploración en las cuales se generaron (Soria, 2006).

En el presente trabajo para *E. micromeris* los mejores explantes para la micropropagación son los apicales procedentes de plántulas germinadas *in vitro*, sembrados en medio MS adicionado con 8 mgL⁻¹ de K, generando el mayor número de brotes promedio por tratamiento (40), seguido en menor proporción con 10 brotes promedio por tratamiento la concentración de 1 mgL⁻¹ de K.

Los explantes laterales procedentes de plántulas germinadas son más regenerativos que aquellos provenientes de un ciclo previo de regeneración, no obstante el alto porcentaje de hiperhidratación (33.2%).

Para la especie *Epithelantha micromeris* se obtuvo un resultado favorable al utilizar concentraciones altas de la citocinina Kinetina, la cual implica menor costo económico que otras citocininas, tales como 2iP (Velázquez y Soltero, 2001), además el CTV resulta ventajoso para su propagación debido a su rápido crecimiento y reproducción *in vitro* en contraste con el lento proceso sumamente lento de adaptación y desarrollo de los organismos silvestres que permanecen en condiciones de invernadero.

De acuerdo a lo observado es recomendable que los explantes permanezcan entre 30 y 45 días en el medio de inducción y tras este periodo de tiempo sean subcultivados a medio basal MS+CA (1gL⁻¹) para obtener proliferación de brotes más pronto a través de organogénesis directa, evitando la formación de callo, complementado con los estudios histológicos y de competencia morfogénica, para corroborar el mejor tiempo de inducción en los explantes utilizados.

Cabe destacar la gran capacidad de regeneración de brotes mediante organogénesis indirecta que *E. micromeris* posee, característica que no ha sido reportada frecuentemente en otras especies de cactáceas, ya que también es una alternativa importante para su propagación *in vitro*.

El promedio de brotes por explante obtenidos en el mejor tratamiento (explantes apicales de plántulas germinadas *in vitro* colocadas en 8 mgL⁻¹ K) es superior a lo reportado para otras especies y el único trabajo existente para *E. micromeris* (tabla 1), por lo tanto dicho tratamiento resulta eficaz para la micropropagación de esta especie.

CONCLUSIONES

- ✓ El porcentaje de germinación de semillas de *E. micromeris* resultó exitoso bajo las condiciones probadas (88%), mismas que demostraron ser eficientes para obtener un bajo nivel de hiperhidratación de plántulas (3-10%).
- ✓ La formación de brotes ocurrió en todas las concentraciones de Kinetina ensayadas tanto en explantes apicales como laterales procedentes de plántulas germinadas *in vitro* y en explantes de brotes previamente regenerados.
- ✓ Los brotes se formaron por organogénesis indirecta en los explantes apicales, tanto en plántulas germinadas *in vitro* como en brotes previamente regenerados *in vitro*.
- ✓ En los explantes laterales obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*, la formación de brotes se inició por organogénesis directa a partir de aréolas, lo que posteriormente se desdiferenciaron en callo que regeneró brotes por organogénesis indirecta.
- ✓ En los explantes laterales obtenidos de brotes previamente regenerados *in vitro* la formación de brotes ocurrió por organogénesis indirecta.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- ✓ En explantes procedentes de plántulas germinadas *in vitro* la mejor concentración para la formación de brotes por explante fue K 8 mgL⁻¹, en apicales (42) y laterales (30).
- ✓ En explantes apicales procedentes de brotes previamente regenerados *in vitro*, la mejor respuesta fue con K 2 mgL⁻¹ (9.5 brotes por explante), mientras que en explantes laterales K 8 mgL⁻¹ fue la mejor para regenerar brotes (3.25 brotes por explante).
- ✓ La técnica de propagación de *Epithelantha micromeris* quedó establecida al utilizar la hormona Kinetina, la cual demostró ser eficiente en la inducción para formar brotes.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

ANEXO I

Epithelantha micromeris (Engelm.) Weber ex Britton et Rose (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

Tallo globoso, subgloboso o crotamente ovoideo, de 4 a 5 y hasta 8 cm de altura por 2.5 a 6 cm de diámetro, cubierto por las espinas; ápice hundido y recubierto por un mechón de espinas erguidas. Tubérculos dispuestos en 21 y 34 series espiraladas, cónico-cilíndricos, de 1.5 mm de longitud y 3 mm de altura, ocultos por las espinas. Areólas pequeñas, alargadas, dimorfas, la florífera adyacente a la espinífera, situada en el ápice de los tubérculos, cuando jóvenes con lana blanquecina. Espinas 13 a 28 y hasta 40 dispuestas en 1, 2 o 3 series, según la edad de la planta, generalmente todas son radiales, de 5 a 8 mm de longitud, en ciertas variedades hay algunas interiores que han sido consideradas como centrales; todas son aciculares, barbeladas, glandulosas, blancas, o con tintes amarillentos, de color rosa castaño rojizo, pectinadas o algo así, horizontalmente radiadas, ascendentes; en las aréolas apicales las externas son las más largas y erectas, y se agrupan formando un pincel; es frecuente que con el tiempo las espinas se rompan más o menos a la mitad. Flores brotando de las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes cercanos al ápice del tallo, muy pequeñas, infundibuliformes, abriéndose poco, de 3 a 5 mm de longitud y de 3 a 6 mm de diámetro, emergiendo muy poco entre la lana y las espinas del ápice del tallo; pericarpelo algo caviforme, desprovisto de escamas; segmentos exteriores del perianto 3 a 5; hiperbólicos, de 1 a 2 mm de longitud y 2 mm de anchura, con el ápice redondeado y el margen

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

irregularmente dentado, de color rosa pálido con la línea media más oscura; segmentos interiores del perianto cerca de 5, casi obdeltoides, de 1 a 1.5 mm de longitud, de color rosa pálido: estambres 10 a 15, de color amarillo claro; estilo amarillento, lóbulos del estigma 3 a 4, amarillentos. Fruto claviforme, generalmente largo y angosto, de 3 a 12 mm de longitud y 1.5 a 5 mm de diámetro, sin escamas, rojo, sin conservar adheridos los restos secos del perianto. Semillas angostamente ovoides, de 1.5 a 2 mm de longitud, 1 mm de anchura y 0.8 mm de espesor; hilo largo, oblicuo, amplio y hundido; micrópilo en la porción aguda de las semillas; testa finamente reticulada; perispermo escaso, embrión corto, con los cotiledones apenas distinguibles. Crece en terrenos calcáreos, en matorrales xerófilos. Es una especie muy variable y por ello se han descrito diversas variedades, algunas de las cuales quizá sean en realidad tan sólo formas ecológicas o de crecimiento.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

ANEXO II. Formulación de los medios de cultivo MS y MS50% (Murashige y Skoog, 1962).

	MS mgL⁻¹	MS50% mgL⁻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 . 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
VITAMINAS		
Ácido nicotínico (B3)	0.50	0.25
Piridoxina- HCL (B6)	0.50	0.25
Tiamina- HCl (B1)	0.10	0.05
INOSITOL		
myo- Inositol	100.0	50.0
Glicina		
	2.00	1.000
Sacarosa		
	30 gL ⁻¹	15g L ⁻¹
pH		
	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8
Agar		
	8 gL ⁻¹	8g L ⁻¹

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

BIBLIOGRAFÍA

- Altare M, S. Trione, J. C. Guevara y M. Cony. 2006. Stimulation and Promotion of Germination in *Opuntia ficus-indica* Seeds. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 8:91-100.
- Anderson E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland, Oregon. p. 73-83.
- Arias M. S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 44:109-115.
- Arias S., U. Guzmán, M. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 4(50):100-125.
- Ault J. R. y W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22(1):126-127.
- Barbour G. M. y N. L. Christensen. 1993. Vegetation of North America, North of Mexico. Chapter 5: Flora of North America. Oxford University Press, New York. 97-131.
- Bárcenas R. T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* 68:11-15.
- 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* 32:1-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 40:8-11.
- Bonness M. S., P. W. Paré y T. J. Mabry. 1993. Novel callus and suspension cultures of the “old man” cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cactus and Succulent Journal* 65: 144-147.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México II. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Brown J. T. 1990. The initiation and maintenance of callus cultures. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (Ed.). *Methods in Molecular Biology*, vol. 6: *Plant Cell and Tissue Culture*. Humana Press Inc. E. U. A.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Cactimex. 2013. página en red:
<http://www.cactimex.com/esp/frameset%20.htm> (fecha de consulta: enero 2013).
- Cassells A. C. y R. F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue cultura: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145-157.
- Castro-Gallo I.A., E. Meza-Rangel, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae*. México. 4(2):5-24.
- CITES. (Convención sobre el Comercio Internacional en Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) 2013. Página en red:
<http://www.cites.org/esp/index.shtml> (fecha de consulta: enero 2013).
- Collin H. A. y G. S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. Springer. Bios Scientific Publishers. Capítulo 13. 121-137p.
- Dabekaussen M. A., R. L. M. Pierik, J. D. van der Laken y J. Hoeck Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the catcus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae* 46:283-294.
- Dávila-Figueroa C. A., M. L. de la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Celular Developement Biology-Plant* 41:540–545.
- 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.
- Domínguez M. S., A. G. Alpuche, N. L. Vasco y E. Pérez-Molphe. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 31:317-322.
- Evans D. E., J. D. Coleman y A. Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. Bios Scienific Publishers. London. 63-69 pp.
- Fay M. F. 1991. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 28:1-4.
- Fay M. F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Fay M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. *Biodiversity and Conservation* 3:176-187.
- 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.
- Foro antiguo, 2013. Página en red: <http://foroantiguo.infojardin.com> (fecha de consulta: enero 2013).
- Forums, 2013. Página en red: <http://forums.gardenweb.com/forums/load/cactigal/msg1214175414468.html> (fecha de consulta: enero 2013).
- García-Saucedo P. A., M. Valdez-Morales, M. E. Valverde, A. Cruz-Hernández y O. Paredes-López. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 215-219.
- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular Development Biology- Plant* 32:272-289.
- Gaspar T., T. Franck, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J. F. Hausman y S. Dommès. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 37:263-285.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited. England. 550pp.
- George E. F., M. Hall, y G. De Klerk, G. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol. 1 Background, 3rd Edition. Springer. England. 501pp.
- 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.
- Glass C. 1998. Guía para la identificación de Cactáceas amenazadas de México. Vol. I. Ediciones Cante. México, D.F.
- Gómez R. 1998. Cultivo de células y tejidos. En: Pérez J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. p. 25-44.
- González R. H., A. C. Ramos, J. B. Carrillo y H. Silos. 2000. Biotecnología Vegetal. Manual de Cultivo de Tejidos. Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. México 133 pp.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Gratton J. y M. F. Fay. 1999. *In vitro* propagation of succulent plants. En: Hall, R. D. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*, vol.III: Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc. E.U. A. p. 135-140.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM-CONABIO. México, D.F. 315 pp.
- Hartmann H. T., D. E. Kester, F. T. Davies, R. L. Geneve. 1997. *Plant propagation: principles and practices*. 6a. edición. Pentrice-Hall. EUA. 590-592.
- Hernández H. M. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Hernández J. G., R. J. Chávez y E. Sánchez M. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto Queretano. *Biodiversitas*. 70:6-9.
- Hu C. V. y J. P. Wang. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. En: Evans, D. A., P. V. Amirato y Y. Yameda (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*. McMillan Publishing, New York. 177-227 pp.
- Jiménez, G. E. A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez Ponce, J. (Ed.). *Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24.
- Johnson J. L. y E. R. Emino. 1979a. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal* 31:275-277.
- Johnson J. L. y E. R. Emino. 1979b. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14(5). 605-606.
- Kolár Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experientia* 32:668-669.
- López H., A. 2009. Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Morán (Cactaceae), especie amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México. 67pp.
- Machado M. F. P. S. y A. J. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 32:199-203.
- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Mandujano M., J. Golubov y J. Reyes. 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. *Biodiversitas* 6(40):2-7.
- Márquez V. A. 2001. Inducción y multiplicación *in vitro* de tejido calloso de *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria herrerae* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), FES Zaragoza, UNAM. México. 57 pp.
- Martínez 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. M. Peters. 2009. Disturbance-response analysis: A method for rapid assessment of the threat to species in disturbed areas. *Conservation Biology* 23(2):377-387.
- Mata M., M. A. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37:400-4004.
- Mauseth J. D. 1977. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal* 49:80-81.
- Mauseth J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axilar buds. *Cactus and Succulent Journal* 51:186-187.
- Medeiros L., R. C. Salvador, L. A. Gallo, E. Tiago y M. E. Soares. 2005. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:165-169.
- Méndez E. 2007. Germination of *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose (Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 68:678–682.
- Moebius-Goldammer K., M. Mata R. y V. M. Chávez Á. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.)K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39(4):388-393.
- Mohamed Y. Y. 2002. “Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)”, *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38:427-429.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM. México, D. F. 103-106 p.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Olguín S., L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de ciencias, UNAM. México. 85 pp.
- Ortega-Baes P. y H. Godínez-Álvarez. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15:817-827.
- Ortíz-Montiel J. G. y R. Alcántara. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 43(1):3-6.
- Pan M. J. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation* 26:155-163.
- Papafotiou M., G. Balotis, P. Louka, J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:163-167.
- Paunescu A. 2008. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14:4095-4103.
- Pérez J. N. 1998. Variación somaclonal. En: Pérez, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. 105-121 pp.
- Pérez J., R. Flores y G. Ortíz. 1999. Reproducción *in vitro* del “Cactus de Navidad” *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44(3): 79-83.
- Pérez-Molphe-Balch E. P., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E. P., R. Ramírez, H. G. Núñez y N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1ª. Edición. México. 179 pp.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Pierik R. 1993. Micropropagation. Technology and Opportunities. En: Prakash J. y R. Pierik (Eds.). Plant Biotechnology. Commercial prospects and problems. International Science Publisher. New York. p. 9-22.
- Razdan M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, inc. E. U. A. 375 pp.
- Robbins C. S. 2003. Parte I Los cactus del Desierto Chihuahuense en los Estados Unidos: Una evaluación del comercio, la administración y las prioridades de conservación. En CS Robbins (ed.). Comercio Espinoso, comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. TRAFFIC North America WWF. 57 pp.
- Rodríguez G., M. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 77 pp.
- Rojas-Aréchiga M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85–104.
- Rosas-López U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto. fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *International Journal of Experimental Botany* 73:213-220.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63:163-169.
- Rubluo A., 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.
- Rzedowski J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (comp.). Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución. UNAM. México, D. F. p. 129-148.
- Santos-Díaz M. S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez, M. L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* Organogenesis of *Pelecypora aselliformis*. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 39(5):480-484.

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Schwarz O. J. y R. M. Beaty. 2000. Organogenesis. En: Trigiano, R. N. y D. J. Gray. (Ed.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. 2ª. edición. E.U. A. 125-137 pp.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. 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. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de Diciembre de 2010. México, D. F.
- Smith R. 1992. Plant tissue culture, techniques and experiments. Academic Press Inc. California. 171 pp.
- Starling R. J. y J. H. Dodds. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1:84-90.
- Steinhart C. E. 1962. Tissue cultures of a cactus. *Science*. 137:545-546.
- Soria D. 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subsp. *schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana. México. 74 pp.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3th Edition Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. USA 683pp.
- Tapia D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 73 pp.
- Thorpe T. A. 1990. The current status of plant tissue culture. *Plant tissue culture: applications and limitations* 1990:1-33.
- Vasil I. K. 1994. Automation of Plant Propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39:105-108.
- Velázquez L. y R. Soltero. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46(3):56-62.
- Verdi. 2013. Pagina en red:
<http://www.verdi.mx/component/search/epithelantha.html?ordering=newest&searchphrase=all> (fecha de consulta: enero 2013).

“Propagación por cultivo de tejidos vegetales de *Epithelantha micromeris* (Engelmann) Weber ex Britton et Rose especie sujeta a protección especial”

- Villavicencio E. E., A. González, A. Arredondo, L. Iracheta, S. Comparan y R. Casique. 2011. Micropropagación de *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) Jhon y Riha cactacea ornamental del desierto Chihuahuense, en estatus de riesgo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2:37-54.
- Vyskot B. y Z. Jára. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 59(3):449-452.
- Wyka T., M. Hamerska y M. Wróblewska. 2006. Oranogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87:27-32.
- Wyka T. 2008. *In vitro* reversion of cephalial tissue to vegetative growth in *Melocactus matanzanus*. *Cactus and Succulent Society of America* 14:185-188.
- Zamora M., H. C. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México. 45 pp.