



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROPROPAGACIÓN DE *Mammillaria coahuilensis*
(BOED.) MORAN (CACTACEAE), A PARTIR DE
SEMILLAS DE PLANTAS REGENERADAS *in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LAURA LORENA RODRÍGUEZ NÚÑEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA**

México, D. F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Rodríguez
Núñez
Laura Lorena
82 83 23 64
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306231791

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.
Sonia
Vázquez
Santana

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Laura Patricia
Olguín
Santos

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Octavio
González
Caballero

7. Datos del trabajo escrito

Micropropagación de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (CACTACEAE), a partir de semillas de plantas regeneradas *in vitro*.
70p.
2014

La presente investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla en el laboratorio de Desarrollo de Plantas de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del taller titulado “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”.

DEDICATORIA

En Memoria:

† De mi abue Esperanza Gómez López que a pesar de que hace 16 años nos dejó, la sigo amando y recordando cada día.

A mis padres María del Carmen Núñez Sotelo y Venancio Rodríguez Gómez, a quienes les agradezco infinitamente su amor, su apoyo y sobre todo su amistad, sin ellos no sería la persona que soy ahora, los amo y los amaré el resto de mi vida.

A Juan, gracias amor mío por tu apoyo y tu amistad incondicional, gracias por tu amor que crece cada día, gracias por tus enseñanzas y por toda la ayuda que me has brindado, siempre estás ahí cuando te necesito, en los buenos y malos momentos, en la salud y en la enfermedad y espero que siga siendo así por el resto de nuestras vidas, quiero que sepas que siempre te amaré y que siempre estaremos juntos pase lo que pase. Te amo.

A mis hermanos y principalmente a José Luis y Azula quienes dan ese toque infantil y alegre a mi vida, los amo pequeños. A Erik y Eli.

A mis amigos del Jardín Botánico, Gabriel, Gaby, Jacquie, Gil e Isai, gracias por su amistad.

A mis amigos del Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Clarita, Lupita, Cristina, Erika, Yuri, Claudio y Víctor, siempre tendrán mi apoyo y mi amistad.

A mis amigos Victorcito, Alejandra, Lily, Lulú, César, Isabel y Ángeles, muchas gracias por su amistad y por los valiosos momentos que hemos tenido juntos.

A Guillermina Cruz y Guillermo Guzmán quienes me ayudaron cuando más los necesitaba, gracias por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- ✚ A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de estudiar la carrera que tanto deseaba.
- ✚ A la Facultad de Ciencias por ser parte de mi hogar durante estos años.
- ✚ Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones, equipo y recursos para la realización de este proyecto.
- ✚ A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, Técnico Académico de la Unidad de Ambientes Controlados por facilitar el uso de las cámaras de ambientes controlados y el invernadero, además por sus enseñanzas y asesoría.
- ✚ A la M. en B. María Eugenia Muñoz Díaz de León, Técnico Académico responsable del Taller de Plantas I y II, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las instalaciones y equipos para llevar a cabo este proyecto.
- ✚ A la Dra. Ana Laura López Escamilla por ser una gran persona, maestra y amiga, por su apoyo, paciencia, interés y entusiasmo al dirigir este proyecto, por sus conocimientos y consejos, verdaderamente muchas gracias.
- ✚ A las profesoras de taller titulado “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”: Ana Laura López Escamilla, Laura Patricia Olguín Santos, Sonia Vázquez Santana, Margarita Collazo Ortega, Judith Márquez Guzmán y Karina Jiménez por compartir sus enseñanzas conmigo.
- ✚ A la Dra. Margarita Collazo Ortega por la revisión del manuscrito y sus valiosos comentarios.
- ✚ Al Dr. Salvador Arias por facilitar las fotos de *Mammillaria coahuilensis*.
- ✚ Al Biól. Héctor Islas Huitrón por ser el primero en inculcarme el amor por el Cultivo de Tejidos Vegetales y sobre todo el amor y respeto por las cactáceas, muchas gracias.
- ✚ Al Biol. Gabriel Olalde Parra por introducirme en el maravilloso mundo de las cactáceas, por toda su ayuda en este proyecto, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.
- ✚ A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos por la ayuda y la asesoría durante todo el proyecto, además por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo por su amistad, su apoyo y su paciencia.
- ✚ A Octavio González Caballero quien me ayudó a profundizar en el mundo del Cultivo de Tejidos Vegetales, gracias por esas maravillosas clases y por tu amistad.
- ✚ Por último a la Dra. Judith Márquez Guzmán, a la Dra. Sonia Vázquez Santana, a la Dra. Ana Laura López Escamilla, a la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos y al M. en C. Octavio González Caballero por la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Generalidades de las cactáceas.....	5
2.2 Características generales y adaptaciones de las cactáceas.....	7
2.3 Usos e importancia de las cactáceas.....	10
2.4 Problemática de las cactáceas.....	12
2.5 Género <i>Mammillaria</i>.....	12
2.6 <i>Mammillaria coahuilensis</i>.....	14
2.7 Métodos de propagación en cactáceas.....	16
2.8 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).....	16
2.9 Etapas de la micropropagación.....	17
2.10 Problemas en cultivo <i>in vitro</i>.....	21
2.11 Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Mammillaria</i>.....	23
2.12 Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Mammillaria coahuilensis</i>.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Selección de la planta madre.....	30
5.2 Establecimiento de los cultivos asépticos.....	30
5.3 Elongación de las plántulas (medio líquido).....	30
5.4 Siembra de explantes e inducción de brotes.....	31
5.5 Elongación y enraizamiento.....	32
5.6 Aclimatización.....	32
5.7 Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1 Desinfección, siembra y germinación.....	34
6.2 Elongación de plántulas (medio líquido).....	37
6.3 Respuestas morfogénicas.....	38
6.3.1 Formación de brotes por activación de aréolas.....	39

6.3.2 Explantes apicales.....	41
6.3.3 Explantes laterales.....	44
6.3.4 Oxidación.....	49
6.3.5 Brotes secundarios.....	50
6.4 Subcultivo, individualización y enraizamiento de brotes.....	51
6.5 Aclimatización.....	53
7. CONCLUSIONES.....	58
8. ANEXO.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2iP	N ⁶ -2, Isopentenil adenina
AIA	Ácido Indol-3-acético
AIB	Ácido Indol-3-butírico
ANA	Ácido α Naftalenacético
BA o BAP	N ⁶ -Benciladenina o N ⁶ -Bencilaminopurina
CA	Carbón activado
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
K	Kinetina
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	Medio Murashige y Skoog al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa
NOM	Norma Oficial Mexicana
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
Z	Zeatina

RESUMEN

El 27% de las especies del género *Mammillaria* (Cactaceae) se encuentran amenazadas de extinción, por ello se han implementado medidas para su conservación como la propagación *in vitro*. *Mammillaria coahuilensis* es una especie endémica del estado de Coahuila, tiene una distribución restringida y se encuentra amenazada. En la presente investigación se utilizaron semillas provenientes de plantas propagadas *in vitro*, que fueron polinizadas manualmente, para evaluar su capacidad de germinación así como hacer más eficiente su micropropagación. Semillas de *M. coahuilensis* se desinfectaron y sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) obteniéndose el 75% de germinación. Para promover la elongación de las plántulas éstas se transfirieron a medio líquido con puentes de papel filtro durante 25 días y para evitar la hiperhidratación fueron subcultivadas en medio MS + 1.5 gL⁻¹ de carbón activado (CA), en el cual se mantuvieron por 20 días. Las plántulas se utilizaron como fuente de explantes apicales y laterales que se sembraron en medio MS adicionado con N⁶-Benciladenina (BA) (0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) y N⁶-2, Isopentenil adenina (2iP) (0.5, 1 y 2 mgL⁻¹). Se obtuvo la regeneración de brotes por la activación de yemas (aréolas). El mayor número de brotes se presentó en el medio con 2 mgL⁻¹ de BA (13.3 brotes promedio por explante lateral y 10.6 brotes promedio por explante apical). Los brotes fueron transferidos a medio MS + CA 1.5 gL⁻¹, algunos se individualizaron y otros permanecieron unidos al explante inicial. Los brotes más vigorosos se obtuvieron en los tratamientos con BA y 2iP ambos con 0.5 mgL⁻¹. Posteriormente 97 de los brotes se aclimatizaron para establecerlos en condiciones de invernadero, aquellos que no desarrollaron raíces se injertaron en patrones de *Myrtillocactus geometrizans*.

1. INTRODUCCIÓN

El grupo de las angiospermas tiene aproximadamente 135 millones de años en la Tierra, además constituye el conjunto de organismos más diverso del reino Plantae, cuenta con alrededor de 260 000 especies cubriendo todos los continentes, de esta magnitud es el éxito de las angiospermas y sin ellas, la vida como la conocemos no existiría (Martínez, 2013). A este grupo pertenecen diversas familias, entre ellas la familia Cactaceae.

La familia Cactaceae es una de las más fascinantes por su diversidad de formas, ya que si hablamos del hábito de las plantas (forma exterior) las hay arbustivas o arbóreas y si hablamos del hábito de crecimiento (figura geométrica de los individuos) las hay globosas, cilíndricas y columnares (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012). Son uno de los grupos más notables de las zonas áridas de México junto con los magueyes, mezquites y yucas; son endémicas del continente americano y en México se encuentra la mayor cantidad de especies ya que cuenta con 83 géneros y 913 taxones, muchos de éstos son endémicos. Este gran endemismo se debe a las condiciones de latitud, topografía, climas, entre otras (Bravo-Hollis, 1978). Entre estas plantas se pueden mencionar los cactus columnares (*Cephalocereus*, *Pachycereus*, *Neobuxbaumia*); los cactus candelabroiformes (cardones, órganos y pitayas); las biznagas (*Echinocactus*, *Ferocactus*) y biznaguillas (*Mammillaria*), algunas trepadoras como los nopalillos (*Heliocereus*); las pitahayas (*Hylocereus*) y una gran variedad de nopales (*Opuntia*), entre otras (Jiménez, 2011). Se ha reportado el uso de este tipo de plantas desde la época prehispánica, ya que desde entonces estos organismos han sido utilizados de manera ornamental y en rituales religiosos, además tienen una gran importancia medicinal y alimenticia (Bravo-Hollis, 1978). Por éstas y otras razones la mayoría de las cactáceas están amenazadas o en peligro de extinción.

El género *Mammillaria* cuenta con 392 especies y es el más diverso y popular en la familia Cactaceae, lo anterior reside básicamente en la enorme variabilidad del

género, de sus formas, color de las flores, su pequeño tamaño, su relativa facilidad para cultivarlas y mantenerlas, todo lo cual les da una gran importancia ornamental, desafortunadamente, estos factores hacen que muchas especies del grupo estén amenazadas (Rubluo, 1997), según la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) (SEMARNAT, 2010) 108 especies están en alguna categoría de riesgo. *Mammillaria coahuilensis*, es una especie endémica de México con una distribución restringida (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). La NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) la cataloga como Amenazada, por lo que es urgente que se implementen medidas orientadas a su conservación, como la propagación *in vitro*.

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido exitosas en la propagación asexual de numerosas especies, incluyendo cactus y orquídeas, entre otras, ya que se pueden producir miles de plantas genéticamente idénticas si se usan fragmentos de tejido, los cuales pueden ser removidos de la planta donante sin que ésta sufra un daño significativo (Mauseth, 1977), se basan en la totipotencialidad de las células vegetales y son especialmente importantes en la conservación de especies que están en grave peligro, de las que restan pocos individuos y donde la variación genética se ha perdido casi por completo ya que si se necesita conservar la diversidad genética de una población, lo más conveniente es usar semillas para iniciar la propagación (Azcona, 2009). El éxito de estas técnicas se ha aplicado a varias especies del género *Mammillaria* (Rubluo *et al.*, 1993; Rubluo, 1997), entre ellas *M. coahuilensis* (Flores, 2007; López, 2009; Manzo, 2010).

En la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron reportes que señalen la micropropagación de cactáceas a partir de semillas de plantas regeneradas *in vitro*, por lo cual éste sería el primer trabajo relacionado con ello y demuestra que las plantas regeneradas por cultivo de tejidos presentan semillas viables que son capaces de germinar y además son fuente de explantes para generar nuevos brotes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de las cactáceas

Dentro de las plantas con flores (Magnoliophyta), la familia Cactaceae es de los grupos más diversificados. Está conformada por 100 o 150 géneros y aproximadamente por 1 800 especies en el continente americano (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Flores, 2013) en donde está distribuida desde Peace River en el norte de Canadá a 50° de latitud Norte, hasta la Patagonia en Argentina a 52° de latitud Sur y, desde el nivel del mar, en las dunas costeras, hasta 5100 metros de altitud en Perú (Figura 1) (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

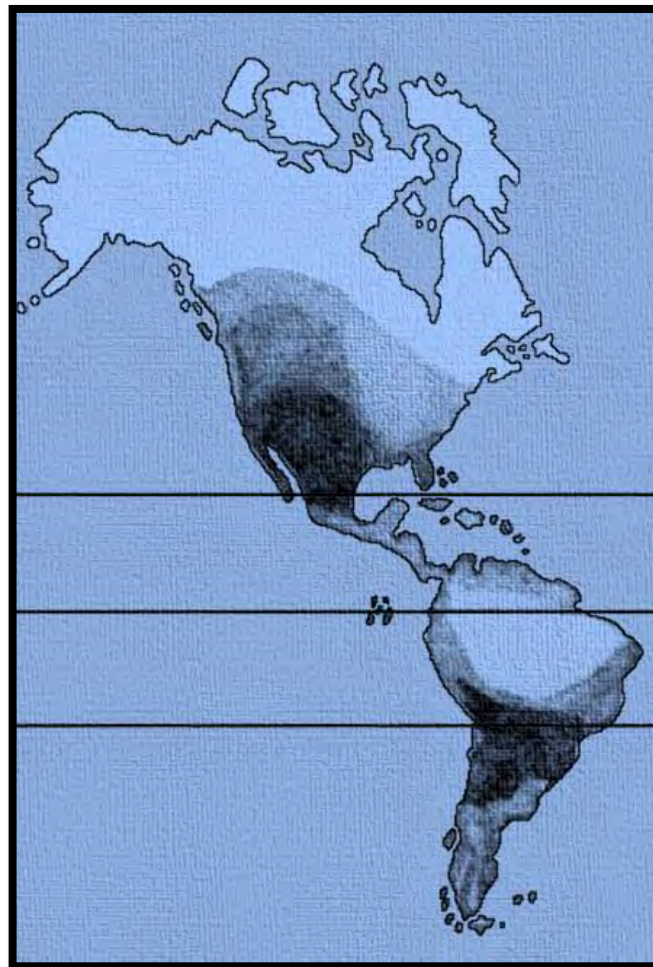


Figura 1. Distribución de la familia Cactaceae, las áreas más oscuras indican mayor concentración de la familia G. Olalde (Información personal).

Comprende cuatro subfamilias de plantas perennes:

- ✚ Pereskioideae, las plantas pertenecientes a este grupo pueden ser tanto arborescentes como arbustivas y trepadoras, tienen tallos cilíndricos con hojas y espinas. Dentro de esta subfamilia hay un solo género llamado *Pereskia* que se considera polifilético, además presenta la mayor serie de caracteres basales para los distintos linajes de la familia. Se encuentra en México, Las Antillas y América Central hasta el norte de Argentina (Arias y Flores, 2013).
- ✚ Maihuenioideae, son arbustos cespitosos con metabolismo C3, presentan tallos pequeños suculentos, de cilíndricos a globosos, las hojas son cilíndricas y pequeñas. Consta de un solo representante: *Maihuenia*. Su distribución está restringida a Argentina y Chile (Britton y Rose, 1963; Arias y Flores, 2013).
- ✚ Opuntioideae, los miembros de esta subfamilia pueden ser individuos arborescentes, arbustivos o cespitosos, con tallos cilíndricos o en cladodios, articulados, muy suculentos y tienen una característica especial que es la presencia de glóquidas. Algunos géneros son *Opuntia*, *Cylindropuntia*, *Grusonia*, *Nopalea*, entre otros. Se le puede encontrar distribuida por todo el continente americano (Britton y Rose, 1963; Arias y Flores, 2013).
- ✚ Cactoideae, plantas con gran variación en cuanto al hábito, ya que las hay arbustivas, arborescentes, cespitosas, trepadoras, epífitas, epilíticas, entre otras. Tienen tallos no segmentados, globosos a columnares, cilíndricos y con filocladios. Las hojas son vestigiales o ausentes. Se distribuye por todo el continente americano, sólo la especie *Rhipsalis baccifera* se encuentra en India, Madagascar y África. Esta subfamilia se ha adaptado a diferentes ambientes desde los desiertos hasta los bosques tropicales. Se ha dividido en nueve tribus las cuales se mencionan a continuación (Britton y Rose, 1963; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999; Arias y Flores, 2013):

- 🌵 **Cacteae** (géneros: *Mammillaria*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Lophophora*, entre otros)
- 🌵 **Pachycereeae** (*Pachycereus*, *Neobuxbaumia*, *Cephalocereus*, *Carnegiea*, *Escontria*, entre otros)
- 🌵 **Browningieae** (*Armatocereus*, *Browningia*, *Jasminocereus*, *Neoraimondia*, *Stetsonia*)
- 🌵 **Rhipsalideae** (*Rhipsalis*, *Hatiora*, entre otras)
- 🌵 **Notocacteeae** (*Austrocactus*, *Blossfeldia*, *Cintia*, *Copiapoa*, *Eriocyce*, *Eulychnia*, *Frailea*, *Neowerdermannia*, *Parodia*)
- 🌵 **Trichocereeeae** (*Echinopsis*, *Discocactus*, *Rebutia*, entre otros)
- 🌵 **Cereeae** (*Melocactus*, *Cereus*, *Cipocereus*, entre otros)
- 🌵 **Hylocereeae** (*Hylocereus*, *Epiphyllum*, *Selenicereus*, *Weberocereus*, entre otros) y
- 🌵 **Echinocereeeae** (*Echinocereus*, *Peniocereus*, entre otros)

2.2 Características generales y adaptaciones de las cactáceas

Las cactáceas son estructuralmente semejantes a las demás dicotiledóneas pero presentan hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializados que les dan una fisonomía particular, de estas características son responsables el medio árido y desértico en que la mayoría crece, posteriormente apareció la adaptación a la vida epífita o trepadora en las selvas tropicales húmedas. Las adaptaciones de estas plantas más importantes y notables son la capacidad de almacenar y conservar agua en los tejidos del tallo por el gran desarrollo del parénquima, responsables de la succulencia; también está la reducción de la superficie transpiratoria por la adquisición de formas globosas; la atrofia del limbo de la hoja hasta estados vestigiales o su transformación a escamas, espinas y glóquidas; engrosamiento de la cutícula; disminución y disposición hundida de los estomas; facilidad de absorción rápida de agua y gran longitud de algunas raíces (Bravo-Hollis, 1978).

La presencia de aréolas, el meristemo apical de la rama organizado en cuatro zonas distintivas y el ovario inmerso en el receptáculo, son tres características estructurales únicas de la familia Cactaceae (Arias y Flores, 2013).

Las aréolas son yemas laterales reconocidas como tallos extremadamente cortos, en éstas los internodos están distribuidos sobre la aréola y tiene simetría bilateral, este tejido es capaz de formar hojas reducidas, flores, tallos nuevos y también espinas, glóquidas, cerdas, pelos y raíces adventicias (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Flores, 2013).

El sistema de absorción de las raíces de las cactáceas tiene que adaptarse para captar agua con rapidez en la temporada de lluvias. Las raíces en ocasiones almacenan agua y sustancias nutritivas y adquieren diversas formas como la napiforme, presente en algunos *Ariocarpus*, en forma de tubérculo como en *Peniocereus*, tuberosa como en *Thelocactus*, tuberosa fasciculada en especies de *Echinocereus* o tuberosa claviforme. Las especies trepadoras o epífitas como *Selenicereus* o *Hylocereus* presentan raíces aéreas (Bravo-Hollis, 1978).

El tallo de estas plantas consta, como en las demás especies de dicotiledóneas, de hojas y yemas, pero experimenta diversas modificaciones: el tallo adquiere una gran reducción tanto en la longitud de los internodos como en la ramificación; las hojas, que en las demás dicotiledóneas constan de limbo, pecíolo y base, en las cactáceas, excepto en las especies foliadas, sufren cambios anatómicos considerables, pues la base se engrosa y crece transformándose en un podario o tubérculo, el pecíolo se atrofia y el limbo se reduce considerablemente (Bravo-Hollis, 1978). En Cactaceae los tallos tienen dos formas de crecimiento (forma exterior): arbustivo y arbóreo y éstos pueden tener ramificación acrótona, cuando las ramas aparecen cerca del ápice; dicótoma, cuando el meristemo apical se divide en dos; mesótoma si las ramas salen a la mitad del tallo y ocurre sucesivamente la ramificación hasta formar una copa y basítoma si las ramas surgen de la base. En la tribu Cactaeae se pueden identificar cuatro hábitos de crecimiento (figura geométrica de los individuos) las hay

globosas deprimidas (el incremento en el diámetro sobrepasa al incremento en la altura), globosas (crecimiento terminal lento y crecimiento lateral rápido; puede haber individuos solitarios o agrupados), cilíndricas (los tallos crecen más en altura que en diámetro) y columnares (los tallos alcanzan alturas de más de dos veces su diámetro) (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012).

Las hojas diferenciadas, se encuentran sólo en algunos géneros como *Pereskia* y *Pereskiaopsis*, pero en otras especies como con *Opuntia*, están reducidas a formas cónicas o cilíndricas, en otras el limbo se atrofia hasta sólo presentar vestigios y la base se hipertrofia en un podario prominente, aislado constituye el tubérculo y asociado con otros en hileras longitudinales integra las costillas; en Cactoideae las hojas se encuentran sólo como primordios microscópicos visibles en la etapa de plántula (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Flores, 2013).

Las espinas, que son de origen areolar (meristemático) y no caulinar (del tallo), son consideradas hojas modificadas, se forman a partir de los tejidos meristemáticos de las aréolas de la misma manera que las hojas; su crecimiento se debe a un meristemo que existe en su base, y el endurecimiento a un proceso de lignificación (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Flores, 2013).

En la flor de estas plantas se pueden apreciar el pericarpelo (región que cubre a los óvulos) y el tubo receptacular que son parte del receptáculo y el perianto que está integrado por series de tépalos externos (sepaloides) e internos (petaloides) insertados en la garganta del receptáculo, además de los verticilos florales, que constituyen el androceo y el gineceo. El eje floral de las cactáceas, por su organización de origen axial, es semejante a una rama, ya que presenta podarios, escamas y aréolas, que además de producir lana, espinas, entre otras estructuras, pueden desarrollar, en ocasiones, nuevos brotes (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Flores, 2013).

El fruto de las cactáceas es complejo, pues en su estructura intervienen no sólo el ovario propiamente dicho, sino también los órganos en que está incluido: el tejido medular del eje y el pericarpelo (Bravo-Hollis, 1978). Pueden ser carnosos (bayas), secos (cápsulas), conspicuos y de forma globosa a oblonga, pueden presentar escamas, aréolas, espinas y pelos. El embrión de la semilla es de curvo a casi recto, los cotiledones están reducidos y los tejidos nutritivos son el perispermo y el endospermo (Arias y Flores, 2013).

Este grupo de plantas se distribuye en diversos ambientes como las regiones tropicales y subtropicales como selvas altas perennifolias y selvas medianas o bajas caducifolias, también en regiones templadas o frías como los bosques de coníferas, también en bosque de *Quercus*, pastizales o bien en regiones que presentan nevadas durante el invierno como los bosques boreales de Canadá y las estepas patagónicas de Argentina, sin embargo la mayoría de estas especies (70%) se encuentran en regiones áridas y semiáridas como matorral xerófilo (Arias-Montes, 1997; Scheinvar, 2004).

2.3 Usos e importancia de las cactáceas

Desde la época de los mexicas y muy probablemente antes, las cactáceas han sido vistas como un recurso medicinal y alimenticio muy importante, también eran utilizadas en la economía doméstica, prácticas religiosas y políticas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Cuando ocurrió el descubrimiento de América las cactáceas fueron conocidas en Europa y causaron gran asombro y admiración por lo exótico y peculiar de su aspecto y pronto se ocuparon de ellas botánicos, médicos y horticultores (Bravo-Hollis, 1978). En la actualidad siguen conservando esa importancia además de ser plantas ornamentales. En el cuadro 1 se resumen algunos de los usos de las cactáceas.

Cuadro 1. Usos de algunos géneros de cactáceas (Bravo-Hollis, 1978; Casas, 2002; Alanís y Velazco, 2008).

Especie	Uso
<i>Cephalocereus senilis</i>	Ornamental
<i>Escontria chiotilla</i>	Flores, frutos, semillas y tallos comestibles
<i>Astrophytum</i> sp.	Ornamental
<i>Myrtillocactus geometrizzans</i>	Frutos comestibles, forraje, bebidas alcohólicas
<i>Mammillaria</i> sp.	Tallos, flores y frutos (chilitos de biznaga) comestibles, ornamental
<i>Pachycereus</i> sp.	Frutos y semillas comestibles, cercas vivas
<i>Pachycereus pecten- aboriginum</i>	Confección de peines (por ello el nombre de la especie)
<i>Echinocactus</i> sp.	Ornamental, alimenticio, elaboración de confituras
<i>Ferocactus</i> sp.	Ornamental, alimenticio, elaboración de confituras, botones florales comestibles (cabuches)
<i>Lophophora</i> sp.	Uso religioso
<i>Hylocereus</i> sp.	Frutos comestibles (pitahaya)
<i>Cylindropuntia</i> sp.	Combustible, construcción
<i>Nopalea</i> sp.	Tallos y flores comestibles
<i>Opuntia</i> sp.	Tallos y frutos comestibles, forraje, pigmentos, cercas vivas, abono verde
<i>Echinocereus</i> sp.	Frutos comestibles (pitayitas)
<i>Neoubuxbaumia tetetxo</i>	Frutos comestibles (higos de teteche)
<i>Stenocereus</i> sp.	Frutos comestibles (pitaya)
<i>Pereskiaopsis</i> sp.	Espinas usadas como agujas

2.4 Problemática de las cactáceas

México cuenta con alrededor de 83 géneros y 913 taxones entre especies (669) y subespecies (244) (Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2007), es el centro de diversificación de cactáceas más importante, con un elevado índice de endemismos (40% de endemismo de géneros y 78% de endemismos de especies) (González-Gutiérrez, 2013), pero también es el país con más especies amenazadas, la cifra llega a 276 (Hernández y Godínez, 1994).

Esta familia está en grave riesgo debido a su valor ornamental, ya que sus formas de crecimiento (columnares, globosas, entre otros), además de otras características como sus espinas, el color de sus flores, entre otras, hacen que los coleccionistas se interesen por ellas, pero también personas que las extraen de su medio natural para comercializarlas de manera ilegal, otro factor a considerar es la pérdida de su hábitat debido al cambio de uso de suelo para fines agrícolas y/o pecuarios y el desarrollo humano (Hernández y Godínez, 1994). La NOM-059-SEMARNAT-2010 enlista 276 especies que pertenecen a 42 géneros, de éstas 108 pertenecen al género *Mammillaria* (González-Gutiérrez, 2013), por lo cual resultan necesarios más estudios que se dediquen a la conservación de dichas especies. Debido a las razones anteriores la familia completa está en el Apéndice II de la Convención sobre el Tráfico Internacional de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (CITES) y muchos de los representantes están incluidos en el Apéndice I, además 75 especies se encuentran en el listado de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) (Hernández y Godínez, 1994; González-Gutiérrez, 2013).

2.5 Género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* fue nombrado por Haworth en 1812, este nombre se deriva de los pequeños tubérculos que asemejan a mamilas (Rubluo, 1997). Tiene el mayor número de especies dentro de la familia Cactaceae, Hunt (1992) acepta 392 especies, de las cuales 373 son de México. Se trata de un grupo polifilético que se distribuye desde Venezuela y Colombia hasta el suroeste de los Estados Unidos de

América, siendo México el lugar de máxima diversificación y riqueza de especies (Butterworth y Wallace, 2004).

Estas plantas presentan aréolas dimórficas, las que generan espinas (vegetativa), y las aréolas florales en la axila de los tubérculos (floral) (Bravo-Hollis, 1978). Las espinas pueden ser centrales o radiales, variables en número, forma, tamaño y color. Las flores son pequeñas (10-25 mm de longitud y 15-50 mm de diámetro), pero conspicuas; el color puede ser desde un rojo brillante, anaranjado, rosa, púrpura o amarillo; campanuladas o tubulares, solitarias o en grupos de dos o tres, pero comúnmente forman una corona cerca del ápice del tallo. Las especies de *Mammillaria* pueden ser pequeñas plantas solitarias (5-24 cm de longitud) (*M. coahuilensis*, *Mammillaria san-angelensis*, *M. spinosissima*) o tener crecimiento cespitoso (*M. carmenae*, *M. humboldtii*, *M. plumosa*) formando grupos, que pueden medir un metro de diámetro. Los frutos generalmente son de color rojo, pueden contener un gran número de pequeñas semillas (10-150), éstas pueden medir de 1-2 mm y son de color negro o café (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Rubluc, 1997).

Se tiene reportado para el género 392 especies, de las cuales 108 (27.55%) están en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) como en peligro de extinción, amenazadas o sujetas a protección especial, por lo que el grupo es considerado como severamente amenazado, esto se debe a que las plantas tienen un alto valor ornamental, al aumento del disturbio ecológico y a la perturbación de su hábitat, por esto es necesario recurrir a medidas para la conservación de estas plantas y del resto de las cactáceas (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007) como la propagación por cultivo de tejidos, que muchos autores han utilizado como alternativa para preservar cactáceas amenazadas (Clayton *et al.*, 1990; Rubluc, 1997; Flores, 2007; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007; González, 2008; López *et al.*, 2009; Gracidas-Díaz *et al.*, 2010). Se han reportado más de 30 especies de este género propagadas *in vitro*, por lo que muchas de ellas todavía necesitan la aplicación de estos métodos para su conservación (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007).

2.6 *Mammillaria coahuilensis*

Mammillaria coahuilensis (Figuras 2 y 3), cuya clasificación taxonómica se presenta en el cuadro 2, es endémica de México, tiene una distribución extremadamente restringida y sólo se encuentra en el estado de Coahuila. La localidad tipo es San Pedro, cerca de la Laguna de Viesca (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Hernández y Godínez, 1994; Guzmán *et al.*, 2007). Según la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010) la especie se encuentra amenazada de extinción, la razón más probable de que la especie se encuentre en esta categoría es por las características de su distribución, por estas razones es necesario que se implementen medidas orientadas a su conservación, como la propagación *in vitro*.

Es una planta de tallo simple que puede medir unos 4 cm de diámetro, una parte de éste permanece debajo de la tierra, es decir, es subterráneo y su ápice es aplanado. Los tubérculos se disponen en 8 y 13 series espiraladas, presentan jugo lechoso, son prominentes, pueden medir 12 mm de longitud y son de sección triangular. Las aréolas son elípticas, al principio lanosas y después desnudas. Tiene 16 espinas radiales de 6 mm de longitud, las de la parte superior de la aréola más cortas y delgadas, son algo suaves, de color blanco grisáceo, extendidas horizontalmente, radiantes en forma de estrella. Presenta una espina central de 6 mm de longitud, recta acicular, de color castaño y ligeramente pubescente. Las flores son del tipo campanulado-infundibuliformes, de 3 cm de diámetro, los segmentos exteriores del perianto son de color rosa claro, con la línea media de color café, los interiores son casi blancos, con la línea media de color rosa, lanceolados y agudos, el estilo es rosado y presenta 5 lóbulos del estigma de color verdoso. El fruto es claviforme y las semillas foveoladas de color café algo rojizo de 1 mm de diámetro y tiene hilo basal pequeño (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).



Figura 2. *Mammillaria coahuilensis*. Tomado de <http://www.bicentenario.gob.mx>



Figura 3. *Mammillaria coahuilensis* en su hábitat Salvador Arias Montes.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Mammillaria coahuilensis* (Cronquist, 1981; Barthlott y Hunt, 1993).

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
SUBDIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
GÉNERO	<i>Mammillaria</i>
ESPECIE	<i>Mammillaria coahuilensis</i> (Boed.) Moran

2.7 Métodos de propagación en cactáceas

Las cactáceas se pueden propagar mediante diversos métodos. A partir de semillas (propagación sexual), el proceso puede comenzar desde polinizar manualmente las flores, hasta obtener los frutos y las semillas para su posterior germinación. Existe la propagación por vástagos o hijuelos (brotes que surgen alrededor de la planta madre), por esquejes que consiste en cortar ramas o tallos de cactus para después inducir su enraizamiento y por injertos donde se unen porciones de plantas distintas, sin embargo, muchas especies producen muy pocos brotes laterales, pocas semillas o incluso presentan bajos porcentajes de germinación, por lo que la propagación por semillas o vástagos resultan poco efectivas (Arredondo, 2002; González, 2008). Debido a lo anterior se requiere aplicar otro tipo de métodos para la propagación y almacenamiento como el cultivo *in vitro*, ya que éste es una herramienta muy poderosa para la conservación *ex situ* de diferentes especies como las que se encuentran en peligro de extinción.

2.8 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El Cultivo de Tejidos Vegetales (cultivo *in vitro* o propagación *in vitro*) es una herramienta biotecnológica que reúne un conjunto de técnicas que tienen como objetivo el crecimiento de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre en un medio artificial y en condiciones ambientales y asépticas controladas. Incluye las técnicas y métodos utilizados en la investigación botánica (George *et al.*, 2008). Se basa en el principio de totipotencialidad que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva y Pérez, 2005). Se utiliza un fragmento de tejido, llamado explante, que puede ser un protoplasto, una célula, tejido, embrión u órgano vegetal (Mroginski y Roca, 1991). Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido adaptadas para su utilización en un amplio rango de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Iriando, 2001).

Las aplicaciones del CTV son diversas (Mroginski y Roca, 1991; Thorpe, 2007):

- ✚ Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y otras ciencias
- ✚ Bioconversión y producción de compuestos útiles
- ✚ Incremento de la variabilidad genética
- ✚ Obtención de plantas libres de patógenos
- ✚ Propagación de plantas
- ✚ Propagación clonal
- ✚ Conservación e intercambio de germoplasma
- ✚ Obtención de embriones somáticos
- ✚ Polinización y fertilización *in vitro*
- ✚ Modificación y mejoramiento vegetal

2.9 Etapas de la micropropagación

La micropropagación se define como la multiplicación masiva *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991). Ésta, a través del cultivo de tejidos vegetales, se realiza mediante una secuencia de cinco etapas que abarcan el ciclo completo de la multiplicación de las plantas (Castillo, 2004).

Etapa 0. Selección de la planta madre

En esta etapa se selecciona el material vegetal que será donador, estas plantas deberán ser sanas y estar en buenas condiciones, se recomienda que este material pase una temporada en invernadero bajo condiciones controladas para garantizar condiciones sanitarias óptimas (Castillo, 2004; López *et al.*, 2009). Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: 1) El tipo de órgano que sirve como explante 2) la edad ontogénica y fisiológica del mismo, 3) la estación en la cual se colecta el material, 4) el tamaño, ya que se requiere un tamaño mínimo para realizar los explantes necesarios y 5) el estado sanitario de la planta donante, es importante que no presente plagas ni enfermedades que después pueda transmitir a los nuevos individuos (Olmos *et al.*, 2004).

Etapas 1: Establecimiento de los cultivos

Esta etapa es la iniciación de los explantes (Bunn *et al.*, 2011) y se desarrollan técnicas de desinfección para lograr su establecimiento en condiciones asépticas (López *et al.*, 2009). El éxito está determinado por la edad de la planta donante, el desarrollo fisiológico y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la desinfección de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o plántulas germinadas *in vitro* (Olmos *et al.*, 2004).

Rubluo (1997) recomienda el uso de plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explante. Para facilitar la germinación de la semilla, se le puede dar un tratamiento de escarificación, es decir ablandar la cubierta seminal por medios mecánicos como fracturar la testa o sumergir las semillas en ácido sulfúrico, ya que en condiciones naturales este proceso de desgaste de la cubierta se da por la acción de la descomposición, digestión parcial del tracto alimenticio de algún animal o de cambios en la estructura coloidal de las paredes celulares causada por el humedecimiento y la desecación repetidos, por la ruptura mecánica de las células por congelación y deshielo o por cualquier combinación de estos factores. (Cronquist, 1986).

Cuando se requiere conservar la diversidad genética de una población, el material de propagación adecuado son las semillas, ya que si se usa un fragmento de tejido de la planta, los brotes que se obtengan serán clones (Mauseth, 1977; Iriondo, 2001). Si el porcentaje de germinación es bajo con métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ayudar a mejorarlo, además cuando la disponibilidad de semillas es escasa, situación común en muchas especies amenazadas, a la germinación *in vitro* le sigue una etapa de multiplicación con el objetivo de producir un mayor número de plantas (Iriondo, 2001).

En cactáceas generalmente se utiliza el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) (Anexo 1) que contiene una formulación básica con un contenido elevado de sales y una elevada concentración de nitrógeno, que sirve de fuente de nutrimentos a gran variedad de plantas como orquídeas, nolináceas, agaváceas, entre otras, los 19 nutrimentos esenciales para la mayoría de plantas se encuentran en este medio de cultivo, tanto los micronutrimentos como los macronutrimentos (Pedroza-Manrique y Caballero, 2009).

Etapa 2: Multiplicación del tejido

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa (enraizamiento, bulbificación, entre otros), en esta parte, los medios de cultivo, las hormonas vegetales y/o reguladores de crecimiento vegetal como auxinas y citocininas y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Olmos *et al.*, 2004). Las hormonas vegetales son moléculas de activación presentes en un tejido dado que a ciertas concentraciones, pueden controlar diversas actividades involucradas con el crecimiento y desarrollo vegetal (Flores, 2007). Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos sintéticos que actúan como hormonas vegetales, las auxinas, citocininas y su combinación son consideradas las más importantes para la regulación del crecimiento y las respuestas morfogénicas de las plantas en el cultivo de tejidos vegetales (Gaspar *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha reportado que para algunas especies de cactáceas son suficientes las citocininas como BA o 2iP para promover la formación de brotes como en *M. haageana* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), *M. candida* (Pérez et al., 1998) y *M. coahuilensis* (Flores, 2007), entre otras.

Las citocininas participan en la síntesis de proteínas y en el control del ciclo celular, además promueven la expansión foliar, desarrollo de ramas laterales, retardan la senescencia de hojas, promueven la síntesis de clorofila y mejora el desarrollo del cloroplasto; en cultivo de tejidos vegetales es usado para estimular la división celular

y el control de la morfogénesis ya que al superar la dominancia apical se producen brotes laterales y adventicios. Existen citocininas naturales (hormonas vegetales) como N⁶-2, Isopentenil adenina (2iP), *trans*-zeatina, dihidro-zeatina, ribósido de zeatina, entre otros, y sintéticas (reguladores de crecimiento vegetal) como N⁶-benziladenina (BA) o bencilaminopurina (BAP), kinetina y ortho-topolina, entre otros (Gaspar *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008).

Las vías de regeneración son la organogénesis y la embriogénesis somática, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo, que está compuesto de células que proliferan continua y aceleradamente y tienen una apariencia desorganizada y dan origen a una masa amorfa (Hurtado y Merino, 1997).

La organogénesis es un evento morfogenético, se forma un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno (Jiménez, 1998), puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias; la primera comprende la multiplicación de yemas preformadas sin formación de callo, la segunda implica la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del brote, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis. La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares (aréolas) por explante limita la cantidad de brotes cuando se trata de organogénesis directa (Olmos *et al.*, 2004).

Por otra parte, los embriones somáticos se inician a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos, son estructuras bipolares que tienen radícula, hipocótilo y cotiledones, la principal ventaja que tiene la embriogénesis somática sobre la organogénesis es que no se requiere una etapa de enraizamiento. La primera observación de estas estructuras fue hecha en *Daucus carota* (zanahoria) por Steward y Reinert en 1958 y desde esa fecha se ha visto el potencial de la

embriogénesis en muchas especies (von Arnold *et al.*, 2002) como en el cacao (*Theobroma cacao*) (Urrea *et al.*, 2011), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y *Astrophytum asterias* (Lema-Rumińska y Kulus, 2012), entre otros.

Etapa 3: Individualización y enraizamiento

Los brotes regenerados en la fase anterior se individualizan y subcultivan para promover su elongación, se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas, pero se ha reportado que algunas especies no necesitan pasar por esta etapa ya que emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren de forma simultánea, después del enraizamiento las plantas ya están listas y pueden transferirse a sustrato (Castillo, 2004; López *et al.*, 2009).

Etapa 4: Aclimatización

La transferencia y aclimatización a un ambiente *ex vitro* es el paso final, pero frecuentemente el más difícil en un sistema de micropropagación satisfactorio. La aclimatización es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su ambiente ya que pasa de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, éste en condiciones de laboratorio (Flores, 2007). En esta etapa los tallos enraizados se transfieren a un sustrato previamente esterilizado para que continúen con el proceso de aclimatización o lo inicien, pero ya en condiciones *ex vitro* en un invernadero (López *et al.*, 2009).

2.10 Problemas en cultivo *in vitro*

Oxidación

La oxidación y oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos caracterizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son compuestos químicos muy reactivos

que generan daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009).

Hiperhidratación

El término hiperhidratación se usa para describir a tejidos y órganos cultivados *in vitro* que adquieren una apariencia morfológica y función fisiológica anormal, éstos presentan un aspecto translúcido, húmedo y vítreo (Debergh *et al.*, 1992). Entre las principales causas de la hiperhidratación están el bajo potencial osmótico, la presencia de reguladores de crecimiento como citocininas y la concentración baja de agar en el medio de cultivo; así conforme el potencial osmótico es más negativo y se cambia el potencial matricial del medio, la hiperhidratación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua (Cárdenas y Villegas, 2002).

Contaminación

El medio de cultivo en el cual las plantas son cultivadas es una fuente de nutrimentos para el crecimiento microbiano, que compiten negativamente por éstos con los tejidos cultivados *in vitro*, la presencia de microorganismos da por resultado mortalidad del material vegetal; además, la presencia de infecciones latentes también puede provocar variaciones en el crecimiento, necrosis en los tejidos, reducción en la proliferación de los brotes y bajas tasas de enraizamiento (Odutayo *et al.*, 2007).

Variación somaclonal

Muchas plantas cultivadas *in vitro* presentan diferencias fenotípicas o bioquímicas en comparación con el fenotipo de las plantas donadoras de los explantes, hay dos causas para esto, una es la variación epigenética transitoria, debida probablemente al estrés generado por las condiciones propias del cultivo de tejidos y células *in vitro* y las variaciones genéticas verdaderas producto de mutaciones azarosas; cualquiera que sea se trata de variación somaclonal, esta última es de origen genético y se transmite y expresa en la descendencia de las plantas regeneradas (Patiño, 2010).

2.11 Cultivo de Tejidos Vegetales en *Mammillaria*

Minocha y Mehra en 1974 reportaron el primer trabajo de cultivo *in vitro* para este género de cactáceas, usando plántulas, brotes vegetativos y órganos florales de *Neomammillaria prolifera*, de los cuales obtuvieron callo en presencia de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina y endospermo líquido de coco. Sin embargo ha habido reportes sobre el cultivo *in vitro* del género *Mammillaria* en los cuales se obtuvo organogénesis, por ejemplo Kolár *et al.* (1976), obtuvo callo de *M. woodsii* y regeneración de brotes en medio MS con AIA y kinetina. Vyskot y Jara en 1984 obtuvieron la regeneración de brotes usando secciones de tallo para *M. carmenae* y *M. prolifera* en medio MS adicionado con BAP y ANA.

Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) micropropagaron *Mammillaria san-angelensis*, pero debido a la escases de material (15 semillas) hicieron estudios preliminares con *M. haageana*. Los explantes se sembraron en medio MS adicionado con BA, kinetina y 2,4-D. El mejor medio para la regeneración contenía únicamente BA (1 o 2 mgL⁻¹), la regeneración fue pobre obteniendo brotes en 9 de 18 explantes laterales con 1 mgL⁻¹ de BA y en 3 de 18 explantes laterales con 2 mgL⁻¹ de BA. Los explantes de *M. san-angelensis* fueron sembrados en medio MS con BA y ANA y en el tratamiento con BA/ANA 1/0.01 mgL⁻¹, se obtuvo de 21 a 35 brotes por explante lateral.

Se obtuvo también la propagación *in vitro* de *M. candida*, *M. craigii*, *M. formosa*, *M. obscura*, *M. sphacelata* y *M. uncinata* (Pérez *et al.*, 1998), se usaron plántulas germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS más BAP y ANA. Ramirez-Malagón *et al.* (2007) propagaron 10 especies del género *Mammillaria* (*M. bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. pectinifera*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, y *M. zephyranthoides*) usando medio MS y 20 combinaciones de AIA y kinetina. Gracidas-Díaz *et al.* (2010) propagaron *M. luethyi* usando como fuente de explantes secciones de tallo de plantas adultas que fueron sembrados en medio MS adicionado con BAP y ANA.

En la actualidad por lo menos a 30 especies de este género se les han aplicado estas técnicas, pero aún son muchas las especies que se encuentran en la NOM que pueden ser propagadas por esta vía de regeneración como medida de conservación.

En el cuadro 3 se resume la información que se reunió hasta el momento sobre las especies amenazadas que se han micropropagado. Con esto se demuestra la importancia que tiene el cultivo de tejidos vegetales para la producción de plantas de importancia ornamental y además la propagación de especies que se encuentran en el peligro de extinción, ya que sin estas técnicas la propagación convencional sería insuficiente (Mauseth, 1977; Flores, 2007).

Es importante señalar que para *Mammillaria coahuilensis* ya hay reportes sobre su cultivo *in vitro* (Manzo, 2010), logrando la propagación exitosamente obteniendo plantas sanas, algunas de las cuales formaron flores, frutos y semillas (Flores, 2007; López, 2009), por lo que uno de los propósitos de este trabajo fue demostrar que las plantas cultivadas *in vitro* son capaces de generar semillas viables, que incluso pueden utilizarse para la regeneración *in vitro*, ya que no se encontraron reportes en donde se realice la micropropagación de alguna especie usando semillas de este tipo de plantas.

2.12 Cultivo de Tejidos Vegetales en *Mammillaria coahuilensis*

El primer estudio sobre la micropropagación de *Mammillaria coahuilensis* lo reportó Flores (2007) quién utilizó semillas de plantas silvestres para promover la germinación *in vitro*, éstas fueron sembradas en tres tipos de medio: agua con agar, MS 50% y MS 50% + CA 1.5 gL⁻¹, se obtuvo la mejor respuesta en el primero ya que alcanzó el 60% de germinación con semillas de 4 años de almacenamiento y el 100% en semillas de seis meses de almacenamiento. Las plántulas fueron utilizadas como fuente de explantes apicales y laterales y se sembraron en medio MS + BA (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) obteniendo el mayor número de brotes (21.25) en BA 1 mgL⁻¹ mediante organogénesis directa e indirecta. Los brotes obtenidos fueron enraizados

en medio MS + CA 1.5 gL^{-1} y posteriormente se aclimatizaron, se obtuvo el 52.7% de sobrevivencia, además 9 brotes que no formaron raíz fueron injertados en plantas de *Myrtillocactus geometrizans* obteniendo el 100% de sobrevivencia.

López (2009) reportó el segundo trabajo sobre el cultivo *in vitro* de *M. coahuilensis*. El objetivo principal de la investigación fue determinar el origen y describir el desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* mediante métodos histológicos ya que muchos trabajos reportan el desarrollo de brotes pero no especifican si se regeneraron del meristemo floral o vegetativo. El estudio se inició con la germinación de semillas de plantas silvestres siguiendo el método reportado por Flores (2007), las cuales se almacenaron durante 16, 21, 23 y 24 meses obteniendo mejor porcentaje de germinación (100%) en semillas de 16 meses que en las de 24 (50%), comprobando que la viabilidad de las semillas disminuye respecto al tiempo de almacenamiento. Para promover la elongación de las plántulas, éstas se subcultivaron a medio líquido por un mes tal como reporta Tapia (2006), alcanzaron un promedio de 8 mm de longitud y las que permanecieron en medio sólido 4 mm. Posteriormente las plántulas fueron sembradas en medio MS + BA 0.5 mgL^{-1} y los brotes producidos fueron cosechados a los 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días y fijados para su procesamiento en Microscopio Electrónico de Barrido y se observó el desarrollo de los brotes a partir de meristemo vegetativo y floral.

Manzo en 2010 reportó la micropropagación de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*, utilizó semillas, las cuales germinaron en medio MS y alcanzaron del 25 al 26%. Las plántulas obtenidas se utilizaron como fuente de explante y fueron sembradas en medio MS + 2iP o TDZ (tidiazurón) y MS + ANA/2iP o MS + ANA/TDZ, los mejores resultados se obtuvieron en MS + 2iP 2 mgL^{-1} con 9 brotes por tratamiento. Las plantas regeneradas se aclimatizaron y se reportó el 92.3% de sobrevivencia.

Cuadro 3. Propagación *in vitro* de especies listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 del género *Mammillaria*.

Especie	Explante	Mejor tratamiento (mgL ⁻¹)	Respuesta	NOM	Autor
<i>M. haageana</i>	PI	MS + BA (1 y 2)	OD	P	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989
<i>M. albilanata</i> <i>M. nana</i> <i>M. parkinsonii</i> <i>M. solisioides</i> <i>M. theresae</i>	Yemas laterales	No especificado	M	Pr Pr Pr A P	Fay y Gratton, 1992
<i>M. huitzilopochtli</i>	Secciones de tallo	MS + BA (0.1 y 1)	OD	Pr	Rubluo <i>et al.</i> , 1993
<i>M. candida</i>	PI	MS + BA (1)	OD	A	Pérez <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bocasana</i> <i>M. carmenae</i>	Meristemos de plantas adultas	MS + BA (10), K (1)	OI	Pr P	Anicua y Rivas, 2000
<i>M. albicoma</i>	Botones florales	MS + BA/ANA (5/0.1)	OD, OI	Pr	Wyka <i>et al.</i> , 2006
<i>M. crucigera</i>	PI	MS + (BA/ANA)	OD	Pr	Olguín-Santos <i>et al.</i> , 2006
<i>M. schiedeana</i>	PI y brotes <i>in vitro</i>	MS + BA/ANA (1/0.1)	OD	A	Soria, 2006
<i>M. carmenae</i> <i>M. carmenae</i> fo. <i>rubrisprina</i> <i>M. herrerae</i> <i>M. theresae</i>	PI	MS + BA, 2iP	OD	P P P P	Retes-Pruneda, 2007
<i>M. coahuilensis</i>	PI	MS + BA (1)	OD, OI	A	Flores, 2007

PI=Plántulas *in vitro*; OD= Organogénesis Directa; OI= Organogénesis Indirecta; M= Micropropagación; P= Peligro de extinción; A= Amenazada; Pr= sujetas a protección especial; MS = Medio Murashige y Skoog; BA = N⁶-Benciladenina; ANA = Ácido α naftalenacético; 2iP = N⁶-2, Isopentenil adenina; K = Kinetina; AIA = Ácido Indol-3-acético; Z = Zeatina

Cuadro 3 (Continuación)

Especie	Explante	Mejor tratamiento (mgL ⁻¹)	Respuesta	NOM	Autor
<i>M. gaumeri</i>	Secciones de plantas	MS + Z 2	OI	P	Azcorra <i>et al.</i> , 2007
<i>M. hahniana</i> <i>M. orcuttii</i> <i>M. rhodantha</i> <i>M. bocasana</i> <i>M. pectinifera</i> <i>M. zephyranthoides</i>	Secciones de plantas adultas	MS + K/AIA (1/10), (2/10)	OD, OI	A Pr Pr A A	Ramirez-Malagón <i>et al.</i> , 2007
<i>M. coahuilensis</i>	PI	MS + BA (0.5)	OD	A	López, 2009
<i>M. mathildae</i>	PI	MS basal	OD	P	García y Malda, 2009
<i>M. coahuilensis</i>	PI	MS + 2iP (2)	OI	A	Manzo, 2010
<i>M. bombycina</i>	PI	MS + BA/ANA (1/0.1)	OD, OI	Pr	Yáñez, 2011
<i>M. hernandezii</i>	PI	MS + BA/ANA (3/0.5)	OD, OI	Pr	Pérez <i>et al.</i> , 2013
<i>M. longiflora</i> <i>M. napina</i> <i>M. sanchez-mejoradae</i>	PI Plantas adultas Tubérculos de un brote <i>in vitro</i>	MS + BA/ANA (3/0.5)	OD, OI	A A P	Hernández <i>et al.</i> , 2013

PI=Plántulas *in vitro*; OD= Organogénesis Directa; OI= Organogénesis Indirecta; M= Micropropagación; P= Peligro de extinción; A= Amenazada; Pr= sujetas a protección especial; MS = Medio Murashige y Skoog; BA = N⁶-Benciladenina; ANA = Acido α naftalenacético; 2iP = N⁶-2, Isopentenil adenina; K = Kinetina; AIA = Ácido Indol-3-acético; Z = Zeatina

3. JUSTIFICACIÓN

No existen reportes sobre la viabilidad de las semillas de cactáceas propagadas por cultivo de tejidos vegetales, así como de la capacidad regenerativa de las plántulas empleadas como fuente de explantes. Por lo anterior, en esta investigación se utilizaron semillas de brotes regenerados *in vitro* y establecidos en condiciones de invernadero de *Mammillaria coahuilensis*, se evaluó la viabilidad de las semillas y se promovió su micropropagación para conocer su potencial regenerativo.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las semillas de *Mammillaria coahuilensis* provenientes de plantas propagadas *in vitro* son viables y pueden ser fuente de explantes para la micropropagación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer y evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *M. coahuilensis* provenientes de plantas propagadas *in vitro*.
2. Promover la formación de brotes adventicios de *M. coahuilensis* empleando las citocininas N⁶-2, Isopentenil adenina y N⁶-Benciladenina.
3. Realizar ensayos de aclimatización *ex vitro* de los brotes y plantas regeneradas.
4. Comparar los resultados obtenidos con reportes previos de la propagación *in vitro* de *M. coahuilensis*.

5. MÉTODO

5.1 Selección de la planta madre

Se usaron 65 semillas obtenidas de brotes injertados de *Mammillaria coahuilensis* regenerados *in vitro* que fueron mantenidos en condiciones de invernadero por 4 años y las flores de éstos fueron polinizadas artificialmente en el mes de marzo de 2011.

Los frutos fueron colectados el 19 de agosto de 2011 y se almacenaron en bolsas de papel encerado a temperatura ambiente (18-20° C) durante 9 meses.

5.2 Establecimiento de los cultivos asépticos

Las 65 semillas se desinfectaron en 50 mL de agua destilada adicionada con 3 gotas de detergente líquido Salvo® durante 20 min. Posteriormente se transfirieron a alcohol al 70% (v/v) durante un minuto, seguido de una solución de cloro comercial al 30% (v/v) (6% de cloro activo) adicionado con tres gotas de Tween 80 por 30 minutos, todo el proceso se realizó en agitación continua; finalmente en la campana de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada (Modificado de Flores, 2007). Se sembraron 65 semillas distribuyéndolas cinco por frasco (13), cada uno de estos con 30 mL de medio de cultivo MS (Anexo 1) a un pH 5.7-5.8 y 8 gL⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon®, el medio se esterilizó durante 18 minutos en autoclave a 1.5 Kg cm⁻².

Los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 2°C, fotoperiodo 16/8 h y 44.12 µmol m⁻²s⁻¹ de intensidad luminosa. Se evaluó diariamente el porcentaje de germinación durante 60 días. La semilla se consideró germinada cuando emergió la radícula.

5.3 Elongación de plántulas (medio líquido)

Debido a que algunas plántulas germinadas no alcanzaron la talla deseada para permitir la obtención de los explantes, es decir mayor a 5 mm, 44 se transfirieron a

medio líquido MS + 1.5 CA gL⁻¹ con puentes de papel filtro (López, 2009; Díaz, 2007), con el fin de promover su elongación. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para la germinación de las semillas. Las plántulas permanecieron 25 días en medio líquido y después fueron nuevamente transferidas a medio sólido MS + CA 1.5 gL⁻¹ por 20 días antes de ser seccionadas para la obtención de explantes.

5.4 Siembra de explantes e inducción de brotes

Las plántulas que medían entre 0.5 a 1.6 cm, fueron seccionadas para obtener dos tipos de explantes, uno apical y dos laterales eliminándoles la raíz (Figura 4). Debido a que en los tratamientos reportados por Flores (2007) y Manzo (2010), el tratamiento control dio como resultado un escaso (promedio: 1 a 1.75 brotes por explante) o nulo número de brotes respectivamente, en la presente investigación esta prueba no fue realizada. Se sembraron dos explantes de cada tipo por frasco con 30 mL de medio MS adicionado con BA (0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) y MS adicionado con 2iP (0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) (6 tratamientos); sacarosa 30 g L⁻¹, pH 5.7-5.8 y 8 gL⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon®, que fueron los mismos tratamientos reportados por Flores (2007) y López (2009) para *Mammillaria coahuilensis*. Se utilizaron 12 explantes laterales y 6 apicales por tratamiento. Los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones ambientales utilizadas en la germinación y se evaluaron semanalmente para observar las respuestas morfogénicas.

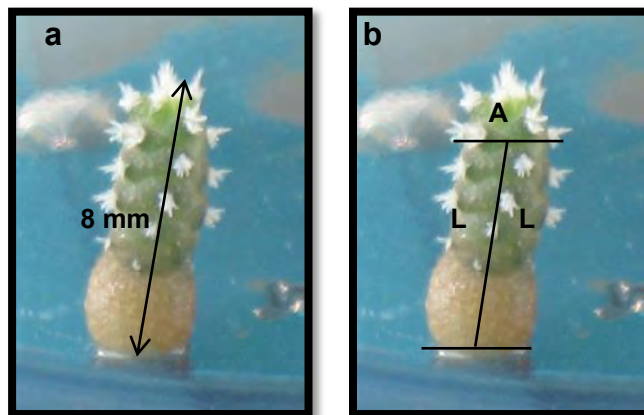


Figura 4. Obtención de explantes a) plántula, b) explante apical (A) y laterales (L).

5.5 Elongación y enraizamiento

Después de pasar 10 semanas en el medio de inducción, los brotes obtenidos fueron transferidos a medio basal MS + 1.5 CA gL⁻¹ para promover la formación de raíces, algunos se individualizaron y otros permanecieron unidos al explante inicial.

5.6 Aclimatización

Se realizó un ensayo preliminar de aclimatización con 97 plantas mayores a 1.5 cm. Las plantas obtenidas fueron aclimatizadas *ex vitro*, las raíces de fueron lavadas con suficiente agua destilada para eliminar los restos de agar, posteriormente se les aplicó enraizador comercial Radix 1500® para promover la formación de un mayor número de raíces y se colocaron en un sustrato compuesto de tierra negra y piedra pómez (1:1) previamente esterilizado e hidratado. El sustrato fue colocado en charolas cubiertas por domos plásticos para evitar la deshidratación. Las plantas se transfirieron a las charolas y éstas se mantuvieron en las condiciones de incubación mencionadas anteriormente y después de 5 meses se trasladaron a condiciones de invernadero y se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

Los brotes que no formaron raíz fueron injertados en plantas jóvenes de *Myrtillocactus geometrizans* como lo reporta Flores (2007) y se mantuvieron en condiciones de invernadero. En la figura 5 se muestra un diagrama de flujo de la metodología para la propagación de *M. coahuilensis*.

5.7 Análisis estadístico:

Se obtuvieron los promedios del número de brotes obtenidos por tratamiento. A los resultados se les realizó una prueba de ANOVA y los resultados con diferencias significativas a una prueba de Tukey. Se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0 (2011).

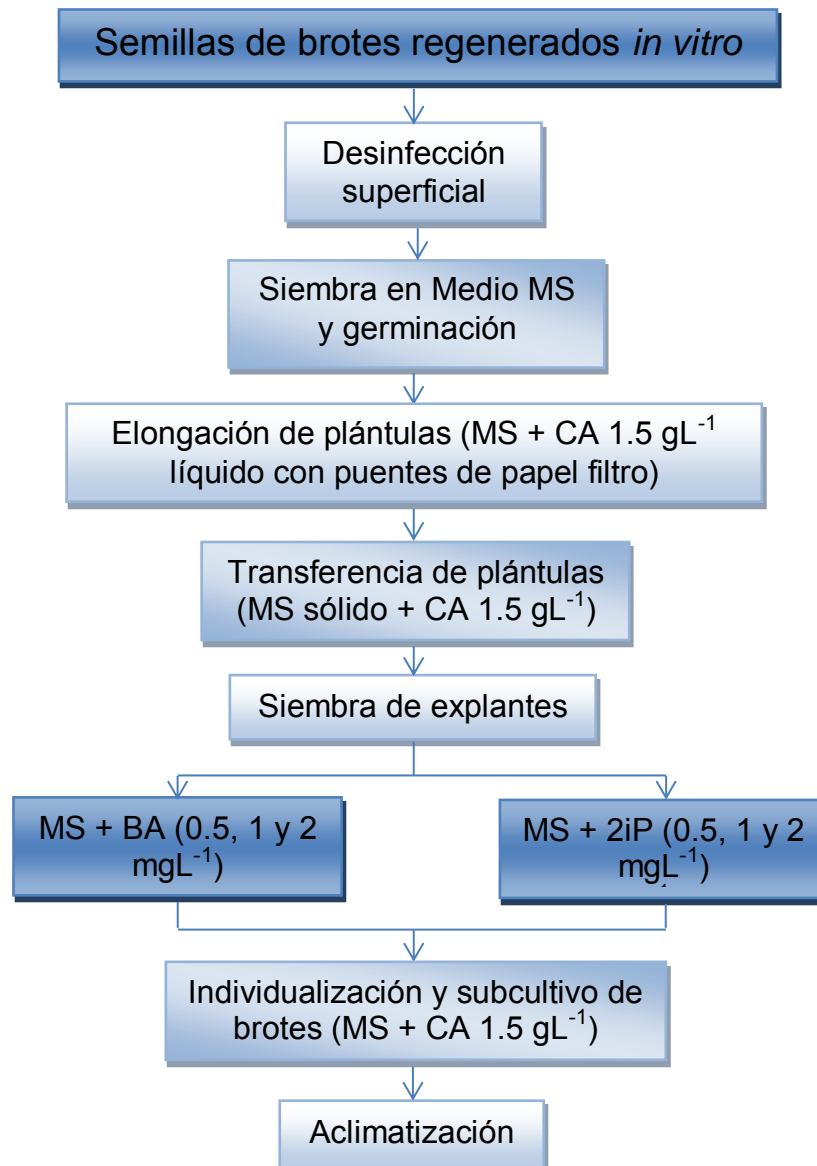


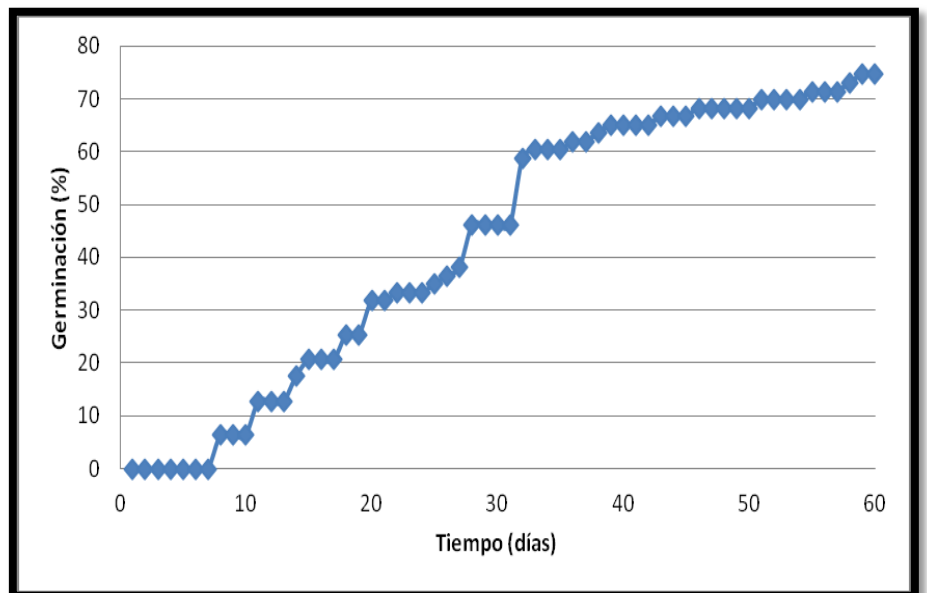
Figura 5. Método para la micropropagación de *Mammillaria coahuilensis* a partir de semillas de brotes regeneradas *in vitro*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desinfección, siembra y germinación

No se presentó contaminación en los cultivos, esto comprueba que la técnica de desinfección fue exitosa. La germinación inició con el rompimiento de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula, posteriormente surgió el hipocótilo de color verde y dos semanas después el epicótilo inició su desarrollo con la aparición de las primeras aréolas y tubérculos tal como lo reportó Flores (2007) (Figura 6).

La germinación ocurrió a los ocho días posteriores a la siembra, culminado a los dos meses y alcanzó el 75% (Gráfica 1). Flores (2007) reportó la germinación de semillas de 4 años de almacenamiento de esta especie, inició a los 7 días y concluyó a los 27 alcanzando del 34 al 60%. En semillas de seis meses inició a los 7 días y culminó a los 23 obteniendo del 83 al 100% de germinación. En ambos casos se exploraron tres medios: agua con agar, MS 50% y MS 50% + CA, siendo mejor el primero. López (2009), obtuvo la germinación de la misma especie de los 3 a los 9 días obteniendo el 100% en semillas de 16 y 21 meses de almacenamiento y el 50% en semillas de 24 meses al sembrar en MS 50% y Manzo (2010) observó la germinación de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* a los nueve días posteriores a la siembra alcanzando el 26.98% en MS al 25% de macronutrientes.



Gráfica 1. Porcentaje de germinación acumulada *in vitro* de *M. coahuilensis* en medio MS 100%

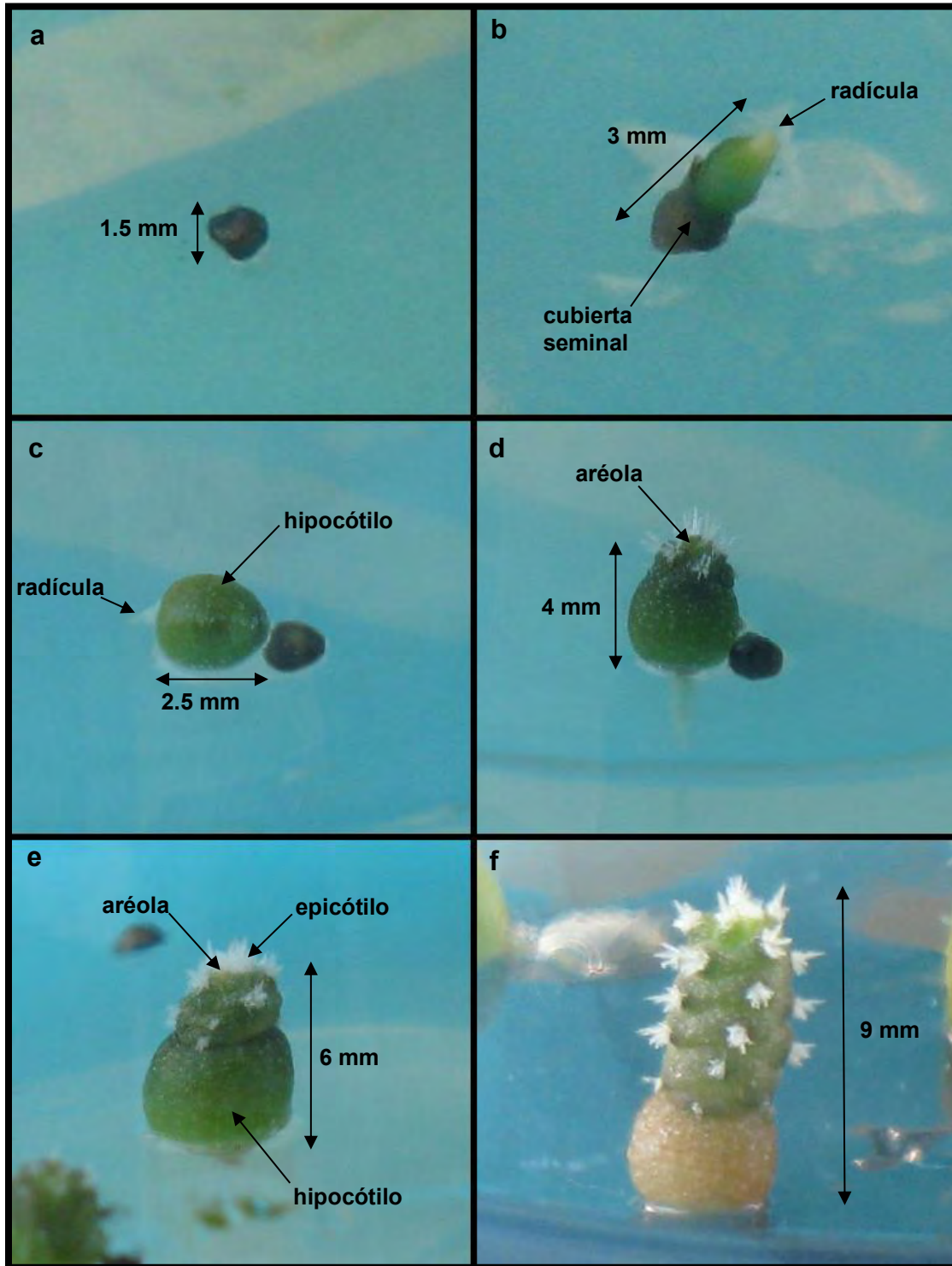


Figura 6. Etapas de la germinación de *Mammillaria coahuilensis* a) semilla, b) germinación, surgimiento de la radícula, c-e) desarrollo del hipocótilo, epicótilo y las primeras aréolas, f) plántula con tallo definido.

La diferencia entre los porcentajes de germinación en los trabajos de Flores (2007) y López (2009) quienes reportaron hasta un 100% y la presente investigación (75%) pudo deberse a que, en los anteriores estudios, se utilizaron semillas de plantas silvestres y en esta investigación se usaron semillas de plantas propagadas *in vitro* que fueron aclimatizadas y mantenidas en condiciones de invernadero y probablemente su capacidad de germinación disminuyó. Otra razón es debida al medio de cultivo, ya que en esta investigación las semillas fueron sembradas en MS mientras que López (2009) realizó la siembra en MS 50% y Flores (2007) utilizó agua con agar, MS 50% y MS 50% + CA. Una mayor cantidad de sales en el medio limita la cantidad de agua disponible para las semillas, lo que puede retrasar o llegar a impedir la germinación de éstas (Moterle *et al.*, 2006). Además el tiempo de almacenamiento también pudo influir ya que en algunas especies, conforme transcurre el tiempo, las semillas van perdiendo viabilidad y el material de la presente investigación tuvo nueve meses de almacenamiento, mientras que los mejores porcentajes de germinación para Flores (2007) ocurren en semillas de 6 meses.

Se han realizado diversos estudios de cultivo *in vitro* en los cuales se usaron plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes tal como lo recomienda Rubluo (1997), por ejemplo Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) obtuvieron un 53.3% de germinación de semillas de *Mammillaria san-angelensis* sembradas en medio MS, el cual fue menor en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio. Infante (1992) reportó la germinación *in vitro* de *Mediocactus coccineus* y obtuvo un 94% al sembrar en medio MS. Giusti *et al.* (2002) reportaron la germinación de *Escobaria minima* (69%), *Mammillaria pectinifera* (23%) y *Pelecyphora aselliformis* (46%) en papel filtro mojado. García y Malda (2009) obtuvieron el 91% de germinación en *M. mathildae* usando MS 50%. Gracidias-Días *et al.* (2010) mencionan que la germinación de *Mammillaria luethyi* se dio de los 3 a 11 días en MS 50% y se obtuvo un bajo porcentaje de germinación (13.6%) que se logró únicamente cuando se retiró la cubierta seminal. Yáñez (2011) reportó la germinación de *M. bombycina* en MS 50%, la cual inició a

los 7 días y culminó a los 75 obteniendo el 80%. No obstante, la mayoría de los trabajos de cactáceas propagadas *in vitro* reportan porcentajes de germinación, pero en la mayoría no se menciona la edad de la semilla o el tiempo de almacenamiento, lo cual es un factor importante en el porcentaje obtenido al ser germinación *in vitro*.

6.2 Elongación de plántulas (medio líquido)

Después de seis meses y medio 44 plántulas germinadas *in vitro* se transfirieron a medio líquido (Figura 7), en el cual permanecieron cerca de un mes, tiempo en el que se observó la elongación del epicótilo. Para evitar problemas de hiperhidratación las plántulas se transfirieron a medio sólido MS + CA 1.5 gL⁻¹ por 20 días antes de ser seccionadas para la obtención de explantes. Las plántulas alcanzaron un máximo de 16 mm y un mínimo de 7, comparado con las que permanecieron en medio sólido, las cuales alcanzaron un máximo de 5 mm. López (2009) reporta para la misma especie un promedio de 8 mm de longitud para plántulas que fueron subcultivadas a medio líquido después de 26 días y 4 mm para las que no. Por otro lado Díaz (2007) reportó la elongación de plántulas de *Thelocactus rinconensis* en medio líquido con puentes de papel filtro, las cuales después de un mes de haber permanecido en esas condiciones alcanzaron un promedio de 12.9 mm y las que no fueron subcultivadas a medio líquido alcanzaron un tamaño promedio de 5 mm.

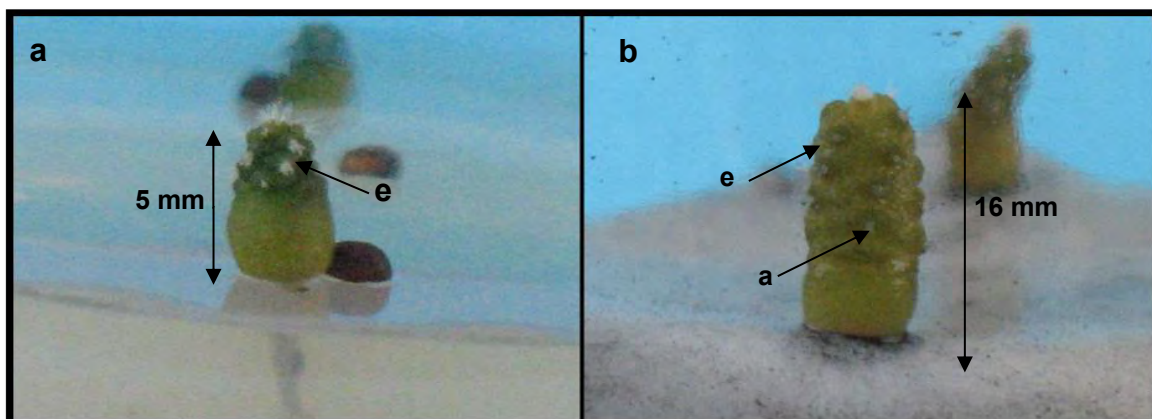


Figura 7. Elongación de plántulas en: a) Medio MS sólido y en b) Medio MS líquido con puentes de papel filtro. Se observa la elongación del epicótilo (e) a más del triple del tamaño y la separación de las aréolas (a).

El medio líquido tiene diversos usos ya que puede ser útil en cultivos de suspensiones celulares para la obtención de metabolitos secundarios o para la propagación vegetal, ya sea mediante embriogénesis somática u organogénesis, también se usa en biorreactores y sistemas de inmersión temporal; estos sistemas de cultivos líquidos tienen efectos significativos en las tasas de multiplicación y además en la morfología de las plantas propagadas (Preil, 2005) ya que la presencia de agar en los medios de cultivo de cactáceas, puede presentar un efecto negativo sobre la activación de las aréolas, esto debido a la presencia de este soporte que dificulta la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997).

Sin embargo con el uso de medio líquido se puede presentar el problema de hiperhidratación debido a que las cactáceas poseen tejidos adaptados a almacenar grandes cantidades de agua hasta el grado de hiperhidratarse, lo que en ciertas ocasiones provoca la destrucción de los tejidos. Una plántula o tejido hiperhidratado se caracteriza por ser translúcido, vítreo, presenta un incremento de tamaño, color más claro de lo normal y se rompe fácilmente y este problema puede ocurrir con cualquier planta *in vitro* como orquídeas, agaves, entre otros (Kevers *et al.*, 2004).

Para evitar el problema de hiperhidratación se recomienda limitar el tiempo en que la plántula esté en este tipo de medio, observar las plantas y cuando presenten los primeros síntomas de hiperhidratación (aumento rápido de tamaño, cambios en el color, tejido translúcido), subcultivarlos a medio sólido. En esta investigación los resultados sugieren que un mes es el tiempo adecuado para obtener plántulas elongadas, sanas y listas para la obtención de explantes, sin el problema de hiperhidratación, tal como lo reportaron Díaz (2007) y López (2009).

6.3 Respuestas morfogénicas

Se observó la regeneración de brotes por la activación de las aréolas tanto del meristemo vegetativo como del floral en ambos tipos explantes en todos los

tratamientos, al contrario de Flores (2007) quién reportó el desarrollo de brotes sólo a partir de meristemos florales mientras que López (2009) obtuvo la formación de brotes sólo a partir del meristemo floral en explantes apicales y sólo del meristemo vegetativo en laterales.

6.3.1 Formación de brotes por activación de aréolas

La respuesta fue visible a partir de la segunda semana de incubación ya que los explantes apicales aumentaron su volumen y los laterales presentaron una curvatura cóncava. En la zona de corte de los dos tipos de explantes se observó un cambio en el color de verde a café, esto se debe probablemente a la oxidación del tejido (Figura 8). Ésta se produjo en respuesta a la herida que se le hizo al tejido vegetal al momento de seccionarlos, ya que se secretan compuestos que intervienen en el proceso de cicatrización y defensa contra patógenos (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004; Azofeifa, 2009). Pérez *et al.* (1998) reportaron la oxidación de explantes de *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha clavata*, *C. radians*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus hamatacanthus*, *F. pilosus* y *Nyctocereus serpentinus*, la cual se controló parcialmente con la adición de un antioxidante llamado polivinilpirrolidona (PVP) al medio de cultivo. Ramirez-Malagón *et al.* (2007), quienes propagaron diez especies de *Mammillaria*, mencionan que el 80% de los explantes se perdieron por una oxidación excesiva, contaminación y/o necrosis. Soto (2013) reportó la oxidación de explantes de *Echinocactus grusonii*, la cual ocurrió 3 días posteriores a la siembra y menciona que a los 90 días el 16% de los explantes cultivados en medio líquido presentaron oxidación, mientras que en medio sólido fue el 36%.

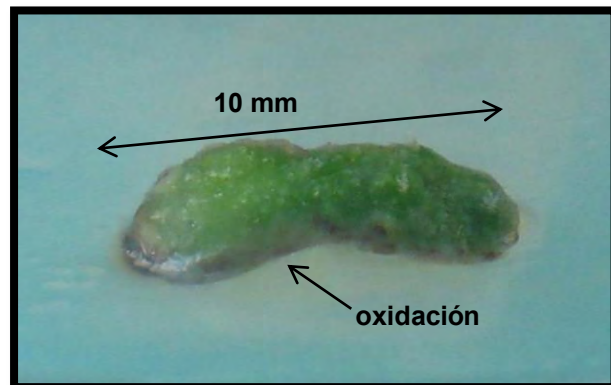


Figura 8. Corte lateral de una plántula de *M. coahuilensis*, se observa la oxidación en la zona de corte del explante en MS + BA 2 mgL⁻¹.

El 4% de los brotes regenerados se hiperhidrataron después de diez semanas de incubación, sobre todo en los tratamientos con BA, (Figura 9). De acuerdo con Kevers *et al.* (2004) esto se debe a la presión osmótica, el medio rico en nitrógeno y a los reguladores de crecimiento, en particular las citocininas, a heridas y a la humedad relativa alta.

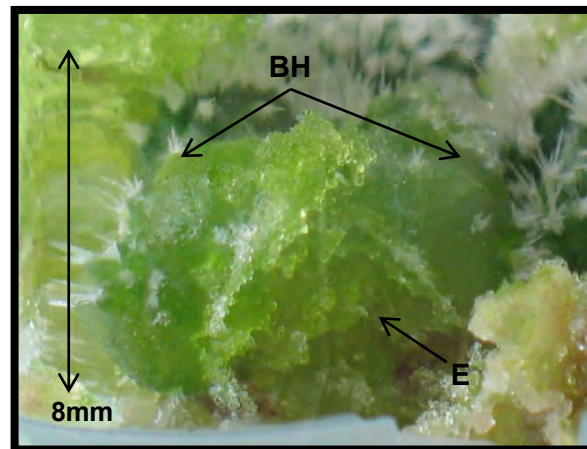
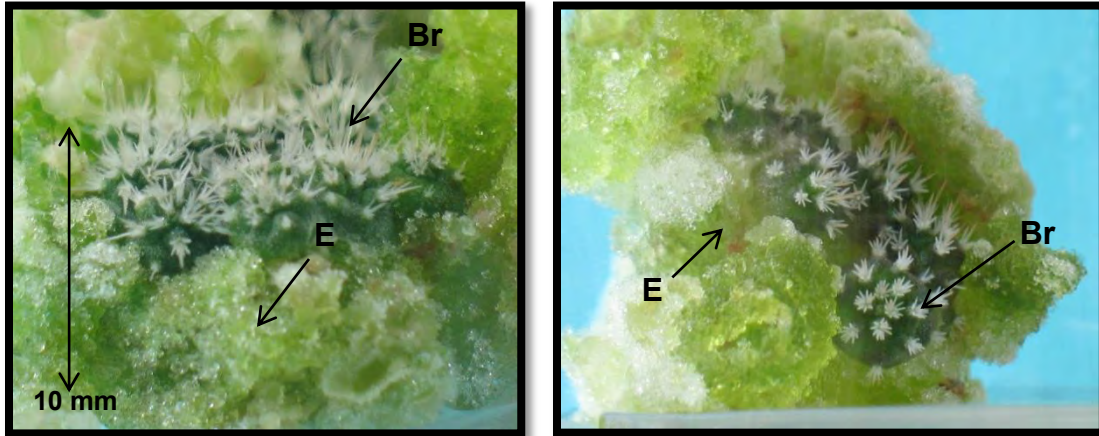


Figura 9. Explante (E) y brotes hiperhidratados (BH) en MS + BA 2 mgL⁻¹.

Se observó también el desarrollo de callo en todos los tratamientos, tanto en los explantes apicales como en los laterales, sin embargo sólo se presentó en las zonas de corte. El tipo de callo en ambos tipos de explante fue desmenuzable en su superficie y con tonalidades diferentes de verde a blanco (Figuras 10 y 11). Díaz (2007) obtuvo formación de callo en la zona de corte del explante de *Thelocactus rinconensis* principalmente en explantes provenientes de plántulas que pasaron por medio líquido, de la misma manera que en la presente investigación, ya que las plántulas de las cuales se obtuvieron los explantes fueron cultivadas en medio líquido por 25 días. Esta respuesta también se presentó en los explantes de *Lophophora williamsii* cultivados en medio con BAP, los tratamientos con este regulador de crecimiento fueron los que presentaron el grado más alto de hiperhidratación (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997). En la propagación *in vitro* de *Hylocereus costaricensis* se observó el desarrollo de callo en la base de los explantes cultivados en MS + BAP, además los brotes obtenidos presentaron anomalías (Viñas *et al.*, 2012).



Figuras 10 y 11. Formación de callo en la base de explantes laterales (E) en MS + BA 2 mgL⁻¹.

6.3.2 Explantes apicales

En los tratamientos con 2iP no se obtuvo respuesta de ningún tipo en los explantes apicales, sólo ocurrió su elongación y eventual formación de raíz en las base del explante. Los explantes apicales en BA aumentaron su tamaño y conservaron su forma globosa y a la quinta semana aparecieron abultamientos esféricos en las axilas y en el ápice de los tubérculos, ya que una de las características del género *Mammillaria* es la presencia de aréolas dimórficas (aréola vegetativa y aréola floral), posteriormente aparecieron pequeñas espinas en el centro del abultamiento y a la siguiente semana se observaron los tubérculos de los nuevos brotes (Figura 12). En general la respuesta de los explantes apicales fue baja, ya que en el tratamiento BA 0.5 mgL⁻¹ sólo se desarrollaron 0.16 brotes por explante en promedio, en cambio en el tratamiento BA 1 mgL⁻¹ se presentó un promedio de 8.8 brotes por explante y en BA 2 mgL⁻¹, un promedio de 10.6 brotes.

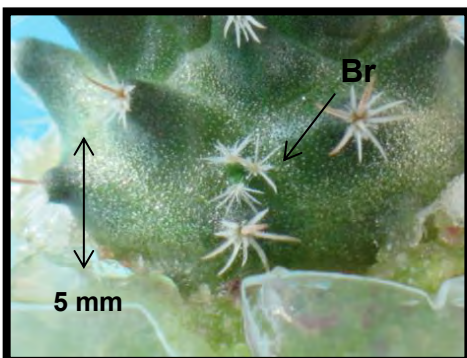


Figura 12. Organogénesis directa en explantes apicales de *M. coahuilensis*. Se observa un brote (Br) que surge de la aréola floral en el tratamiento BA 0.5 mgL⁻¹ después de 10 semanas de cultivo.

En el tratamiento de BA 1 mgL⁻¹ los brotes surgieron en la axila de los tubérculos del explante (aréolas florales) como lo muestra la figura 13a y también surgieron brotes de las aréolas florales de base del explante (Figura 13b).

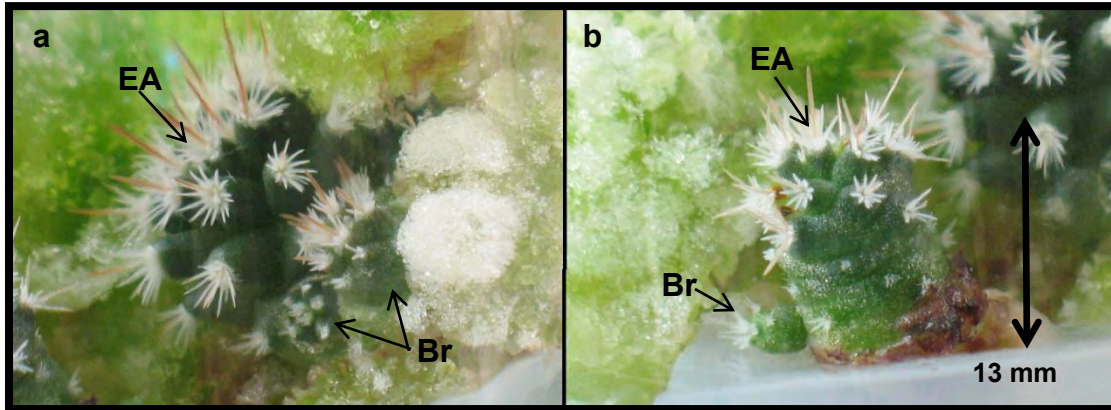


Figura 13. Brotes (Br) en las aréolas florales (a) y en la base (b) de explantes apicales (EA) en el tratamiento BA 1 mgL⁻¹ después de 10 semanas de cultivo.

En el tratamiento BA 2 mgL⁻¹ se observaron respuestas distintas a los tratamientos anteriores, ya que mientras que en BA 0.5 y 1 mgL⁻¹ los brotes surgieron sólo de la aréola floral, en BA 2 mgL⁻¹ los brotes surgieron tanto de la aréola floral como de la vegetativa (Figura 14) cabe mencionar que para esta especie se había reportado la formación de brotes sólo de la aréola floral en explantes apicales cultivados en MS + BA (0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) (Flores, 2007; López, 2009).

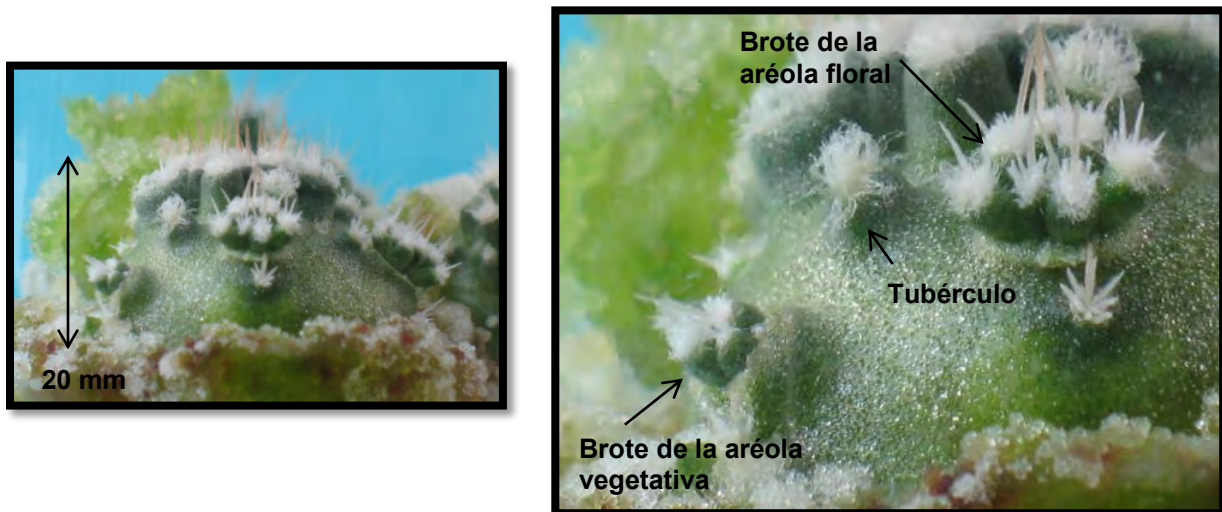


Figura 14. Brotes que surgieron de la aréola floral y de la vegetativa de explantes apicales en el tratamiento BA 2 mgL⁻¹ después de 10 semanas de cultivo.

Además en este tratamiento se observó también el desarrollo de abultamientos nodulares en la base de los explantes que posteriormente se diferenciaron en brotes (Figura 15).

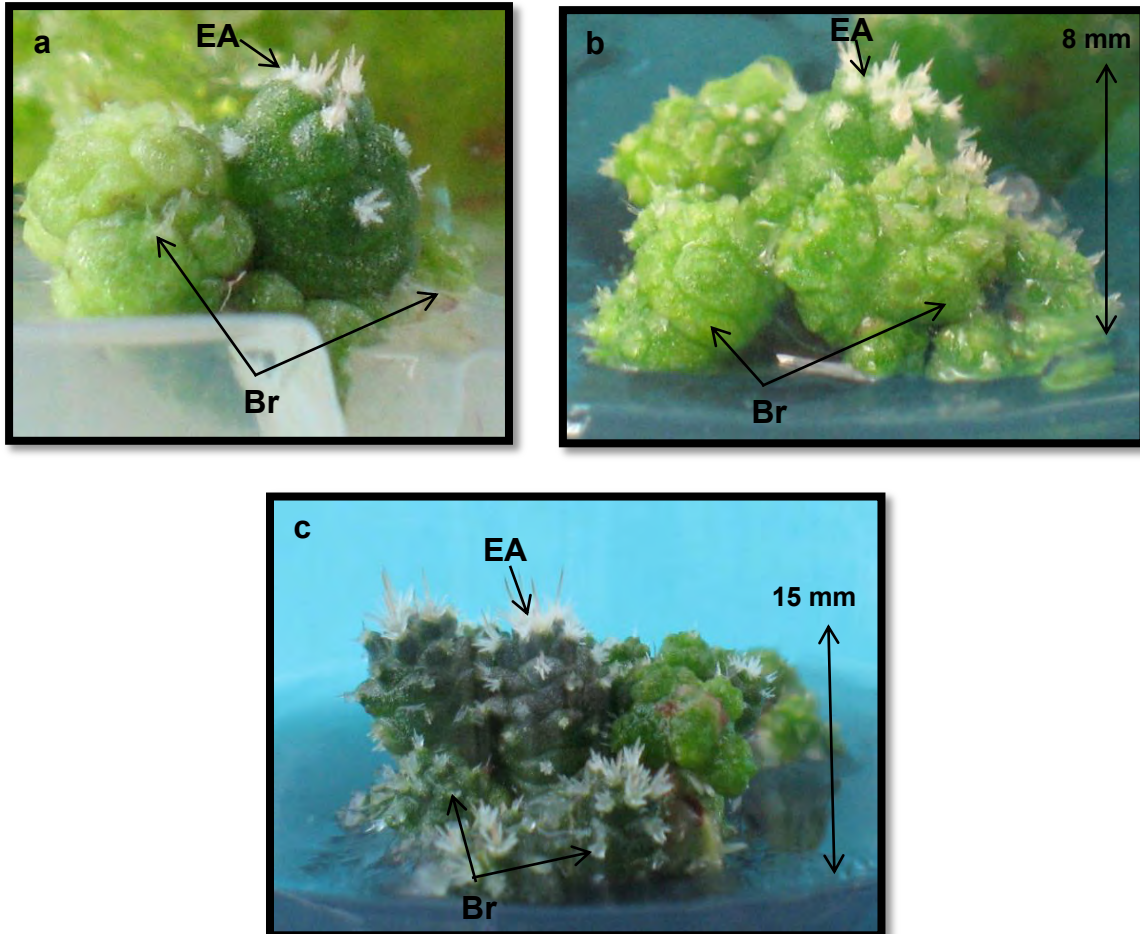


Figura 15. Brotes (Br) de la base de explantes apicales de *M. coahuilensis* (EA) en el tratamiento BA 2 mgL⁻¹ a las 10 (a), 12 (b) y 20 semanas de cultivo (c).

Flores (2007) reportó para esta especie que el mejor tratamiento para la formación de brotes en explantes apicales fue BA 1 mgL⁻¹ ya que obtuvo un promedio de 9.8 brotes por explante apical. De acuerdo con Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis* uno de los mejores tratamientos para los explantes apicales fue BA/ANA 1/0.01 mgL⁻¹, pues formaron 21-35 brotes, sin embargo en *M. coahuilensis*, al usar esa cantidad de BA sólo se formaron 8.8 brotes por explante en promedio, por lo que es probable que la auxina haya inducido la

formación de un número mayor de brotes en *M. san-angelensis*. Es interesante mencionar que algunas especies no necesitan reguladores de crecimiento para formar brotes, como en *M. mathildae* que desarrolló 1.14 brotes por explante apical en MS libre de reguladores de crecimiento, aunque es probable que el desarrollo de estos se deba a las hormonas vegetales endógenas (García y Malda, 2009). Para otras especies de cactáceas se han obtenido resultados al usar BA, ya que Díaz (2007) reportó para *T. rinconensis* la formación de brotes en explantes apicales cultivados en BA/ANA 1/0, 1/0.1 y 2/0.1 mgL⁻¹ con un promedio de brotes por explante de 0.33, 2.3 y 2.6 respectivamente. Mientras que Zamora (2007) obtuvo mejor respuesta sólo en presencia ANA (0.5 y 1 mgL⁻¹) para explantes longitudinales de *T. bicolor* con un número de brotes por tratamiento de 16 y 12 respectivamente.

Por otro lado, en los tres tratamientos con 2iP no se observó organogénesis de ningún tipo en los explantes apicales. Se ha reportado la generación de brotes en este tipo de explantes al usar 2iP en otras especies como *T. rinconensis* (Díaz, 2007) con un promedio de 2.3 brotes por explante en los tratamientos de 2iP/ANA 2/0.1 mgL⁻¹, lo que puede señalar que la auxina contribuyó a la formación de éstos.

6.3.3 Explantes laterales

Los explantes en BA y 2iP ya presentaban brotes a la quinta semana de incubación, éstos se desarrollaron a partir de las aréolas florales y de las vegetativas. La respuesta fue visible desde la segunda semana ya que el explante presentó una curvatura cóncava (Figura 16a), después los tubérculos se separaron y entre ellos aparecieron pequeñas protuberancias esféricas (Figura 16b), que incrementaron su volumen, posteriormente se observó la aparición de espinas blancas y por último surgieron los brotes globosos de un color verde claro que, al crecer, tomaron un verde más oscuro y brillante y las espinas, en principio blancas, se tornaron rojas (Figura 16 c-f).

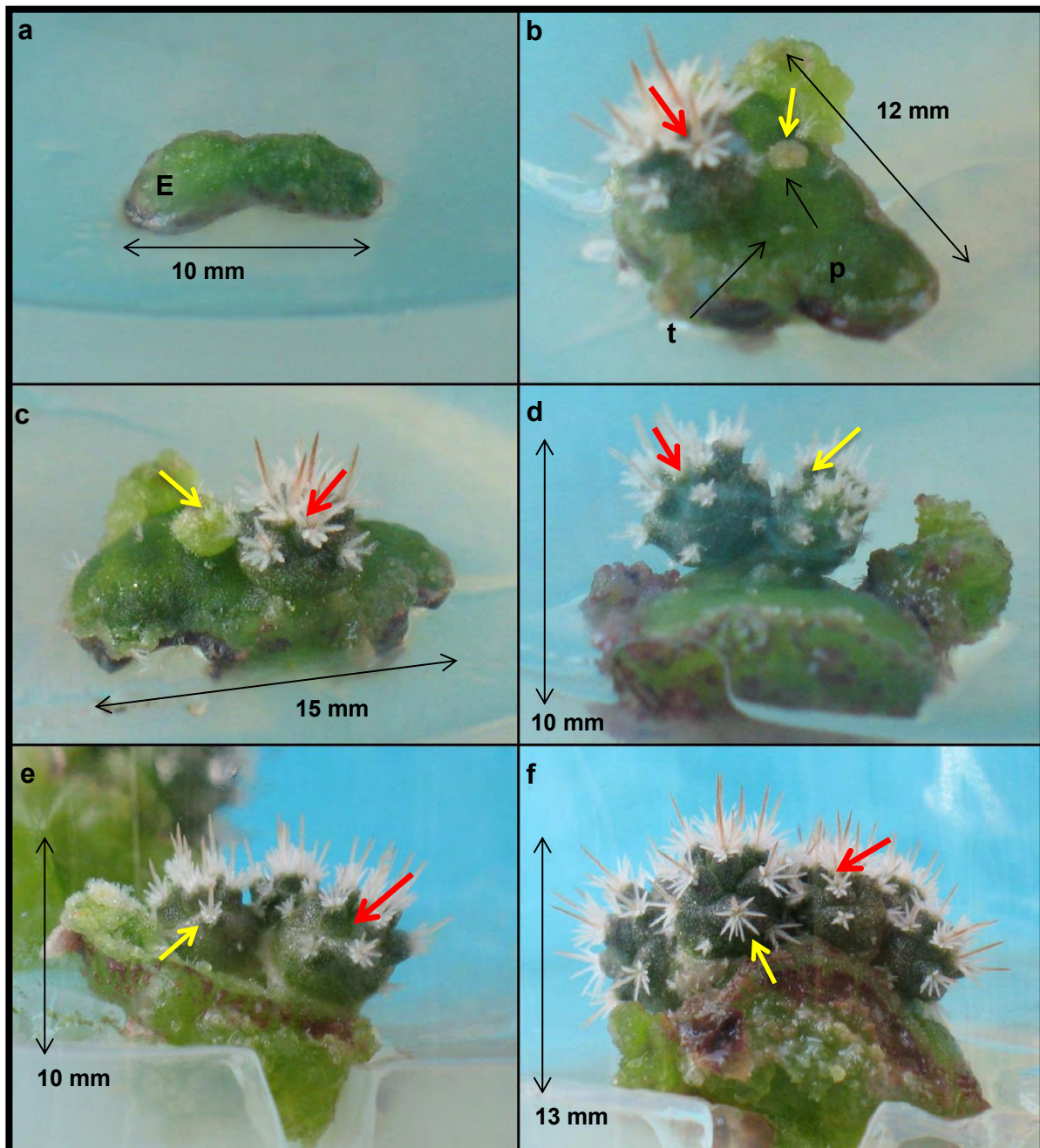


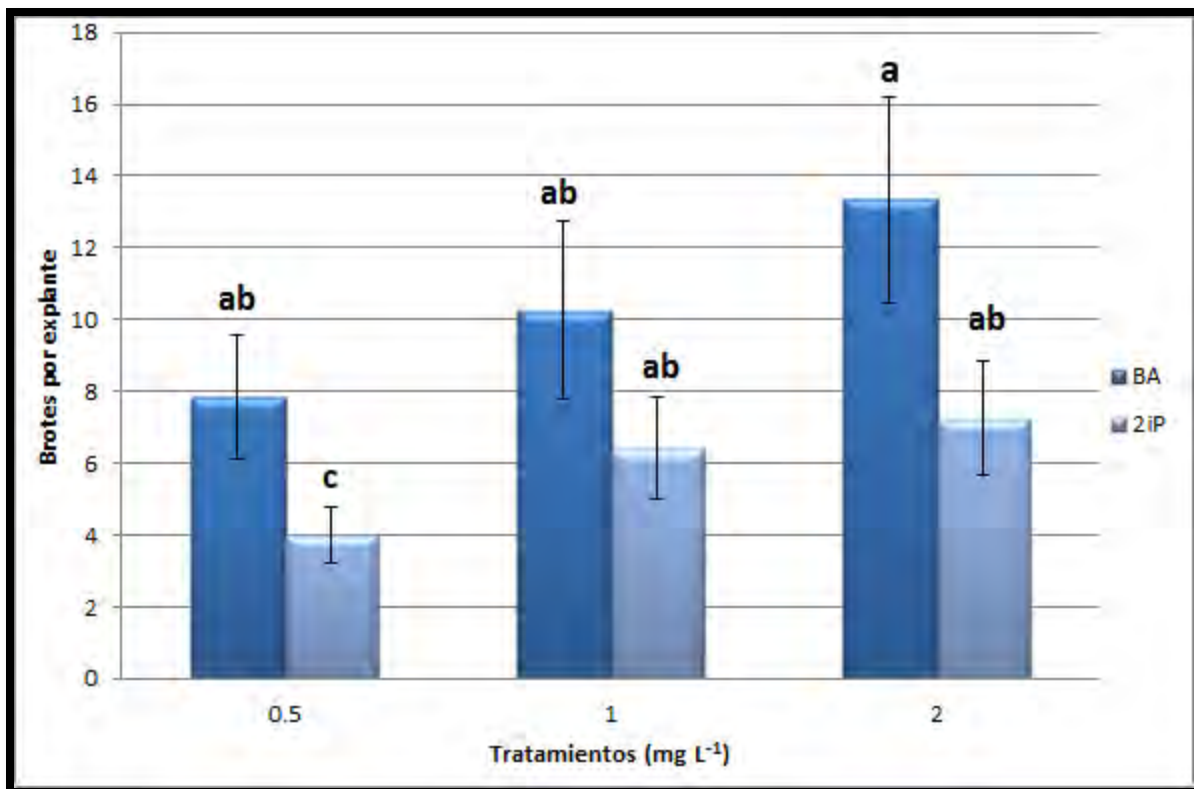
Figura 16. Desarrollo de brotes en explantes laterales. Las flechas amarillas indican los brotes que surgen de las aréolas florales (af) y las flechas rojas los de aréolas vegetativas (av). a) Explante lateral; b) la af se distingue como una pequeña protuberancia entre los tubérculos (t); c-f) secuencia del crecimiento de los brotes de af y av en el transcurso de 10 semanas en MS + BA 0.5 mgL⁻¹.

El mayor número de brotes se presentó en el tratamiento BA 2 mgL⁻¹ con un promedio de 13.3 brotes por explante, seguido de BA 1 mgL⁻¹ con 10.25, BA 0.5

mgL⁻¹ con 7.83. En los tratamientos con 2iP, el mayor número de brotes se presentó en la concentración 2 mgL⁻¹ con un promedio de 7.25 brotes por explante, seguido de 1 mgL⁻¹ con 6.41 y 0.5 mgL⁻¹ con 4 brotes.

El análisis de varianza demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas en los cultivos de la misma citocinina (F = 1.307 p= 0.284) para BA y (F = 1.657 p = 0.206) para 2iP.

Al comparar las citocininas en las diferentes concentraciones el análisis de varianza reveló diferencias estadísticamente significativas entre BA y 2iP (F = 2.782 p= 0.024). La comparación de medias de Tukey muestra que la mejor concentración y citocinina fue BA 2 (letra a), seguido de BA 1 y BA 0.5 mgL⁻¹ (ab); 2iP 1 y 2 mgL⁻¹ (ab) y finalmente 2iP 0.5 mgL⁻¹ (c) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Número de brotes promedio por explante lateral de *M. coahuilensis* en los diferentes tratamientos.

En este estudio se puede ver que el número de brotes por explante aumentó al incrementar la concentración de BA y 2iP (Gráfica 2), lo que sugiere que entre mayor sea la cantidad del regulador de crecimiento, probablemente será mayor la activación de los meristemas existentes en el explante, estos resultados contrastan con los obtenidos por Flores (2007), ya que reporta 21.25 brotes por explante en el tratamiento de BA 1 mgL⁻¹ y 8.86 en BA 0.5 mgL⁻¹, pero al usar BA 2 mgL⁻¹ obtuvo solamente 5.1 brotes por explante, en este caso el tratamiento con mayor concentración de BA inhibió la formación de un número mayor de brotes. Pérez *et al.* (1998) reportaron la propagación de *M. candida*, *M. craigii* y *M. uncinata* y observaron que el mejor tratamiento para estas especies fue MS + BA 1 mgL⁻¹ ya que desarrollaron 13.25, 4.65 y 5.25 brotes por explante respectivamente.

Starling (1985) propagó *Leuchtenbergia principis* en MS + BAP 10 mgL⁻¹ y ANA 0.1 mgL⁻¹ y obtuvo 25 brotes por explante. De acuerdo con Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis* uno de los mejores tratamientos para explantes laterales fue BA/ANA 1/0.01 mgL⁻¹, ya que se formaron 21-35 brotes por explante, éstos se reportaron grandes y con fuertes raíces. Machado y Prioli (1996) reportaron la micropropagación de *Cereus peruvianus* obteniendo los mejores resultados en MS adicionado con BA/AIA 1/1 mgL⁻¹ o BA/ANA 1/1 mgL⁻¹ y obtuvieron 61 y 101 nuevos brotes respectivamente. Coca *et al.* (2007) reportaron formación de brotes por organogénesis indirecta en *M. carmenae* en medio MS suplementado con 2,4-D/BA 0.5/3 mgL⁻¹.

Retes-Pruneda *et al.* (2007) reportaron propagación de ocho especies de cactáceas, obteniendo los mejores resultados en *Echinocereus schmollii* con un promedio de 13.5 brotes por explante en el tratamiento de BA 2 mgL⁻¹ y mencionaron que las especies *Echinocereus knippelianus*, *Echinocereus schmollii*, *Mammillaria carmenae*, *M. herrerae*, *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* respondieron significativamente mejor a los tratamientos con BA, mientras que *M. theresae* y *Melocactus curvispinus* lo hicieron a los tratamientos con 2iP.

Garnica y Pérez (2008) reportaron la propagación *in vitro* de *M. carmenae* en medio MS + BA 2 mgL⁻¹ desarrollando 16 brotes por explante. Se ha estudiado la generación de brotes en medio MS libre de reguladores de crecimiento en *Mammillaria mathildae* con un promedio de 4.09 brotes por explante lateral (García y Malda, 2009). Manzo (2010) reportó un promedio de 9 brotes por tratamiento en 2iP 2 mgL⁻¹ para *M. coahuilensis var. coahuilensis*.

A pesar de obtener un mayor número de brotes en el tratamiento de BA 2 mgL⁻¹, los de BA 0.5 mgL⁻¹ y 2iP 0.5 mgL⁻¹ (Figura 17a) presentaron una apariencia más vigorosa, se aprecia un color más intenso, espinas radiales de mayor longitud y cantidad y la espina central de color rojo, en cambio, los brotes de BA 2 mgL⁻¹ (Figura 17b) mostraron una menor longitud del tallo, un color más claro y espinas cortas y blancas. Los datos obtenidos concuerdan con Flores (2007) que concluye que los brotes más vigorosos son los obtenidos en el tratamiento de BA 0.5 mgL⁻¹. Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) también reportan la obtención de brotes muy vigorosos de *M. san-angelensis* en tratamientos con bajas concentraciones de BA (0.1 mgL⁻¹).

Viñas *et al.* (2012) reportaron el desarrollo de brotes con anomalías y necrosis apical de *Hylocereus costaricensis* al usar BAP en grandes concentraciones (9 o 12 mgL⁻¹) y al compararlos con los brotes de tratamientos con menor cantidad de BAP, se mostraban más pequeños y menos vigorosos. Por lo tanto, con la información anterior se puede ver que las altas concentraciones de BA promueven mayor número de brotes, sin embargo, éstos pueden ser menos vigorosos o presentar anomalías, mientras que los obtenidos en concentraciones bajas son producidos en menor número pero muestran un mejor aspecto, lo que puede ser de gran importancia cuando se trata de especies de importancia ornamental.

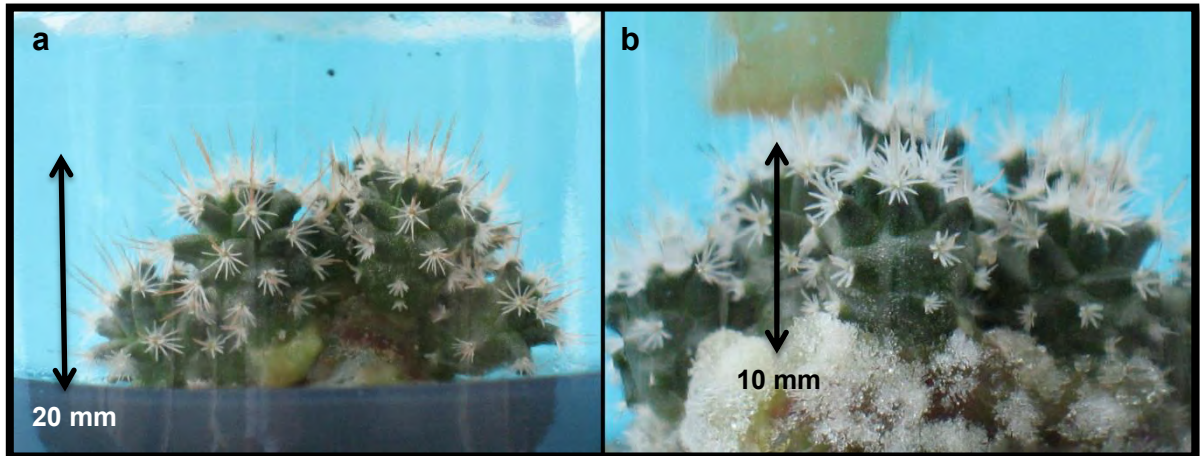


Figura 17. Comparación de los brotes formados en BA 0.5 mgL⁻¹ (a) y en BA 2 mgL⁻¹ (b) dos meses después de la inducción.

6.3.4 Oxidación

Se presentó el 9.5% de oxidación en los brotes de seis meses, ésta no fue severa ya que sólo provocó la muerte del 2%, permitiendo a los restantes su sobrevivencia y recuperación, la oxidación se presentó en los tubérculos y ápices en mayor medida en el tratamiento con BA 1 mgL⁻¹ (Figura 18), esto probablemente se debió a que los tejidos secretaron compuestos fenólicos. También se registró la muerte de dos brotes que cambiaron su tono de verde a blanco (Figura 19). Se pueden usar diversas estrategias para disminuir o evitar la oxidación: el uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo, el crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad, los subcultivos frecuentes, el cultivo en medio líquido, el uso de adsorbentes o antioxidantes, la elección del medio de cultivo, la elección de los reguladores del crecimiento, el cambio del potencial osmótico del medio de cultivo y la disminución del pH del medio, entre otros (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004; Azofeifa, 2009).

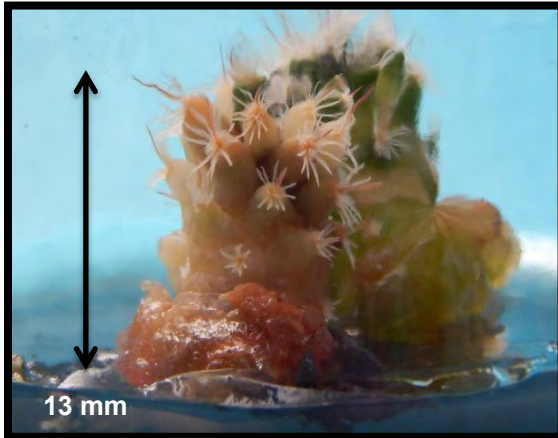


Figura 18. Muerte de un brote por oxidación en $BA\ 1\ mgL^{-1}$ después de 6 meses incubación.

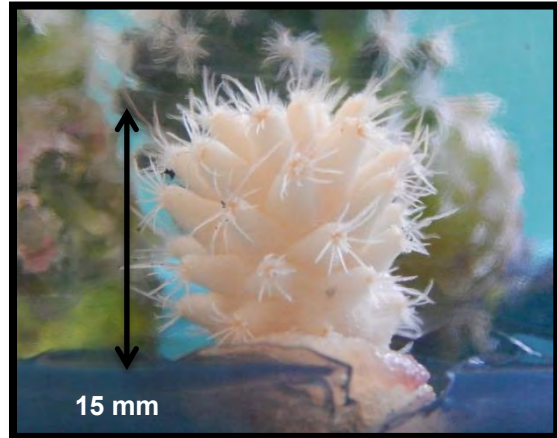


Figura 19. Cambio de coloración y muerte de un brote en $BA\ 1\ mgL^{-1}$ después de 6 meses de incubación.

6.3.5 Brotes secundarios (BS)

Se observó también el desarrollo de brotes secundarios (BS), es decir brotes que se forman a partir de uno inicial, estos aparecieron en el 4.4% de los brotes ya formados dando un promedio de 0.12 BS por brote inicial tanto de los que provenían de explantes apicales como de los laterales, se desarrollaron en la región apical y lateral de éstos (Figura 20). Soto (2013) reportó la formación de este tipo de brotes en *Echinocactus grusonii* cultivados en $MS + 2iP\ 3\ mgL^{-1}$, obtuvo un promedio de 0.43 brotes secundarios y se menciona que éstos aparecieron sólo en los brotes iniciales que pasaron por medio líquido, este dato es interesante ya que los explantes de *M. coahuilensis* utilizados en la presente investigación provenían de plántulas germinadas *in vitro* que posteriormente fueron subcultivadas en medio líquido. El desarrollo de este tipo de brotes nos indica que la planta mantiene su potencial regenerativo para seguir formando brotes después del periodo de inducción.

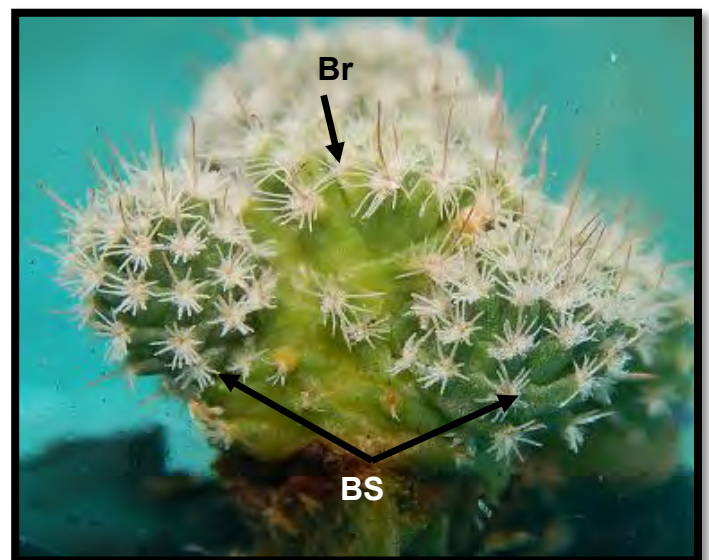


Figura 20. Desarrollo de brotes secundarios (BS) en $2iP\ 2\ mgL^{-1}$.

6.4 Subcultivo, individualización y enraizamiento de brotes

Después de 10 semanas de inducción los brotes de *M. coahuilensis* fueron individualizados y subcultivados en medio MS + CA 1.5 gL⁻¹, aunque en algunos casos en donde el brote era aún muy pequeño, éste permaneció unido al explante inicial (Figura 21); en todos los casos presentaron callo desmenuzable en la base, en mayor medida en los tratamientos con BA que con 2iP. No se necesitó la adición de auxinas y las raíces surgieron entre el brote y el callo, el cual se fue eliminando en los siguientes subcultivos.

En algunos brotes, principalmente en los tratamientos con BA 1 mgL⁻¹ y 2iP 2 mgL⁻¹, la raíz principal fue gruesa y las raíces secundarias fibrosas y en los tratamientos restantes fueron solo delgadas y fibrosas. El porcentaje de enraizamiento fue del 74.5% (BA 0.5 mgL⁻¹), 67% (BA 1 mgL⁻¹), 48% (BA 2 mgL⁻¹), 71% (2iP 0.5 mgL⁻¹), 64% (2iP 1 mgL⁻¹) y 78% (2iP 2 mgL⁻¹) (Figura 22).

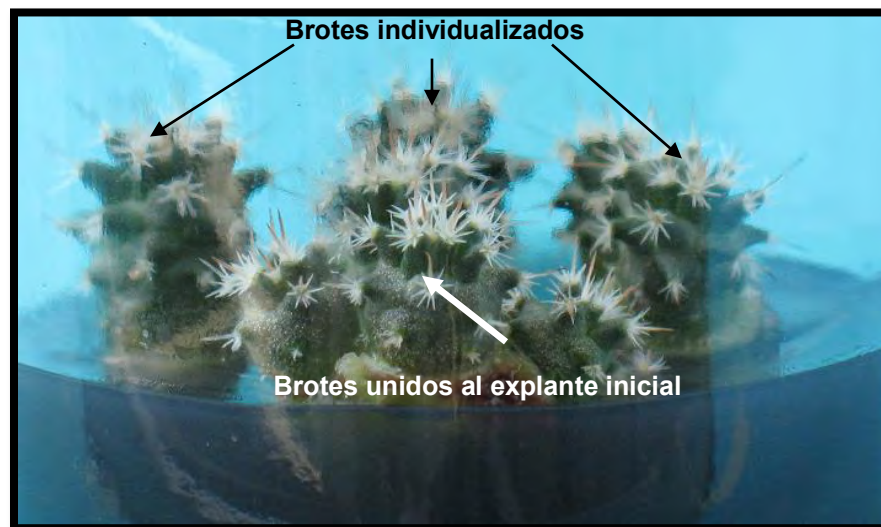


Figura 21. Brotes individualizados y brotes unidos al explante inicial de *M. coahuilensis* en el tratamiento MS + 2iP 2 mgL⁻¹ + CA 1.5 gL⁻¹.

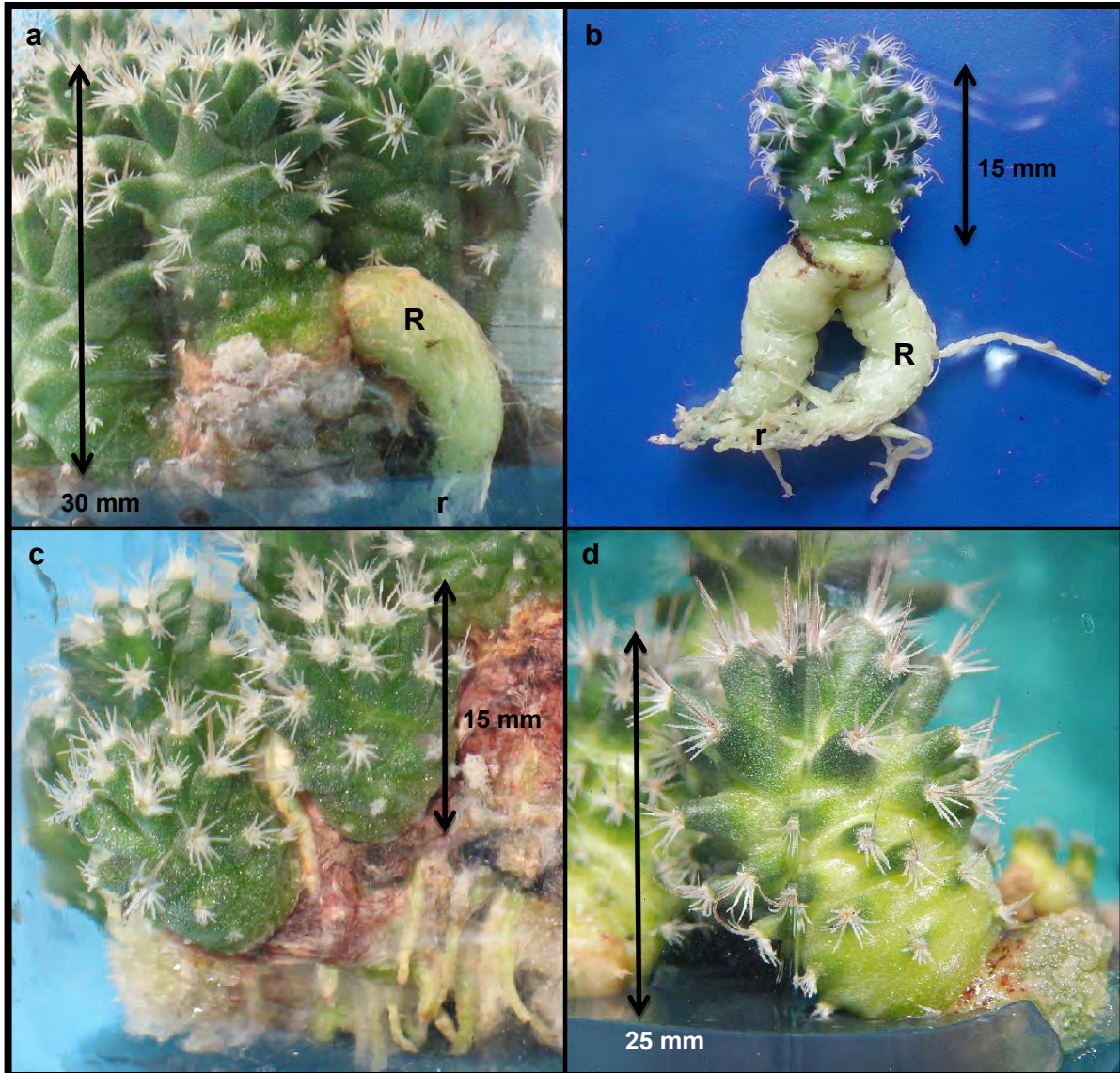


Figura 22. Enraizamiento de brotes de *M. coahuilensis*. a-b) Raíces principales gruesas (R) y secundarias delgadas y fibrosas (r); c) brotes con raíces delgadas y d) brote sin raíz.

Se ha señalado en la literatura que muchas especies de cactáceas no necesitan auxinas para la formación de raíces, tal fue el caso de *M. coahuilensis*, ya que sólo necesitó la adición de CA tal como lo reporta Flores (2007). El carbón activado se usa para diversos fines en cultivo de tejidos vegetales, uno de los principales es para el enraizamiento, ya que al oscurecer el medio de cultivo crea un ambiente adecuado para el desarrollo de las raíces, además tiene la capacidad de absorber compuestos fenólicos, reguladores de crecimiento y también los exudados que

pueden inhibir el crecimiento de las plantas (Pan y van Staden, 1998). Retes-Pruneda (2007) reporta que *Echinocereus schmolli* y *Escontia chiotilla* presentaron porcentajes de enraizamiento altos (72.2 y 100% respectivamente) al cultivarlas en MS + CA 2 gL⁻¹, además en este mismo trabajo reportaron que *Mammillaria carmenae* tuvo un 66% de enraizamiento en MS basal. Viñas (2012) obtuvo el enraizamiento espontáneo de *Hylocereus costaricensis* en el 100% de los brotes obtenidos en medio MS. Rubluo (1997) afirma que en general el enraizamiento de mamilarias es fácil ya que muchas de las especies tienen enraizamiento espontáneo.

En *M. coahuilensis* el enraizamiento espontáneo sin la adición de reguladores de crecimiento ocurrió en un rango del 48 al 78% de brotes. Algunos brotes que no formaron raíces, fueron injertados en plantas de *Myrtillocactus geometrizans* como reporta Flores (2007) y se mantuvieron en condiciones de invernadero.

6.5 Aclimatización

Se realizó un ensayo preliminar de aclimatización tomando 97 de los 607 brotes producidos, de los cuales 85 fueron plantados en sustrato ya que contaban con raíces, es decir, eran plantas completas y 12 fueron injertados. Las plantas que fueron puestas en sustrato se regaron con agua destilada, pero después de 5 días presentaron pudrición de la base y las raíces, esto se debe probablemente a un riego excesivo, por lo que 15 de ellos fueron rescatados al injertarlos dando un total de 27 injertos. A las plántulas puestas en sustrato se les aplicó Radix 1500® para estimular el desarrollo de un mayor número de raíces, ya que algunas presentaban un sistema radicular fuerte, pero otras que no pudieron ser injertadas no presentaban raíces. Los brotes al ser aclimatizados presentaron la epidermis de apariencia rugosa y una disminución de tamaño, éstos son síntomas de deshidratación ya que en esta etapa los estomas de plantas propagadas *in vitro* se encuentran abiertos o no son funcionales y experimentan pérdida de agua, ya que las plantas pasan a diferentes condiciones ambientales de las que tenían dentro del frasco donde la humedad relativa era muy alta (Malda *et al.*, 1999).

Después de cinco meses las plántulas puestas en sustrato lucieron saludables y presentaron un porcentaje de sobrevivencia del 35% (BA 0.5 mgL⁻¹), 33% (BA 1 mgL⁻¹), 20% (BA 2 mgL⁻¹), 45% (2iP 0.5 mgL⁻¹), 5% (2iP 1 mgL⁻¹) y 16% (2iP 2 mgL⁻¹) (Figura 23). Flores (2007) obtuvo el 52.76% de sobrevivencia de 254 brotes aclimatizados de *M. coahuilensis*, el resto se perdió por deshidratación.



Figura 23. Plántulas aclimatizadas de *M. coahuilensis* después de cinco meses de ser llevadas a condiciones *ex vitro*.

Retes-Pruneda *et al.* (2007) reportaron la aclimatización exitosa de *Echinocereus schmollii*, *Echinocereus knippelianus*, *Mammillaria carmenae*, *Escontria chiotilla*, *Polaskia chichipe*, *M. theresae* y *Melocactus curvispinus*, obteniendo porcentajes entre 70 y 98% de sobrevivencia mientras que *M. herrerae* se obtuvo sólo el 49%, el sustrato que utilizaron fue una mezcla de tierra comercial para macetas y arena (1:1). Ramirez-Malagón *et al.* (2007) reportaron la sobrevivencia de diez especies de *Mammillaria* aclimatizadas obteniendo los siguientes porcentajes: *M. bocasana*, 93.9%; *M. densispina*, 87.5%; *M. hahniana*, 96.5%; *M. hutchisoniana*, 92.0%; *M. orcutii*, 84.5%; *M. pectinifera*, 90.0%; *M. picta*, 86.0%; *M. perbella*, 92.2%; *M. rhodantha*, 92.5% y *M. zephyranthoides*, 88.2% al plantarlas en un sustrato compuesto de peat moss esterilizado, la parte basal de las plantas fue sumergida en una solución que contenía 492 µM de AIB .

González (2008) reportó la aclimatización de *Turbinicarpus pseudopectinatus* y obtuvo el 60% de sobrevivencia al colocarlos en sustrato compuesto de tierra negra y tepojal (1:3). Manzo (2010) reportó para *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* el 92.3% de sobrevivencia en sustrato compuesto de tezontle y tierra de monte (1:3) y menciona que en 0.7% restante presentó deshidratación y muerte después de tres días.

Los brotes injertados presentaron un 100% de sobrevivencia después de seis meses y uno de ellos formó flores, las cuales fueron polinizadas manualmente con las flores de los injertos de las plantas madre. Las flores y los frutos de estos brotes presentaron las mismas características de las plantas silvestres y de las plantas madre. El primer fruto emergió después de 4 a 6 semanas de la polinización (Figuras 24 y 25).



Figura 24. *M. coahuilensis*. Plantas madre, se aprecian la flor y los frutos.



Figura 24. a) Aspecto de los brotes de *M. coahuilensis* injertados y mantenidos en condiciones de invernadero; b y c) floración de un brote injertado de seis meses; d) fruto después de 4 a 6 semanas de la polinización.

El crecimiento y desarrollo de los brotes injertados, comparándolos con los que permanecen en sustrato, fue más rápido. El alto porcentaje de sobrevivencia de los brotes injertados demuestra que éste es un método sencillo y exitoso en el rescate de brotes sin raíz. Tal como reporta Flores (2007) quién obtuvo el 100% de sobrevivencia de 9 brotes injertados. Además, este método también puede ser usado para propagar cactáceas que se encuentren en peligro de extinción o que se vean afectadas por alguna enfermedad en las raíces y para las que tienen dificultades para sobrevivir directamente en el suelo (Arredondo, 2002).

CONCLUSIONES

- Se logró establecer y evaluar la germinación de semillas de *M. coahuilensis* obtenidas de plantas propagadas *in vitro*, obteniendo el 75% de germinación.
- La respuesta morfogénica observada fue organogénesis directa por la activación de aréolas florales y aréolas vegetativas.
- La organogénesis directa en los dos tipos de explantes se presentó sólo en los tratamientos con BA.
- Con la hormona vegetal 2iP se observó la organogénesis directa sólo en los explantes laterales.
- En mayor número de brotes generados de *M. coahuilensis* fue en BA 2 mgL⁻¹, obteniéndose 13.3 brotes por explante lateral y 10.6 por explante apical.
- Los brotes más vigorosos, con color más intenso, mayor número de espinas y tubérculos elongados se presentaron en los tratamientos con BA 0.5 mgL⁻¹ y 2iP 0.5 mgL⁻¹.
- Las raíces surgieron del brote y se presentaron diferentes porcentajes de enraizamiento según la concentración de citocinina.
- Después de cinco meses el porcentaje de sobrevivencia de plantas regeneradas procedentes de BA fluctuó entre el 30 y 35% y los cultivados con 2iP entre el 5 y 45% de un total de 70 brotes.
- Los brotes injertados presentaron un 100% de sobrevivencia después de seis meses de haber sido injertados.
- Éste es el primer trabajo en el cual se reporta la germinación y micropropagación de una especie usando semillas de plantas regeneradas *in vitro*.

7. ANEXO

Compuestos del Medio MS (mgL^{-1}) (Murashige y Skoog, 1962).

SALES INORGÁNICAS	
MACROELEMENTOS	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
MICROELEMENTOS	
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.89
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
SOLUCIÓN DE Fe	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
COMPUESTOS ORGÁNICOS	
VITAMINAS	
Ácido nicotínico (B3)	0.5
Piridoxina-HCl (B6)	0.5
Tiamina-HCl (B1)	0.1
INOSITOL	
myo-Inositol	100
GLICINA	
Glicina	2
Sacarosa	30 gL^{-1}
pH	5.7 – 5.8
Agar	8 gL^{-1}

BIBLIOGRAFÍA

- Alanís G. y C. Velazco. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural del noreste de México. CIENCIA UANL. Vol XI, No. 1. 5-11.
- Anderson E. 2001. The cactus family. Timber Prees, Inc. U. S. A. p: 100-102.
- Anicua F. y V. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de Cactáceas Endémicas y Amenazadas o en Peligro de Extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biología). ENEP-Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 70 p.
- Arias-Montes S. 1997. Distribución General. En: Valles S. y L. Rodríguez (Eds.). Suculentas Mexicanas: Cactáceas. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p: 17-25.
- Arias S. y J. Flores. 2013. La familia Cactaceae. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez. 2013. Biología de las Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. p: 492-503.
- Arredondo A. 2002. Propagación y mantenimiento de cactáceas. INIFAP-SAGARPA. Folleto técnico No. 21. p: 6-19.
- Azcona C. 2009. Organogénesis directa de *Melocactus curvispinus* subsp. *dawsonii* (Bravo) N. P. Taylor, 1991 a partir de explantes de tallo, y germinación *in vitro* de *Mammillaria haageana* subsp. *elegans* D. R. Hunt, 1997. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. 48 pp.
- Azcorra G., L. Sánchez, E. Villanueva y C. Fuentes. 2007. Organogénesis indirecta y regeneración de plantas de *Mammillaria gaumeri* Britton et Rose (Cactaceae). XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, México. 25 al 29 de junio de 2007.

- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agron. Mesoamer.* 20(1): 153-175.
- Barthlott W. y D. Hunt. 1993. Cactaceae. En: Kubitzki K., J. Rohwer y V. Bittrich (Eds.). *The families and Genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp. 161–197.
- Bravo-Hollis H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 743 pp.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las Cactáceas de México*. Vol. 3. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. p: 158.
- Bravo-Hollis H. y L. Sheinvar. 1999. *El interesante mundo de las Cactáceas*. FCE. México, D. F. 233 pp.
- Britton N. y J. Rose. 1963. *The Cactaceae. Description and illustrations of the plants of the Cactus Family, Vol II*. Dover Publications, Inc., NY. 241 pp.
- Bunn E., S. Turner y K. Dixon. 2011. Biotechnology for saving rare threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 47:188–200.
- Butterworth C. y R. Wallace. 2004. Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae)—insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *Amer. J. Bot.* 91(7): 1086–1098.
- Calva G. y J. Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6(11) [en línea] <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>
- Cárdenas M. y A. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25 (2): 213-217.
- Casas A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. *CONABIO. Biodiversitas* 40:18-23.

- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay. 8 pp.
- Clayton P., J. Hubstenberger y G. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2):337-343.
- Coca E., J. Ortiz, S. Sánchez y J. Pérez. 2007. Efecto de la irradiación luminosa en la aclimatación de *Mammillaria carmenae* Castañeda (Cactaceae) proveniente de cultivo *in vitro*. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 52(4): 100-108.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York. p: 1262.
- Cronquist A. 1986. Introducción a la botánica. Compañía Editorial Continental, S. A., México. p: 614.
- Debergh P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman y M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 135-140.
- Díaz B. 2007. Propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 63 pp.
- Fay M. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and others succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. Bradleya 10:33-48.
- Flores Y. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 61 pp.
- García O. y G. Malda. 2009. Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la Ciudad de Querétaro. CIENCIA@UAQ. 2(1):3-16.

- Garnica R. y E. Pérez. 2008. Cultivo y Propagación *in vitro* de Cactáceas, Agavaceas, Nolináceas y especies forestales. Depto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 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 Cell. Dev. Biol.-Plant.* 32 : 272-289.
- George E., M. Hall y G. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The Background. Springer-Verlag, 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. *Horti. Sci.* 95(4):319-332.
- González O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría (En Ciencias Biológicas, Orientación Biología Experimental), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. p: 7-41.
- González-Gutiérrez A. 2013. Evaluación del estado de conocimiento de las especies de cactáceas de la NOM-059: contribución a su conservación. En: Memorias del XIX Congreso Mexicano De Botánica, del 20 al 25 de octubre del 2013, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Gracidas-Díaz P., O. González-Caballero y V. Chávez-Ávila. 2010. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G. S. Hinton. En: Libro de resúmenes VII Simposio Internacional Sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas, del 17 al 19 de Marzo de 2010, Sonora, México. p: 135-148.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y CONABIO. México, D. F. p: 11-13,133.
- Hernández H. y H. Godínez. 1994. Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.

- Hernández M., O. González y V. Chávez. 2013. Propagación *in vitro* de tres especies endémicas mexicanas del género *Mammillaria* (Cactaceae): *M. longiflora*, *M. napina* y *M. sanchez-mejoradae*. En: Memorias del XIX Congreso Mexicano De Botánica, del 20 al 25 de octubre del 2013, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Hunt D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens Kew, Londres. 190 pp.
- Hurtado D. y M. Merino. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México, D. F. 232 pp.
- Infante R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:155-159.
- Iriondo J. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16 (1):5-24.
- Jiménez C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. Revista Digital Universitaria. 12(1) [en línea] <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/art04.pdf>
- Jiménez E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez J., Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez y P. Orellana. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Vol. 1 Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Cuba. p: 13-24.
- Kevers C., T. Franck, R. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77: 181-191.
- Kolár Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue culture. Experientia 32: 668-669.

- Lema-Rumińska J., Kulus D., 2012. Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentration. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 11(4), 77-87.
- López A. 2009. Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie Amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 67 pp.
- López A., L. Olgún, J. Márquez y M. López. 2009. Establecimiento y propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas. En: Cátedra Nacional de Biología (2008). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. p: 55-65.
- Machado M. y A. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill., (Cactaceas) by areole activation. *In vitro Cell. Dev. Biol-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. *Hort. Sci.* 81:71-87.
- Manzo S. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis de Maestría en Ciencias (Recursos Genéticos y Productividad). Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza en Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 62 pp.
- Martínez M. 2013. Las angiospermas. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez. (Eds.). 2013. *Biología de las Angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. p: 4-9.
- Martínez-Vázquez O, Rubluo A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science.* 64(1):99-105

- Mauseth J. 1977. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cact. Suc. J. (US)*. XLIX:80-81.
- Minocha S. y P. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2): 168-173.
- Moebius-Goldammer K., M. Mata-Rosas y V. Chávez-Avila. 2003, Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 39:388–393.
- Moterle L., P. de Carvalho, A. de Lucca y C. Scapim, 2006. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de cultivare de milho-pipoca submetidas ao estresse hídrico e salino. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3):169-176.
- Mroginski L. y W. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca M. y L. Mroginski. (Eds). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. p 19-40.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium from rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- Odutayo O., N. Amusa, O. Okutade y Y. Ogunsanwo. 2007. Sources of contamination in tissue culture laboratories in southwester Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 2(3): 67-72.
- Olguín-Santos L., O. Licona, E. Mendoza, J. Márquez-Guzmán y A. López-Escamilla. Micropropagación, ontogenia de brotes regenerados y establecimiento *ex vitro* de *Mammillaria crucigera* Martius (Cactaceae), especie endémica de México. IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo, República Dominicana. 18 al 25 de junio de 2006.

- Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique V., C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.). 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. p: 161-172.
- Ortiz-Montiel J. y R. Alcántara-García. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 42 (1): 3-6.
- Pan M. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture –A review. Plant Growth Regulation 26: 155-163.
- Patiño C. 2010. Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. RIAA 1(1): 7-15
- Pedroza-Manrique J. y M. Caballero. 2009. Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (*Marchantiaceae*) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Rev. Colomb. Biotecnol. 11(2): 85-104.
- Pérez E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 34:131-135.
- Pérez F., O. González y V. Chávez. 2013. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. En: Memorias del XIX Congreso Mexicano De Botánica, del 20 al 25 de octubre del 2013, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Hvoslef-Eide A. y W. Priel. (Eds). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. The Netherlands, Springer: 1-18.

- Ramírez-Malagón R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J. Barrera-Guerra, H. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 43:660–665.
- Rubluo A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En Bajaj, P. (Ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation* 40:193-205.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol. Conserv.* 63:163-169.
- Sánchez-Cuevas M. y J. Salaverría. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 21-26. 2.
- Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza. FCE, México, 390 pp.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo. Segunda edición. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de Diciembre de 2010, México, D. F.
- Soria C. 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subsp. *schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Meztitlan, Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Biología. U. V. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zona Orizaba-Córdoba. Córdoba, Veracruz. 74 pp.

- Soto C. 2013. Evaluación de la regeneración *in vitro* de brotes de *Echinocactus grusonii* (Cactaceae) utilizando medio líquido. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. 75 pp.
- Starling R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cact. Suc. J. 57:3, 114-115.
- Tapia D. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo. 73 p.
- Thorpe T. 2007. History of plant tissue culture. Mol Biotechnol 37:169–180.
- Urrea A., L. Atehortúa y A. Gallego. 2011. Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 13, 39-50.
- Vázquez-Sánchez M., T. Terrazas y S. Arias. 2012. El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cactaeae (Cactaceae, Cactoideae). Botanical Sciences 90 (2): 97-108.
- Villalobos V. y T. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, p: 128 - 141.
- Viñas M., M. Fernández-Brenes, A. Azofeifa y V. Jiménez. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C.Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 48: 469-477.
- von Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233–249.
- Vyskot B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal Horticultural Science* 59:449-452.

- Wyka T., M. Hamerska y M. Wróblewska. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87:27-32.
- Yáñez M. 2011. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 86 pp.
- Zamora H. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotii ex. Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. 45 pp.