



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*,
cactácea endémica de México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FERNANDO PÉREZ HUERTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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

Pérez

Huerta

Fernando

26 33 51 01

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306742813

2. Datos del tutor

Dr.

Víctor Manuel

Chávez

Ávila

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Ángel Salvador

Arias

Montes

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Sol

Cristians

Niizawa

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Isaac

Reyes

Vera

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Octavio

González

Caballero

7. Datos del trabajo escrito

Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México

68p.

2015

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y con el apoyo económico de PAPIIT con el proyecto IT-200412 titulado “Regeneración *in vitro* y conservación de cactáceas mexicanas en peligro de extinción”.

Agradecimientos

A la UNAM por abrirme las puertas y darme las herramientas para crecer tanto académica como personalmente, al brindarme conocimientos así como experiencias memorables.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología por ofrecerme un lugar confortable para el desarrollo de la investigación que en este momento me ayuda a superar esta etapa de mi desarrollo académico.

A mi comité tutorial por destinar algo de su tiempo para revisar a detalle mi escrito y realizar las correcciones pertinentes para generar un trabajo de calidad.

A mi tutor el Dr. Victor Manuel Chávez Ávila por ser una excelente guía durante mi estancia en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, por siempre estar dispuesto a ayudar a pesar de todas sus ocupaciones; y no solamente para el desarrollo de mi investigación, sino también por hacerme pasar momentos inolvidables y amenos en el Laboratorio, por lo que he llegado a considerarlo un buen amigo.

Al M. en C. Octavio González Caballero por ayudarme a crecer como profesionalista, apoyarme en cada reto que se me presentaba y ser un gran maestro y sobre todo amigo.

Al Dr. Sol Cristians Niizawa por tu apoyo en la revisión de mi tesis y los consejos que me has dado, has sido un excelente maestro y amigo; por lo que es grato que me acompañes en este proceso.

Al Dr. Salvador Arias Montes por su amabilidad y accesibilidad para revisar mi escrito, así como por todos sus comentarios que enriquecieron mi tesis, no tuve el placer de convivir mucho con usted pero lo poco que lo he tratado me he dado cuenta de que es una excelente persona.

Al Dr. Isaac Reyes Vera por su buena disposición para revisar mi escrito y por sus comentarios y recomendaciones.

A la Facultad de Ciencias por ser un espacio que me brindó buenas experiencias por 4 años de mi vida que me ayudaron a ser la persona que soy hoy en día.

A mis amigos del Colegio Patria que a pesar de que no nos vemos mucho, siempre los tengo presentes.

A mis amigos del Instituto Don Bosco, que me han visto crecer y me han dado su apoyo y amistad por varios años, gracias Beto, Vale, Andy, Fer, Karen, Vale.

A mis maestros los Biólogos Fernando Lozano y Lauro Ayala por motivarme a seguir su camino y enseñarme lo bonito de la Biología.

A mis amigos de la Facultad por siempre estar a mi lado en nuestra formación como profesionistas: Abraham, Nacho, Ricardo, Andy, Jess, Ari, Omar, Pau, Lulu, Lupita, Arturo, Rubén, Coral, Dianita, Ia, Ricardo, Ángel, Tarzi, Nadia, Lucía, Mit, Ricardo Hector, Poncho, Caro, Andrea, Jatziri, Ceci, Saddam, Xanat, Lalo... hasta aquí la dejo, porque no acabaría je, pero gracias a todos.

A mis amigos del laboratorio, que por el ambiente que generamos los he llegado a querer mucho, gracias por su apoyo incondicional y por sus enseñanzas; por estos años que hemos estado en el laboratorio juntos y por todas las vivencias: Oscar, Mari, Fa, Ester, Quimitzi, Ale F, Pau, Silvi, Alex, Potro, Jesús Sonora, en fin todos los CTV's, son como mi segunda familia junto con mi papá el Dr.

Finalmente y más importante le agradezco a mis papas y mi hermana que siempre han sido la mejor guía que pueda pedir, que me han apoyado haga lo que haga y siempre estarán ahí para mí.

Índice General

| | |
|--|-----|
| Abreviaturas..... | III |
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 2 |
| Antecedentes..... | 4 |
| Biodiversidad..... | 4 |
| Biodiversidad en México..... | 5 |
| Diversidad de Plantas..... | 7 |
| Generalidades de las Cactáceas..... | 9 |
| Diversidad de Cactáceas..... | 10 |
| Importancia de las Cactáceas..... | 12 |
| Importancia Ecológica de las Cactáceas..... | 13 |
| Conservación..... | 14 |
| Descripción del género <i>Mammillaria</i> | 19 |
| <i>Mammillaria hernandezii</i> Glass & Foster..... | 20 |
| Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 22 |
| Medios de cultivo y reguladores de crecimiento..... | 24 |
| Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 25 |
| Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 26 |
| Cultivo de tejidos en Cactáceas..... | 27 |
| Justificación..... | 29 |
| Objetivos..... | 29 |
| General..... | 29 |
| Particulares..... | 29 |
| 2. Materiales y Métodos..... | 30 |
| Material Biológico..... | 30 |
| Semillas..... | 30 |
| Plantas adultas..... | 30 |
| Desinfección y medio de cultivo..... | 30 |
| Plantas adultas. Obtención de explantes e Inducción..... | 32 |
| Plántulas obtenidas de la germinación <i>in vitro</i> de semillas. Obtención de explantes e Inducción morfogénica..... | 33 |
| Enraizamiento y Aclimatización..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 3. Resultados y Discusión | 35 |
| Germinación..... | 35 |
| Desinfección de plantas adultas cultivadas en invernadero..... | 40 |
| Plántulas, cultivo <i>in vitro</i> de explantes somáticos | 41 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de muestras 1 y 2..... | 41 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de muestra 3: ápices de plántulas regeneradas | 47 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de muestra 3: bases de plántulas regeneradas | 50 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de muestra 3: raíces de plántulas regeneradas..... | 52 |
| Comparación de la respuesta morfogénica de los explantes cultivados provenientes de plántulas (Muestra 3)..... | 55 |
| Enraizamiento y Aclimatización | 57 |
| 4. Perspectivas | 59 |
| 5. Conclusiones..... | 60 |
| 6. Bibliografía | 62 |

Abreviaturas

| | |
|-----------|---|
| UICN/IUCN | Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza/International Union for Conservation of Nature |
| CONABIO | Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática |
| CITES | Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres/The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora |
| Ma | Millones de años |
| CAM | Metabolismo Ácido de las Crasuláceas |
| ANP | Área Natural Protegida |
| UMA | Unidades de Manejo Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre |
| ANA | Ácido α -naftalenacético |
| AIA | Ácido indol-3-acético |
| Kin | Kinetina |
| BA | 6-benciladenina |
| MS | Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962) |
| MS50/100 | Medio MS al 50% de la concentración de los compuestos inorgánicos y 100% de los compuestos orgánicos |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| Ha | Hectáreas |

Resumen

Mammillaria hernandezii es una cactácea endémica del estado de Oaxaca, distribuida en las afueras de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, se encuentra incluida en el Apéndice II de CITES, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de Sujeta a Protección Especial y en la lista roja de la UICN en la categoría de en peligro de extinción (endangered). Debido al grado de amenaza que presenta, es necesario realizar estudios para su propagación rápida y a gran escala para favorecer su permanencia, por lo que el Cultivo de Tejidos Vegetales representa la mejor opción para propagar esta especie altamente amenazada. En esta investigación, una vez superada la etapa experimental se estableció un procedimiento para la propagación mediante cultivo de tejidos de *M. hernandezii*, para esto se utilizaron semillas que se colocaron en medio MS50/100 para su germinación, experimentando dos condiciones: la primera, expuesta a un fotoperiodo; y la segunda, en oscuridad, con germinación superior al 60% en fotoperiodo y 0% en oscuridad al transcurrir 150 días. Explantes apicales y basales provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de seis meses de edad, se sometieron a un proceso de inducción por seis meses con 5 concentraciones de ANA/BA (0/2, 0.5/2, 1/2, 0/3 y 0.5/3 mg/l), con el fin de obtener suficiente material vegetal para realizar la presente investigación, del cual se obtuvieron ca. 100 plántulas al finalizar un año, que se utilizaron para identificar la concentración de fitoreguladores para la propagación, para lo que se utilizó medio líquido MS50/100 con 8 tratamientos con fitoreguladores ANA/BA (mg/l): 0/0; 0/1; 0/2; 0.5/1; 0.5/2; 0.1/3; 0/3; y 0.5/3. Se realizaron dos cortes transversales separando el ápice, la base y la raíz de las plantas y se colocó cada una de estas estructuras en la misma concentración para evaluar su respuesta. Después de la inducción por tres meses y estando dos meses en medio basal, se observó que la mejor respuesta regenerativa en cuanto a número de regenerantes se dio en los explantes basales, al obtener formación de brotes en todos los explantes empleados, siendo las mejores concentraciones 0/3 y 0.1/3 con 2.8 y 2.5 brotes por explante respectivamente. Se realizó la aclimatización en condiciones de invernadero de 45 plantas regeneradas, obteniendo 100% de sobrevivencia a los seis meses del proceso. Esta investigación es de gran importancia, pues permitió conocer y conducir, bajo las condiciones experimentales ensayadas, el desarrollo regenerativo de las células de *M. hernandezii*; lograr la propagación de plantas completas; establecer bases para la conservación y el aprovechamiento sostenible de *M. hernandezii*, así como para el desarrollo de futuros estudios con esta especie y con otras cactáceas amenazadas.

1. Introducción

Las cactáceas son angiospermas nativas del continente Americano con su centro de diversificación en México, Brasil y Los Andes (Arakaki *et al.*, 2011). Sin embargo, es difícil comprobar estos resultados debido a la ausencia de evidencia fósil que compruebe su centro de origen (Bravo-Hollis, 1978).

La familia Cactaceae se compone de 126 géneros y más de 1,900 especies (Arias *et al.*, 2012; Becerra, 2000) distribuidas desde la parte sur de Canadá hasta la Patagonia, Argentina; siendo México el país que alberga la mayor cantidad de especies de la familia (946 spp.), seguido por Argentina, Bolivia, Brasil, Perú y EUA (Bravo-Hollis, 1978; Hernández y Godínez, 1994; Ortega y Godínez, 2006; Villaseñor, 2003); de igual manera cuenta con alto grado de endemismo, al poseer 14 géneros y 517 especies endémicas, de un total de 46 géneros y 660 especies distribuidas en su territorio (Ortega y Godínez, 2006), lo que convierte a México en un importante centro de diversidad de cactáceas y representa un lugar vital para realizar tareas de conservación.

A pesar de la alta diversidad de la familia, es uno de los grupos de plantas que se encuentra más amenazado, debido a diversos factores antropogénicos, como el cambio de uso de suelo con más de 21 millones de hectáreas destinadas a la agricultura y 84 millones de hectáreas para la ganadería en México (Siacon, 2012), así como el incremento de los establecimientos humanos dictado por el constante crecimiento poblacional, contando para México con aproximadamente 112 millones de personas (INEGI, 2010) y con estimaciones para mediados del 2015 que alcanzan los 121 millones (CONAPO, 2015), además del tráfico ilegal de cactáceas con cifras que alcanzan los 8 millones de plantas comercializadas anualmente en todo el mundo (CCA, 2005), actuando en sinergia con ciertas características intrínsecas de la familia como sus ciclos de vida largos, crecimiento lento, áreas de distribución restringidas y especializadas, bajas tasas de reclutamiento, bajos índices de germinación entre otras, lo que hace que se encuentren en la NOM-059-SEMARNAT-2010 un total de 276 especies de cactáceas en diferentes categorías de riesgo; mientras que la CITES incluye a toda la familia en los Apéndices I y II, a excepción de *Pereskia* spp., *Pereskopsis* spp. y *Quiabentia* spp. Por ello se ha visto la necesidad de crear diferentes mecanismos mediante los cuales se pueda propiciar la supervivencia de especies.

Debido a la creciente problemática que afecta a las poblaciones de cactáceas en general, los métodos convencionales de propagación no resultan suficientes para la permanencia de las poblaciones silvestres y menos aún para el abastecimiento de plantas para su comercialización; por lo que el Cultivo de Tejidos Vegetales surge como una opción viable para el estudio, conservación y propagación de cactáceas.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una ciencia con aplicación biotecnológica que, basada en la totipotencialidad celular, permite la generación de plantas nuevas a partir

de un pequeño fragmento de una planta madre, llegando a producir, una vez superada la fase de investigación, un gran número de plantas nuevas en tiempos cortos; sin embargo, no existe un método universal de propagación de cactáceas mediante cultivo de tejidos, por lo que es necesario definir condiciones para el control del desarrollo regenerativo de las células y así generar experimentalmente métodos de propagación específicos para cada especie, órgano y tejido.

Mammillaria hernandezii es una planta simple y hemigeofita endémica del estado de Oaxaca ubicada en las afueras de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán, que ocupa un área de tan solo 17.1km² (Peters y Martorell, 2001). Se encuentra incluida en el Apéndice II de CITES, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de Sujeta a Protección Especial y en la lista roja de la UICN en la categoría de en peligro de extinción (endangered), debido a que sus poblaciones se ven afectadas principalmente por la ganadería, la extracción ilegal y el cambio climático. No existen reportes de su propagación por ninguna técnica, ya sea por semillas, injertos o esquejes, y solo existe un reporte de su propagación por cultivo de tejidos (Lázaro, 2014); solamente se conoce su propagación en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por medio de semillas (observación personal), por lo que resulta de gran importancia el desarrollo de métodos de propagación eficientes para el mantenimiento de las poblaciones silvestres de esta especie.

En la presente investigación se logró la regeneración *in vitro* de plantas completas, así como un procedimiento para la propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales de *Mammillaria hernandezii* con el fin de contribuir a su conocimiento y propiciar su sobrevivencia.

Antecedentes

Biodiversidad

La biodiversidad alude a la variedad de la vida existente en un territorio, hace referencia a distintos niveles, ya sea genético, de especie o de ecosistemas. Uno de los niveles que se ha enfatizado es el de la diversidad de especies en el mundo. Por ello, incluso antes de que se comenzaran a clasificar las especies, surgió la duda de calcular la cantidad total de distintos tipos de organismos existentes; de modo que, se han realizado numerosos cálculos por diversos investigadores e instituciones, empleando distintos métodos para obtener dicho dato, por ejemplo; el Libro rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) menciona que para el 2004 se habían descrito un total de 1 545 594 especies. Bisby en 1995 señaló que se habían descrito poco menos de 1 800 000 especies. Además de estos datos, se han realizado estimaciones del total de especies existentes sumadas a las que aún no se han descrito, obteniendo valores que van de 3 a 10 millones de especies. Un ejemplo de estos cálculos es el de Mora y cols. (2011) que estimaron la diversidad de especies en un total de 8.7 millones, con lo que aseguraron que falta por conocer más del 80% de las especies, tanto terrestres como marinas (Tabla 1).

Tabla 1. Estimación del número de especies en el mundo (Mora *et al.*, 2011).

| Especies | Tierra | | | Mar | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| | Catalogadas | Predichas | ±SE | Catalogadas | Predichas | ±SE |
| Eucariotas | | | | | | |
| Animalia | 953,434 | 7,770,000 | 958,000 | 171,082 | 2,150,000 | 145,000 |
| Chromista | 13,033 | 27,500 | 30,500 | 4,859 | 7,400 | 9,640 |
| Fungi | 43,271 | 611,000 | 297,000 | 1,097 | 5,320 | 11,100 |
| Plantae | 215,644 | 298,000 | 8,200 | 8,600 | 16,600 | 9,130 |
| Protozoa | 8,118 | 36,400 | 6,690 | 8,118 | 36,400 | 6,690 |
| Total | 1,233,500 | 8,740,000 | 1,300,000 | 193,756 | 2,210,000 | 182,000 |
| Procariotas | | | | | | |
| Archaea | 502 | 455 | 160 | 1 | 1 | 0 |
| Bacteria | 10,358 | 9,680 | 3,470 | 652 | 1,320 | 436 |
| Total | 10,860 | 10,100 | 3,630 | 653 | 1,320 | 436 |
| Gran Total | 1,244,360 | 8,750,000 | 1,300,000 | 194,409 | 2,210,000 | 182,000 |

Otras de las interrogantes que se han estudiado a lo largo del tiempo son la de conocer la distribución de dicha biodiversidad y la de encontrar los lugares del mundo en donde se concentra la mayor cantidad de especies, con las cuales se identificaron los 17 países que albergan la mayor cantidad de diversidad en el mundo (casi 70% de la diversidad mundial): Brasil, Colombia, China, Indonesia, México, Perú, Venezuela, Ecuador, Australia, Congo, Madagascar, Sudáfrica, EUA, Nueva Guinea, Filipinas, Malasia e India. La mayoría de estos países presentan ciertas características que propician la existencia de una gran diversidad como: ubicación geográfica muy cercana a la zona tropical de la Tierra, orografía compleja que genera diversidad de ambientes, suelos y climas, en algunos se presenta un aislamiento, como en el caso de Madagascar, que propicia la especiación, además de la historia geológica y evolutiva

de los países, ya que algunos se encuentran en áreas de contacto entre dos regiones biogeográficas, como es el caso de México (CONABIO, 2012).

A pesar de la gran diversidad de especies existente en el mundo, e independientemente de su distribución, en los últimos años se han mermado las poblaciones naturales de diversos organismos por diversas causas, entre las que se pueden citar el cambio de uso del suelo y la tala con fines agronómicos y de obtención de recursos maderables; la caza furtiva y el comercio ilegal de especies, cuyo propósito es obtener ciertos materiales ornamentales como pieles, cornamentas y el organismo mismo, entre otros recursos; el cambio climático que afecta la distribución de las especies con capacidad de migración y la extinción de aquellas incapaces de migrar (Naranjo y Dirzo *et al.*, 2009; Balvanera y Cotler *et al.*, 2009).

Con esta problemática, no solo se genera la pérdida de diversidad de especies, sino también la diversidad genética y de ecosistemas, lo cual repercute directamente en las poblaciones humanas, debido a que los ecosistemas proveen diversos servicios a las personas como son: de provisión, como el agua, alimentos y diversos materiales para construcción; de regulación, como procesos del suelo y regulación del clima, entre otros; de sustento, en los que se incluye la producción primaria de las plantas; y servicios culturales, los cuales dependen de la percepción de cada individuo y sus creencias con respecto a la naturaleza (Balvanera y Cotler *et al.*, 2009). Dichos servicios solo se generan cuando los ecosistemas funcionan correctamente (Gamfeldt *et al.*, 2013), es decir cuando todas sus partes desarrollan ciertas actividades para su correcto funcionamiento, por lo que si se da la pérdida de especies, de igual manera se ocasiona la pérdida de servicios vitales para el hombre.

Biodiversidad en México

México es uno de los países con mayor diversidad en el mundo, ocupa el segundo lugar en reptiles con 804 especies, superado por Australia con 880; el tercer lugar en mamíferos con 535 especies; el quinto lugar en anfibios y plantas vasculares con 361 y 23,424 especies respectivamente; y finalmente, el octavo lugar en aves con 1,096 especies (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). Posee además, aproximadamente el 10% de la diversidad mundial (González, 2003). Estas altas cifras de especies presentes en el territorio mexicano, a pesar de que ocupa el 13° lugar en extensión territorial del mundo con 1 964 375 km² (INEGI, 2013), se deben a diferentes causas, entre las que se enumeran su posición geográfica, que se encuentra situada entre los paralelos 14°32'27" y 32°43'06" atravesada por el trópico de Cáncer, que cruza los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Tamaulipas, además de la diversidad del paisaje, ya que México posee una orografía muy compleja, resultado de su historia geológica. Cuenta con alturas que van desde los 0 hasta los 5,610 msnm (Pico de Orizaba); además de la influencia de dos grandes masas de agua que son el Océano Pacífico y el Golfo de México (González, 2003), lo que da como

resultado la existencia de todo tipo de climas establecidos por Köppen, a excepción de los Boreales (D), cuya distribución queda definida para la parte norte con climas más secos y la parte sur y centro con climas tropicales, encontrando los climas templados y fríos a mayores alturas en los sistemas montañosos del territorio (González, 2003) (Fig. 1). Otro factor importante es la historia geológica del territorio, debido a que es el punto de convergencia de dos zonas biogeográficas que son la Neártica y la Neotropical, además de la gran migración que se llevó a cabo durante el Plioceno, debido al surgimiento del Istmo de Panamá en la cual la fauna del Sur arribó a la parte norte del territorio y viceversa. Por todo esto, existen diversas estimaciones que aseguran que México posee de 10 a 12% de las especies del mundo (Llorente Bousquets y Ocegueda, 2008).

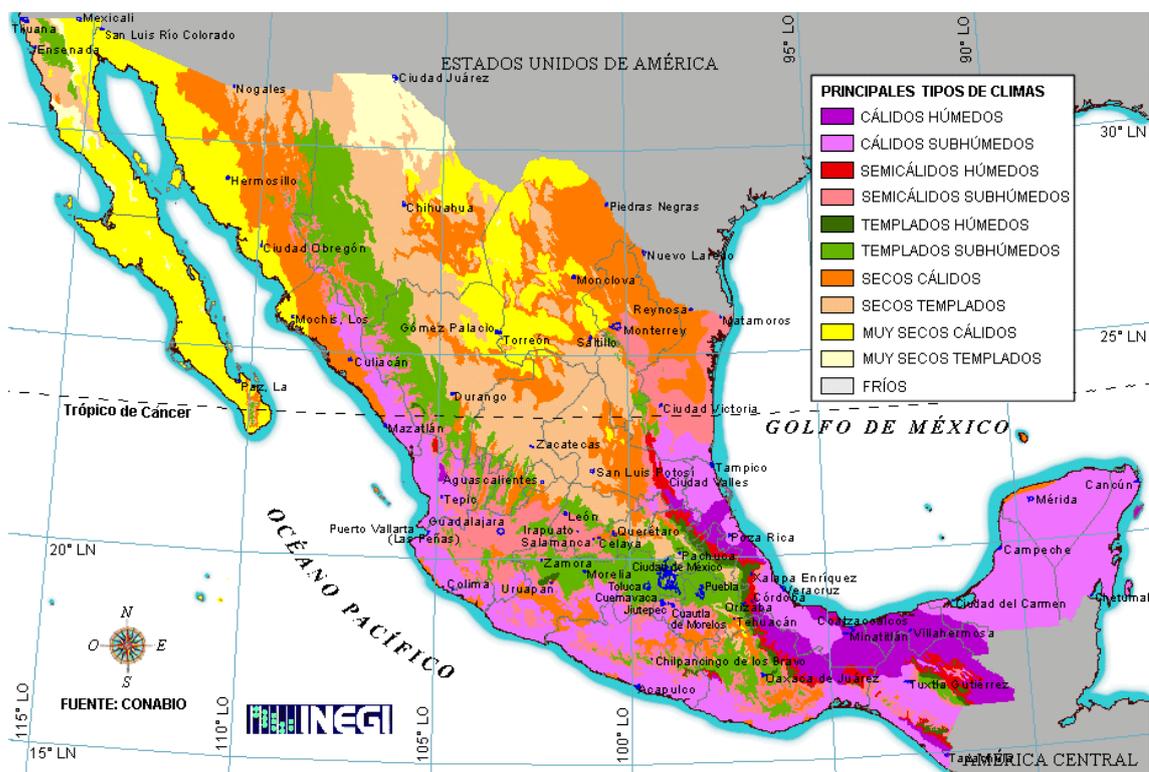


Fig. 1. Distribución climática en la República Mexicana según Köppen (INEGI, 1998).

Sin embargo, a pesar de la alta biodiversidad existente en México, en los últimos años se ha puesto en riesgo la permanencia de una gran cantidad de organismos, debido a diferentes actividades humanas, entre las que se pueden citar, la deforestación, el cambio de uso de suelo, el tráfico ilegal de especies, la contaminación, entre otros. Aunado a esto, al no conocer el total de especies existentes en el mundo, resulta complicada la realización de tareas destinadas al rescate de especies conocidas, y aún más de las desconocidas, lo que resulta en la extinción de un gran número de ellas.

Diversidad de Plantas

Debido a la orografía del territorio y a los diversos factores que se mencionaron, México es clasificado en cuatro regiones climáticas: árida, semiárida, tropical y templada, al tomar en cuenta, principalmente, la temperatura y la precipitación, distribuidas diferencialmente en todo el territorio (Tabla 2). Las zonas áridas y semiáridas se caracterizan por poseer comunidades vegetales como: pastizales, matorrales y bosques espinosos; se distribuyen principalmente en la parte norte del país, en los estados de Sonora, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Durango y Tamaulipas, encontrándose en menor medida en la parte centro y sur en los estados de Querétaro, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Guerrero. La zona tropical se distribuye principalmente en la parte sur del territorio, en la península de Yucatán y subiendo por la zona costera del Golfo y el litoral del Pacífico; y en cuanto a vegetación, posee bosques o selvas perennifolias, sub-perennifolias, caducifolias y sub-caducifolias. Finalmente, la zona templada se localiza en los sistemas montañosos del país, y poseen vegetación como bosques de pino, pino-encino, oyamental, zacatonal y matorrales esclerófilos. Además de los tipos de vegetación mencionados, se pueden encontrar en el territorio diversas comunidades de plantas hidrófilas distribuidas a lo largo de la República (González, 2003).

Tabla 2. Regiones climáticas de México (González, 2003).

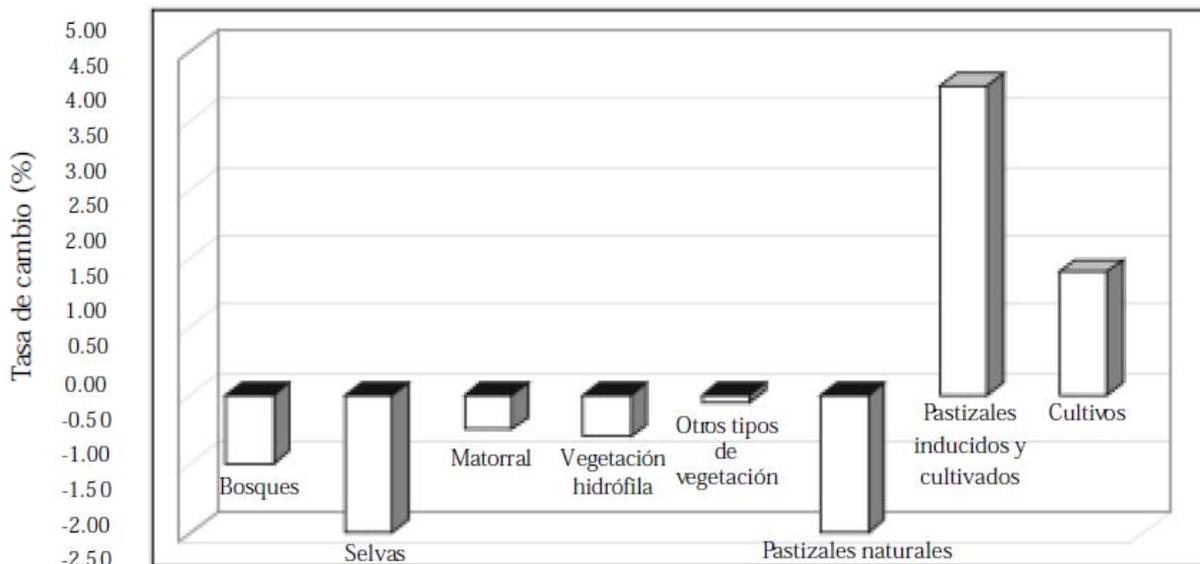
| Zona | Km ² | Porcentaje del Territorio |
|----------------|-----------------|---------------------------|
| Zona Árida | 560,000 | 19.9 |
| Zona Semiárida | 390,000 | 28.5 |
| Zona Tropical | 557,000 | 28.4 |
| Zona Templada | 460,000 | 23.4 |
| Total | 1,967,000 | 100.1 |

Como se menciona, México ocupa el quinto lugar en diversidad de plantas en el mundo, se ha estimado que cuenta con hasta el 10% de las especies de plantas existentes, con 23,006 especies incluidas en 2,826 géneros y 303 familias, de las cuales, las dicotiledóneas son el grupo más diverso con 17,311 especies (Villaseñor, 2004; Villaseñor y Ortiz, 2014). Lo anterior representa casi el 74% de la riqueza florística nacional (Villaseñor 2003); entre las familias más representativas, debido al número de especies, se encuentran Asteraceae (3021spp.), Fabaceae (1274spp.), Poaceae (1187spp.), Orchidaceae (1145spp.) y Cactaceae (946spp.)(Villaseñor, 2003).

Además de la gran diversidad de plantas que habitan en la República, otra característica que destaca de la biodiversidad de México es el grado de endemismos que presenta. Villaseñor (2003) señaló que aproximadamente 57% de las especies de plantas con flores son endémicas, de la misma manera el autor en 2004 reportó que el

7.8% de los géneros de plantas son endémicos (219). Estos valores pueden deberse a las características antes mencionadas del territorio, que al proveer sitios con características muy variadas y únicas, propician la especiación de los organismos y el origen de especies nuevas.

Sin embargo, a pesar de la gran riqueza florística existente en la república, se han mermado las poblaciones de plantas debido a diversas causas, entre las que se pueden enumerar: la conversión de vegetación nativa en campos destinados a la agricultura, la creación de pastizales inducidos y cultivados (41 millones de hectáreas) que ocupa 21% del territorio (Velázquez *et al.*, 2002); lo que conduce a una acelerada disminución de la cobertura vegetal natural (Gráfica 1). Además de esto, al existir la gran diversidad antes mencionada de flora, ésta se convierte en objeto de saqueo ilegal con el objeto de comerciar los ejemplares con distintos fines, ya sea para extracción de metabolitos secundarios, aprovechamiento maderable, uso ornamental, por mencionar algunos (CCA, 2005).



Gráfica 1. Tasa de Cambio de cobertura vegetal 1993-2000 (Velázquez *et al.*, 2002).

Es por esto que se han tomado diversas acciones para controlar la erradicación de especies vegetales. Una de las normas principales que rige la protección de especies en México es la NOM-059-SEMARNAT-2010, la cual enlista a los organismos tomando en cuenta cuatro categorías de acuerdo al grado de amenaza que presentan las especies, los cuales son: en protección especial (Pr), amenazada (A), en peligro de extinción (P) y extinta en estado silvestre (E). Actualmente la NOM-059-SEMARNAT-2010 enumera un total de 987 plantas, de las que sobresale la familia Cactaceae, al contar con un mayor número de especies (Tabla 3). Además de esta norma se puede mencionar a la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), que es un acuerdo internacional creado en 1975, del cual México es miembro desde 1991, que regula el comercio de especies, enlistándolas en tres apéndices de acuerdo a su grado de amenaza. Hoy en día CITES protege un total de

29,905 especies de plantas distribuidas entre los tres apéndices, incluyéndose en el Apéndice I las especies que se encuentran en peligro de extinción, y cuyo comercio es permitido solo en situaciones excepcionales, en el Apéndice II las especies que no necesariamente se encuentran en peligro de extinción pero se apunta, que de haber comercio excesivo pueda influir en la supervivencia de la especie, y en el apéndice III se incluyen especies que se encuentran protegidas al menos en un país que solicita un control en su comercio.

Tabla 3. Familias de plantas más numerosas en la NOM-059-SEMARNAT-2010

| | |
|---------------------|-----|
| Cactaceae | 276 |
| Orchidaceae | 188 |
| Arecaceae | 64 |
| Zamiaceae | 50 |
| Pinaceae | 30 |
| Bromeliaceae | 21 |

Como se deduce, la familia Cactaceae es de las familias de plantas más amenazadas de la República (NOM-059-SEMARNAT-2010), contrariamente al ser representativa de México, por lo que resulta imperativo realizar acciones que favorezcan su permanencia.

Generalidades de las Cactáceas

Las cactáceas son angiospermas nativas del continente americano; se han realizado suposiciones con la ayuda de análisis filogenéticos que ubican el origen de la familia hace 35 Ma en Sudamérica; sin embargo, la diversificación de la familia se ubica entre los 5 y 10 Ma durante el Plioceno, y ubica a México, Brasil y Los Andes como centros de diversificación de la familia (Arakaki *et al.*, 2011). Sin embargo es difícil comprobar estos resultados debido a la ausencia de evidencia fósil que compruebe su centro de origen.

Las cactáceas presentan una serie de características comunes, siendo la más importante la presencia de aréolas, las cuales son zonas meristemáticas por medio de las cuales se lleva a cabo la formación de estructuras a) somáticas como: hojas reducidas, tallos, espinas, glóquidas, raíces adventicias; y b) reproductivas, considerándose homólogas a las yemas axilares de las demás dicotiledóneas (Bravo-Hollis, 1978). Alrededor del 70% de las cactáceas se distribuyen en zonas áridas y semiáridas (Godínez y Ortega, 2007; Bravo-Hollis, 1978; Becerra, 2000), por lo que presentan una serie de modificaciones morfológicas que les hace posible adaptarse a estos ambientes secos; algunas de estas modificaciones son: el desarrollo de parénquimas, dando origen a la succulencia característica de las cactáceas; la reducción del área foliar, reemplazando las hojas por espinas, escamas o glóquidas, con el fin de no perder agua y defenderse de los depredadores; el engrosamiento de la cutícula;

producción de ceras epidérmicas (Bravo-Hollis, 1978); así como adaptaciones fisiológicas al poseer metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en el cual se lleva a cabo la apertura estomática durante la noche, período en el que se almacena CO_2 en las vacuolas de las células y de esta manera se mantienen cerrados los estomas durante el día para evitar la pérdida de agua, utilizando el CO_2 almacenado para llevar a cabo la fotosíntesis de manera eficiente, así como disminuir la fotorespiración (Taiz y Zeiger, 2010). Sin embargo, también existen cactáceas adaptadas a las selvas húmedas, selvas caducifolias, bosques templados, etc., como son las especies de los géneros *Pereskia*, *Hylocereus*, *Rhipsalis*, *Epiphyllum*, entre otras (Bravo-Hollis, 1978).

Diversidad de Cactáceas

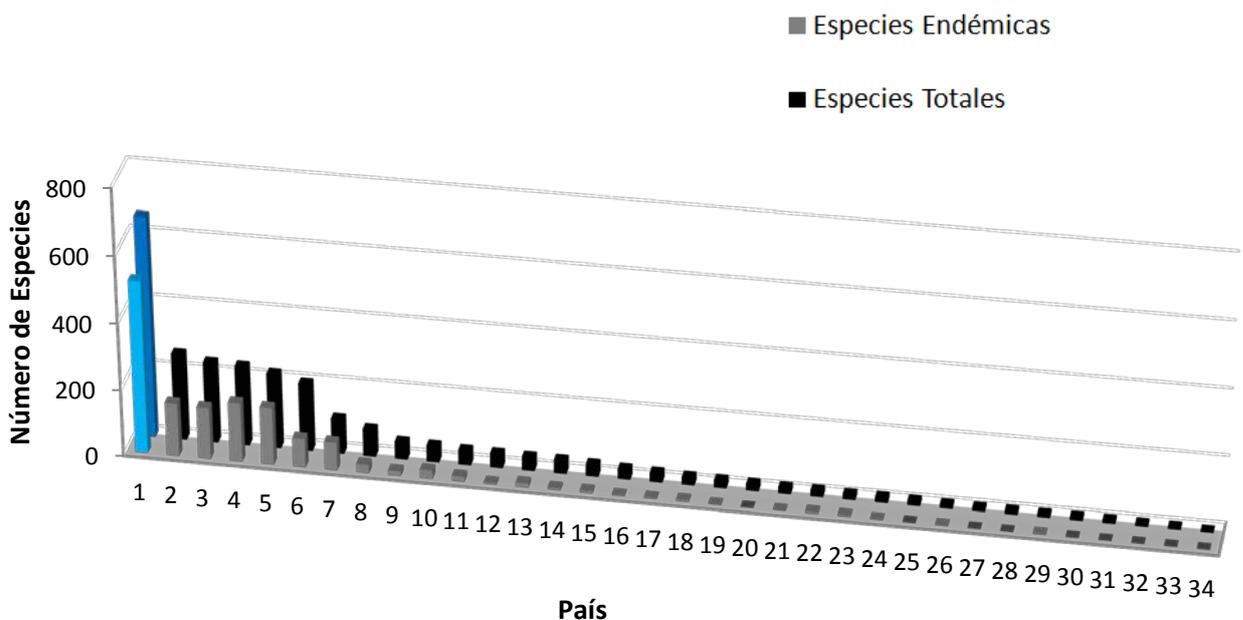
El Grupo Internacional de Sistemática de Cactaceae divide a la familia en 4 subfamilias: Pereskioideae, considerada la subfamilia más primitiva debido a la persistencia de hojas, en la que se presenta metabolismo CAM en los tallos y C_3 en las hojas; Maihuenioideae, que son cactáceas arbustivas endémicas de Argentina y Chile que presentan metabolismo C_3 ; Opuntioideae, cuyos tallos son articulados (cladodios) y presentan hojas en los tallos jóvenes; y Cactoideae, en la que se agrupan especies columnares, globosos y con diferentes hábitos: epífitos, rupícolas, arborescentes, geófitos, etc. (Anderson, 2001)(Fig. 2).



Fig 2. Subfamilias de la familia Cactaceae: **a)** Pereskioideae, **b)** Maihuenioideae, **c)** Opuntioideae y **d)** Cactoideae.

La familia Cactaceae se compone de cerca de 126 géneros y más de 1,900 especies (Arias *et al.*, 2012; Becerra, 2000) distribuidas desde la parte sur de Canadá hasta la Patagonia Argentina, además de habitar en distintas altitudes, desde el nivel del mar hasta los 4,500 m (Anderson, 2001). México, por sus condiciones de latitud, topografía y clima es el país que alberga la mayor cantidad de especies de esta familia, seguido por Argentina, Bolivia, Brasil, Perú y EUA (Bravo-Hollis, 1978; Hernández y Godínez,

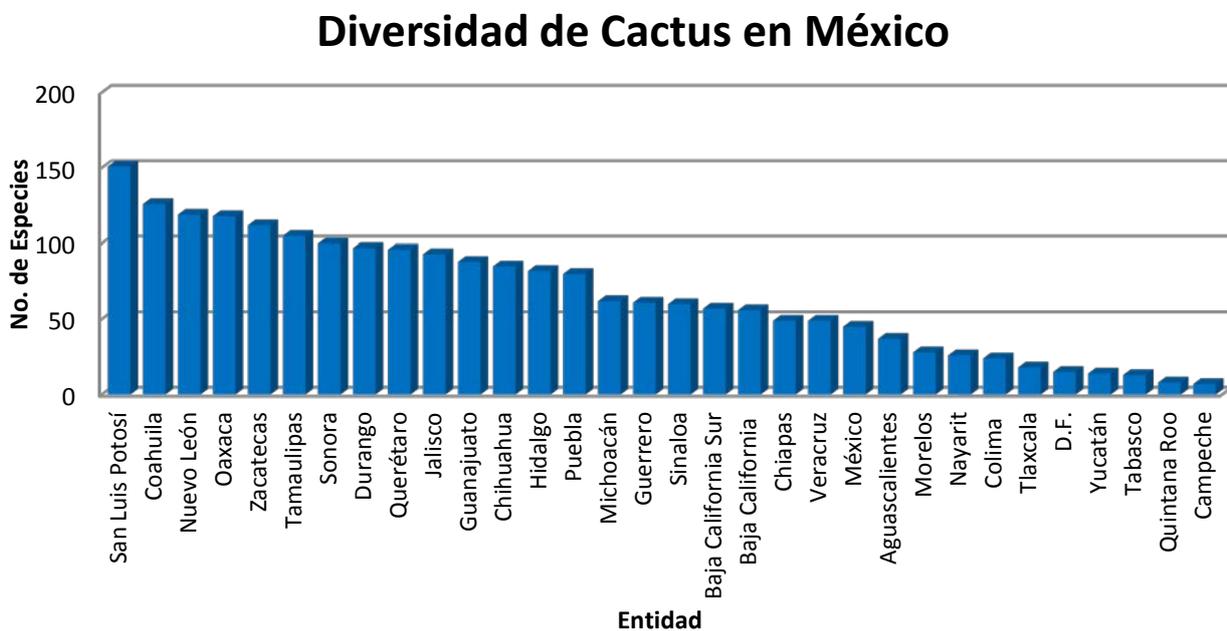
1994; Ortega y Godínez, 2006) (Gráfica 2). Existen diversos datos en cuanto a la diversidad de cactáceas en México, por ejemplo Guzmán *et al.* en el 2007 registraron un total de 1076 especies y subespecies de cactáceas incluidas en 68 géneros, mientras que Hernández y Godínez en 1994 reportaron la existencia de 563 especies distribuidas en 48 géneros, y a su vez Villaseñor en 2004 reportó 72 géneros; de igual manera cuenta con alto grado de endemismo, con 14 géneros y 517 especies endémicas, lo que representa el 30% y 78% de géneros y especies totales respectivamente, porcentajes superados por Brasil a nivel genérico con un 40% de endemismo (14 géneros) y por Chile a nivel específico con un 80% de endemismo (83spp.) (Ortega y Godínez, 2006). Además de esto se estima que México posee en su territorio alrededor del 36% de las especies de cactáceas totales, así como el 74% de los géneros, lo que convierte a México en un centro de concentración de cactáceas muy importante; de igual manera si sumamos a México con Argentina, Perú, Brasil, Bolivia, USA, Chile, Cuba, Costa Rica y Paraguay se cuenta con el 94% de todas las especies de cactáceas (Ortega y Godínez, 2006; Villaseñor, 2003), por lo que las acciones de conservación se deben llevar a cabo en estos países.



Gráfica 2. Distribución de cactáceas en el continente: **1 México**, 2 Argentina, 3 Bolivia, 4 Brasil, 5 Perú, 6 EUA, 7 Chile, 8 Paraguay, 9 Uruguay, 10 Cuba, 11 Ecuador, 12 Guatemala, 13 Costa Rica, 14 Venezuela, 15 Colombia, 16 Honduras, 17 Rep. Dominicana, 18 Haití, 19 Panamá, 20 Nicaragua, 21 Antillas Menores, 22 Puerto Rico, 23 Jamaica, 24 Antillas Holandesas, 25 Trinidad y Tobago, 26 El Salvador, 27 Belice, 28 Islas Vírgenes, 29 Bahamas, 30 Guyana, 31 Surinam, 32 Islas Caimán, 33 Guyana Francesa y 34 Canadá (Ortega y Godínez, 2006).

Las cactáceas se encuentran distribuidas mayoritariamente en ciertos puntos dentro del territorio Mexicano, poseyendo un mayor grado de diversidad y endemismo que otros, debido a diferentes factores como son climáticos, edáficos, orográficos, etc.; con esto, Hernández *et al.* en 1993 y Godínez y Ortega en el 2007 reportaron que la mayor diversidad de cactáceas se encuentra en los estados del norte del país

(Gráfica 3), de igual manera Hernández y Godínez en 1994 reportan que la mayor cantidad de especies se distribuye en el desierto Chihuahuense, lo cual concuerda con la Gráfica 3, ya que los estados con mayor diversidad se encuentran en el desierto chihuahuense, a excepción de Oaxaca, lo cual se explica debido a que el desierto chihuahuense pudo fungir como refugio durante la última era glacial, permitiendo una alta especiación, entre las que se incluyen a las cactáceas (Hernández y Bárcenas, 1995 tomado de Godínez y Ortega, 2007). Con estos datos, se sabe además que se tiene representado al 80% de las especies de cactáceas de México en solo 8 estados (Baja California Sur, Coahuila, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí y Sonora).



Gráfica 3. Distribución de cactáceas en México (Godínez y Ortega, 2007).

Importancia de las Cactáceas

Las cactáceas han jugado un papel importante a lo largo de la historia para los diversos pueblos que se han establecido a lo largo del continente. Se ha reportado su uso e importancia en diferentes códices y escritos de distintos pueblos prehispánicos, en los que se distinguen diferentes usos que se les da a plantas de los géneros *Echinocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Opuntia*, *Lophophora*, entre otras, a las que se les encontraron usos medicinales, alimenticios, simbólicos, culturales, religiosos e incluso ornamentales; importancia que incluso fue reportada por diversas expediciones que se realizaron al nuevo continente (Bravo-Hollis, 1978).

Inclusive en nuestros días, las cactáceas son de gran importancia para las diferentes culturas de nuestro país, ya que muchas de ellas son ampliamente utilizadas por distintos pueblos con fines alimenticios, utilizando los frutos, flores, tallos o semillas de

un gran número de especies, asimismo utilizando los tallos de plantas columnares principalmente para construir cercas vivas o utilizar la madera que producen para la construcción de viviendas y diversas artesanías, y de igual manera se les ha otorgado un valor ornamental por la belleza de su morfología y sus flores vistosas, e inclusive usos religioso-culturales al utilizar ciertos metabolitos de algunas cactáceas en distintas ceremonias (Casas, 2002; Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Tabla 4. Uso de algunas especies de cactáceas.

| Especie | Parte utilizada | Uso |
|---|---|---|
| <i>Cephalocereus columna-trajani</i> ¹ | Frutos y Tallo | Alimenticio, Forraje, Construcción, Ornamental ² |
| <i>Escontria chiotilla</i> ¹ | Frutos, Semillas, Flores, Tallo y Planta completa | Alimenticio ^{1,2} , Forraje, Bebidas, Cercas vivas y Leña |
| <i>Pachycereus marginatus</i> ¹ | Frutos, Tallo y Planta completa | Alimenticio, Forraje, Medicinal ^{1,2} y Cercas vivas |
| <i>Myrtillocactus geometrizans</i> ¹ | Frutos, Tallo, Flores y Planta completa | Alimenticio ^{1,2} , Forraje, Bebidas y Cercas vivas |
| <i>Stenocereus stellatus</i> ¹ | Frutos, Tallo, Flores, Semillas y Planta completa | Alimenticio ^{1,2} , Forraje, Bebidas, Leña y Cercas vivas |
| <i>Mammillaria haageana</i> ² | Planta completa | Ornamental |
| <i>Mammillaria carnea</i> ² | Frutos, Tallo y Planta completa | Alimenticio, Medicinal y Ornamental |
| <i>Opuntia sp.</i> ² | Frutos, Tallo y Planta completa | Alimenticio y Ornamental |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> ² | Tallo y Planta completa | Alimenticio y Ornamental |
| <i>Ariocarpis kotschoubeyanus</i> | Tallo y Planta completa | Antibacteriano ³ , Antifúngico ³ y Ornamental |

1: Casas, 2002; 2: Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010; 3: Rodríguez *et al.*, 2010

Importancia Ecológica de las Cactáceas

Además del uso que se les ha dado a las cactáceas a lo largo de la historia, éstas poseen una gran importancia ecológica en las zonas en las que se distribuyen naturalmente, ya que desarrollan un gran número de asociaciones biológicas con distintos organismos, por ejemplo todos los procesos de polinización, ya sea ornitofilia, quiropterofilia, entomofilia, etc., siendo la entomofilia el síndrome de polinización más común dentro de la familia, y en específico la polinización por abejas (Anderson, 2001); a su vez, en dispersión de semillas que se lleva a cabo por aves principalmente o puede darse por insectos como en plantas del género *Copiapoa* o por reptiles y mamíferos relacionados al género *Opuntia* (Anderson, 2001); asociaciones con otras plantas fungiendo como plantas nodrizas o como soporte de plantas epífitas o viceversa postrándose sobre otras plantas (*Hylocereus sp.*) (Bravo-Hollis, 1978).

Además de lo antes mencionado, las cactáceas al distribuirse principalmente en ambientes áridos y semiáridos son una fuente importante de alimento y agua para diversos animales con los que cohabitan, por ejemplo Wolf y Martínez (2002) determinaron la importancia del saguaro *Carnegiea gigantea* así como de otras especies columnares como suministro de agua para un gran número de poblaciones de

aves en el desierto Sonorense; de igual manera se ha reportado la importancia de las cactáceas en la sobrevivencia de otras especies vegetales debido a la protección que éstas proveen en contra de los herbívoros debido a la presencia de espinas (Rebollo *et al.*, 2002); e inclusive llegan a ser de utilidad para ciertos reptiles del género *Mabuya* como apoyo para su termorregulación (Vrcibradic y Duarte, 2002).

Es importante mencionar que debido a diferentes actividades humanas, toda la familia se encuentra en alto grado de amenaza, y al observar solo algunos ejemplos de las relaciones que existen entre estas plantas y otros organismos así como las interacciones ecológicas que se desconocen, es necesario tomar acciones para propiciar la permanencia de la familia y todas las interacciones que presentan.

Conservación

A pesar de la alta diversidad e importancia de la familia, ésta es a su vez uno de los grupos de plantas que se encuentra más amenazado, debido a diversos factores antropogénicos actuando en sinergia con ciertas características intrínsecas de la familia.

Dentro de los factores antropogénicos que afectan la supervivencia de las cactáceas, así como de otras poblaciones de plantas, se puede citar al cambio de uso de suelo con diversos fines, por ejemplo para producción agrícola, con 21, 901,600.26 Ha de superficie del territorio cultivadas siendo tan solo 4 cultivos (maíz, pastos, sorgo y frijol) los que representan un 61.6% de esta cifra (Siacon, 2012); a su vez también para ganadería, con estimaciones que reportan un 43% del territorio mexicano empleado con fines ganaderos, de los cuales se registró un sobrepastoreo de 47.6 millones de hectáreas en el año 2002 (24% del territorio) (SEMARNAT, 2013); sumándose el incremento de los establecimientos humanos dictado por el constante crecimiento poblacional, con registros para México de aproximadamente 112 millones de personas (INEGI, 2010) y con estimaciones para mediados del 2015 que alcanzan las 121 millones de personas (CONAPO, 2015).

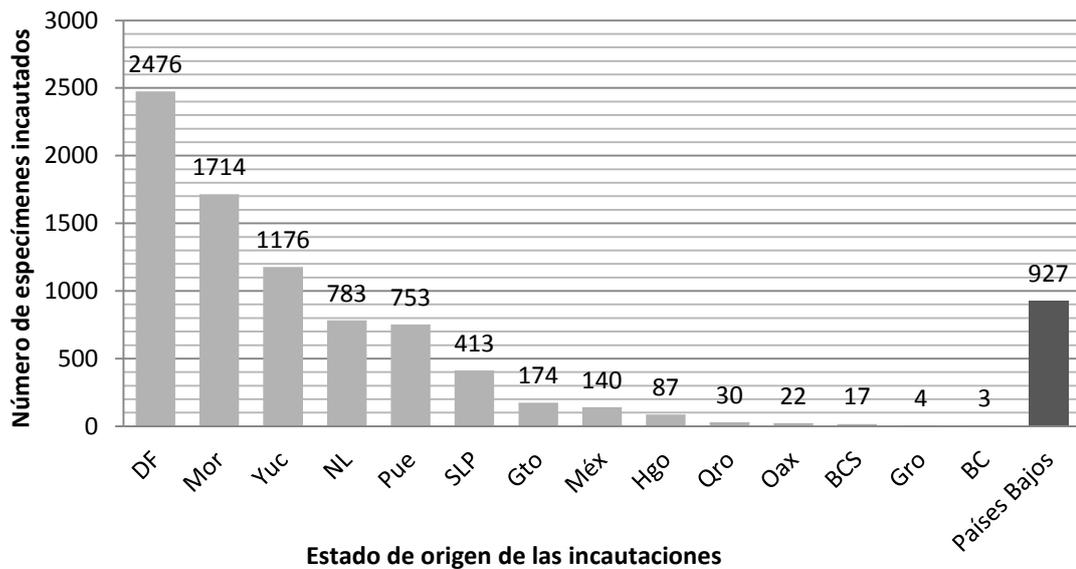
Otro factor que afecta en gran medida la supervivencia de las cactáceas es el tráfico ilegal de plantas, esto es debido a que los individuos son extraídos de sus ambientes naturales, por la belleza de sus formas así como sus flores llamativas (CCA, 2005). La familia ha llamado mucho la atención de coleccionistas de todo el mundo, debido a la rareza de su morfología, además al ser endémicas del continente americano, las hace altamente apreciadas por personas de otras partes del mundo así como por habitantes del lugar. Las cactáceas se llegan a comercializar hasta en \$1 000 USD por individuo (Tabla 5), y un gran número de ellos son extraídos de la naturaleza.

Tabla 5. Precio de cactáceas en el mercado negro (Hernández, 2006).

| Especie | Año de descubrimiento | Precio |
|-----------------------------------|-----------------------|--------|
| <i>Ariocarpus bravoanus</i> | 1992 | €60 |
| <i>Digitostigma caput-medusae</i> | 2002 | \$100* |
| <i>Aztekium hintonii</i> | 1992 | €70 |
| <i>Geohintonia mexicana</i> | 1992 | €100 |
| <i>Mammillaria luethyi</i> | 1996 | \$1000 |
| <i>M. sanchez-mejoradae</i> | 1992 | €50 |
| <i>Turbinicarpus alonsoi</i> | 1996 | €50 |
| <i>T. palianus</i> | 1998 | €50 |

§ = dólares estadounidenses; € = euros; Precios por individuo y por semilla*

Desde que comenzó el comercio de cactáceas a principios del siglo XVI (Becerra, 2000), esta actividad ha ganado popularidad alrededor del mundo, llevándose a cabo el comercio legal de cactáceas, así como de manera ilegal; en cuanto a este último, se estima que en el periodo de 1977-1984 se exportaron a los Estados Unidos de América cerca de 289 mil ejemplares de cactáceas en forma ilegal (Arias, 1993 citado por González, 2008), de igual manera se ha reportado que se llegan a comercializar entre 7 y 8 millones de especímenes de cactáceas anualmente en todo el mundo (CCA, 2005); se han realizado una gran cantidad de decomisos de ejemplares de cactáceas en los aeropuertos de diferentes estados de México, así como en países como Holanda, Estados Unidos, China, Japón, entre otros, por ejemplo decomisos de 1 180 cactáceas en puertos de EUA en el 2003, otro de 240 cactus en el aeropuerto Internacional de la Ciudad de México (Naranjo y Dirzo *et al.*, 2009; CCA, 2005), siendo un mayor porcentaje las incautaciones provenientes de México en comparación con las de otros países, y específicamente decomisos realizados en el Distrito Federal (Gráfica 4)(Robbins, 2003).



Gráfica 4. Decomisos de cactus por entidad federativa en el período 1996-2000 (Robbins, 2003).

Además de lo antes mencionado, otra amenaza que deben enfrentar las poblaciones de cactáceas en América, es la del cambio climático; debido a que al haber pequeños cambios en el clima se alteran por completo las áreas de distribución de un gran número de plantas (Tilman and Lehman, 2001), incluidas las cactáceas, siendo muchas de éstas microendémicas de una región debido a condiciones muy específicas de suelo, precipitación y temperatura por lo que al variar dichas condiciones climáticas dirigen a las poblaciones a la extinción. De esta manera, Téllez *et al.*, 2007 realizó un estudio sobre modelos de distribución potencial bajo supuestos en el cambio de temperatura y precipitación, por lo que menciona que el 95% de las cactáceas de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán podrían reducir su área de distribución para el año 2100 por efecto del cambio climático y que a su vez un 50% estarían extintas para la misma fecha. De igual manera Tilman y Lehman (2001) aseguran que el cambio climático provocará una mayor tasa de extinción que la degradación del ambiente (asentamientos humanos, ganadería, agricultura, entre otros).

Todo lo anterior sumado a las características de las cactáceas como son sus ciclos de vida largos, como es el caso de *Aztekium ritteri* (Gibson y Nobel, 1986 citado por González, 2008); bajas tasas de reclutamiento, áreas de distribución restringidas; por ejemplo, se ha visto que para *Ferocactus acanthodes* en un período de 18 años solo hubo nuevas plantas en 8 de esos años, con un total de 30 individuos reclutados en una hectárea (Jordan y Nobel, 1981, citado por González, 2008); de condiciones ambientales muy específicas y bajos índices de germinación (Hernández y Godínez, 1994), además de procesos naturales de herbivoría, granivoría y florivoría que afectan la reproducción de los individuos hace a las cactáceas una familia de plantas con un riesgo alto de extinción.

Por todo esto, se incluyen en la NOM-059-SEMARNAT-2010 un total de 276 especies de cactáceas en diferentes categorías de riesgo (Tabla 6), mientras que la CITES incluye a toda la familia en los Apéndices I y II, a excepción de *Pereskia* spp., *Pereskiaopsis* spp. y *Quiabentia* spp. Por ello se ha visto la necesidad de crear diferentes mecanismos mediante los cuales se pueda propiciar la supervivencia de especies, no solo de cactáceas, tanto en su hábitat como fuera del mismo, a lo que se le denomina conservación *in situ* y conservación *ex situ* respectivamente.

Tabla 6. Número de cactáceas mexicanas por categoría de riesgo (NOM-059-SEMARNAT-2010).

| Categoría | Cantidad | Ejemplos |
|--|-----------------|---|
| Probablemente extinta en el medio silvestre (E) | 0 | - |
| En peligro de extinción (P) | 32 | <i>Aporocactus flagelliformis</i> , <i>Mammillaria gaumeri</i> , <i>Mammillaria theresae</i> |
| Amenazada (A) | 87 | <i>Lophophora diffusa</i> , <i>Mammillaria erythrosperma</i> , <i>Cephalocereus senilis</i> |
| Sujeta a protección especial (Pr) | 157 | <i>Escobaria laredoi</i> , <i>Mammillaria capensis</i> , <i>Aztekium hintonii</i> , <i>Mammillaria hernandezii</i> |
| Total | 276 | |

La conservación *in situ* incluye la creación de Áreas Naturales Protegidas (ANP), que a su vez se divide en 6 categorías (Tabla 7), que son sitios naturales en cuyo territorio se registra la presencia de una gran diversidad de especies de animales, plantas, etc. que se encuentran amenazados y se realizan tareas para su protección, como el monitoreo y vigilancia de las especies que se encuentran dentro de ellas. La conservación *ex situ* engloba la creación de Jardines Botánicos, Zoológicos, Viveros, Bancos de Germoplasma, Unidades de Manejo Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), entre otras que se encargan del mantenimiento de diversas especies fuera de su hábitat para así favorecer su conservación, por ejemplo el Jardín Botánico, IB-UNAM, el zoológico Zoomat de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, la UMA de cocodrilos Itzam Kanac en Río Lagartos, Yucatán, el Banco de Germoplasma Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ubicado en Texcoco, Estado de México, por nombrar algunos.

Las ANP's en conjunto cubren solo el 12.9% del territorio mexicano (Tabla 7) (CONANP, 2013), dejando a un alto porcentaje de especies desprotegidas; aunado a esto, muchas ANP's son sitios separados uno de otro, lo cual no es funcional, debido a que la migración de organismos se ve disminuida; además de esto, no ha sido posible controlar el tráfico de especies dentro de las ANP's, ya que a pesar de la protección que representan, se dan casos de extracción de ejemplares, por ejemplo la extracción de 3,755 yucas del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas, Coahuila, la extracción de 55,512 hojas de palma xate de la Reserva de la Biosfera Montes Azules, Chiapas o la comercialización de varias partes de *Chamaedorea radicalis* proveniente de la Reserva de la Biosfera El Cielo, Tamaulipas (Naranjo y Dirzo *et al.*, 2009).

Tabla 7. Áreas Naturales Protegidas de México (CONANP, 2013).

| Categoría | Ejemplos | Número | Extensión (km²) |
|--|--|---------------|-----------------------------------|
| Reservas de la Biosfera | Isla San Pedro Mártir (Son), Sierra de Manantlán (Jal y Col) | 41 | 126,527.87 |
| Parques Nacionales | Tulum (QR), Grutas de Cacahuamilpa (Gro) | 66 | 13,985.17 |
| Monumentos Naturales | Bonampak (Chis), Cerro de la Silla (NL), Yagul (Oax) | 5 | 162.68 |
| Áreas de Protección de Recursos Naturales | Zona de Protección Forestal "La Frailesca" (Chis) | 8 | 44,400.78 |
| Áreas de Protección de Fauna y Flora | Cabo San Lucas(BCS), Ocampo(Coah) | 38 | 67,408.75 |
| Santuarios | Playa Mexiquillo (Mich), Playa Ceutla (Sin) | 18 | 1,462.54 |
| Total | | 176 | 253,947.79 |

Los jardines botánicos de México deben fungir como centros de conservación, investigación y educación, al resguardar ejemplares de especies vegetales de diversas zonas del país; actualmente México cuenta con 30 jardines botánicos que albergan en conjunto 4 826 especies de plantas, incluyendo 220 de cactáceas enlistadas en la NOM-059 (Caballero y Cortés, 2012). Sin embargo, a diferencia de las ANP's, los jardines botánicos hacen esfuerzos por proteger la sobrevivencia de las especies, no así sus interacciones ecológicas ni los servicios ecosistémicos que proporcionan, llegando a fallar incluso en las tareas de protección debido a la incidencia de actos vandálicos de algunos visitantes (observación personal).

Uno de los géneros de cactáceas más amenazados en México es *Mammillaria*, que debido a su gran diversidad y alto grado de endemismo, lo hacen muy llamativo para coleccionistas alrededor del mundo, además por sus requerimientos ambientales específicos, hacen que sea el género de la familia más amenazado (Tabla 8).

Tabla 8. Géneros de cactáceas más numerosos en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

| Géneros | # de Especies |
|----------------------|----------------------|
| <i>Mammillaria</i> | 109 |
| <i>Turbinicarpus</i> | 25 |
| <i>Echinocereus</i> | 20 |
| <i>Coryphantha</i> | 18 |
| <i>Ferocactus</i> | 10 |
| <i>Thelocactus</i> | 9 |

Descripción del género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* incluye la mayor cantidad de especies de la familia (ca. 200sp.)(Arias *et al.*, 2012), para México se registran 173 especies, de las cuales 148 se consideran endémicas, por lo que este género es considerado casi endémico del territorio mexicano (Guzmán *et al.*, 2007; Méndez-Larios, 2004).

El nombre *Mammillaria* proviene del latín *mamilla*, que significa tetilla, lo que hace referencia a los tubérculos presentes en las plantas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Son plantas pequeñas, simples o cespitosas, presenta tallos globoso-aplanados, globosos, cortamente cilíndricos o hasta ocasionalmente cilíndricos, generalmente erectos, rara vez rastreros o pendulosos, ramificándose por brotes basales o laterales y, a veces, por dicotomía apical, con jugo acuoso, semi-lechoso o lechoso. Tubérculos dispuestos en series espiraladas, más o menos numerosos, cónicos, cónico-cilíndricos, cónico-piramidales, piramidales o poliédricos, duros o suaves, sin surco areolar ni glándulas. Aréolas dimorfas, las espiníferas situadas en el ápice de los tubérculos, provistas de lana cuando jóvenes, con o sin cerdas; las floríferas situadas en la axila de los tubérculos, con lana, con cerdas o desnudas. Espinas generalmente diferenciadas en centrales y radiales, con ambas clases en la mayoría de las especies, pero, a veces, con tan solo centrales o solo radiales, variables en número, forma, dimensiones y color; aciculares, subuladas o aplanadas; rectas, curvas, retorcidas y en ocasiones, con la punta uncinada; dispuestas en las aréolas en formas diversas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Flores generalmente dispuestas alrededor del ápice, pequeñas hasta algo grandes; infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; pericarpelo normalmente sin escamas; tubo receptacular corto en la mayoría de los casos, normalmente también sin escamas, pero ocasionalmente con algunas cuantas muy pequeñas; segmentos del perianto escasos, dispuestos en una o varias series; anillo nectarial más o menos corto; estambres escasos, incluidos, insertos a partir del límite superior del anillo nectarial hasta la garganta; estilo delgado, incluido; lóbulos del estigma lineares (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

El fruto es una baya pequeña, claviforme o casi así, normalmente sin escamas, con el pericarpelo delgado, de color rosado purpúreo hasta escarlata, a veces verdoso, conserva adheridos los restos secos del perianto. Semilla pequeña, más o menos globosa, ovoide o piriforme; hilo basal o sub-basal, sin o con estrofiolo; micrópilo en un extremo del hilo, dentro del mismo o muy próximo al borde; testa con estructura reticulada y de color castaño más o menos oscuro hasta foveolada y de color castaño rojizo oscuro hasta negro; embrión ovoide o algo cilíndrico, muy succulento, con cotiledones reducidos; perisperma reducido hasta ausente (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

El género *Mammillaria* es diverso en cuanto a sus formas, por lo que todas las especies resultan de gran interés para coleccionistas. Entre ellas, *Mammillaria hernandezii* considerada con un alto valor ornamental, es de distribución restringida y se encuentra en riesgo de extinción, que son factores que inevitablemente motivan a coleccionistas a extraerla de sus poblaciones silvestres.

Mammillaria hernandezii Glass & Foster

Clasificación Taxonómica (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

| | |
|------------|---|
| Dominio | Eukaryota |
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Caryophyllales |
| Familia | Cactaceae |
| Subfamilia | Cactoideae |
| Tribu | Cacteae |
| Género | <i>Mammillaria</i> |
| Especie | <i>Mammillaria hernandezii</i> Glass & Foster |

Mammillaria hernandezii es una especie simple y hemigeofita que presenta tallos de 0.5-1.5 cm de alto por 2.5-3.5 cm de diámetro, cortamente napiformes, subglobosos; presenta tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, de 4-5.5 mm de largo y 5-6 mm de ancho, son cónicos verde oscuro con las axilas desnudas; aréolas situadas en el ápice de los tubérculos, algo depresas, ovales, de unos 2.5 mm de longitud y 1.7 mm de anchura, con lana blanca, presenta de 17-28 espinas radiales de 1-2 mm de largo, subuladas, pectinadas, radiadas y de color blanco (Fig. 3)(Arias *et al.*, 2012; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson, 2001).

Sus flores son de 1.4-2 cm de longitud y diámetro, de color rojo a púrpura, infundibuliformes, segmentos exteriores del perianto de 2.5 a 3 mm de anchura, verdosos, con el margen más claro; segmentos interiores del perianto alrededor de 17 o 18, con el ápice agudo hasta cuspidado o aristado, de color rojo a púrpura, con la línea media ligeramente más oscura; estambres de 8 a 10 mm de longitud; filamentos blancos; anteras de color amarillo; estilo de 12.5 mm de longitud, blanquecino; lóbulos del estigma de 1.5 mm de longitud, no extendidos, de color verde pálido; frutos verdes, redondos de 3 mm de diámetro parcialmente embebidos en las axilas (Fig. 3)(Arias *et al.*, 2012; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Mammillaria hernandezii presenta un mecanismo de dispersión de semillas denominado serotinia, el cual consiste en la creación de un banco de semillas entre los podarios de la planta madre (Fig. 3); dichas semillas se almacenan en la planta y son liberadas al haber condiciones ambientales favorables, al sufrir de herbivoría o al morir la planta. A su vez, dentro de la familia Cactaceae se encuentran diversos géneros que presentan especies serótinas como *Ariocarpus*, *Aztekium*, *Coryphantha*, *Lophophora*, *Obregonia*, *Pelecyphora*, entre otros y dentro del género *Mammillaria* se pueden mencionar además de *M. hernandezii*, a *M. theresae*, *M. pectinifera*, *M. saboae*, *M. solisioides*, *M. longiflora*, *M. sanchez-mejoradae*, *M. napina* entre otras (Santini, 2009). Se ha visto en algunas especies como *M. hernandezii* y *M. solisioides* que las semillas retenidas se mantienen viables por más de 8 años, lo cual resulta favorable para estas especies (Rodríguez-Ortega, 2008). Mientras se encuentran almacenadas, las semillas atraviesan procesos de hidratación y deshidratación, y a su vez al ser esta especie hemigeófito experimentan cambios de temperatura (estratificación) dentro del suelo. Este preacondicionamiento favorece la germinación y establecimiento de las semillas, así como la sobrevivencia de las plántulas (Santini, 2009; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006).

Este mecanismo de almacenamiento y dispersión se ha observado en diversas familias de plantas, por ejemplo en varias especies de pinos como *Pinus pinaster* y *P. halapensis* (Santos *et al.*, 2013) y en arbustos del género *Banksia* (Lamont y Enright, 2000).

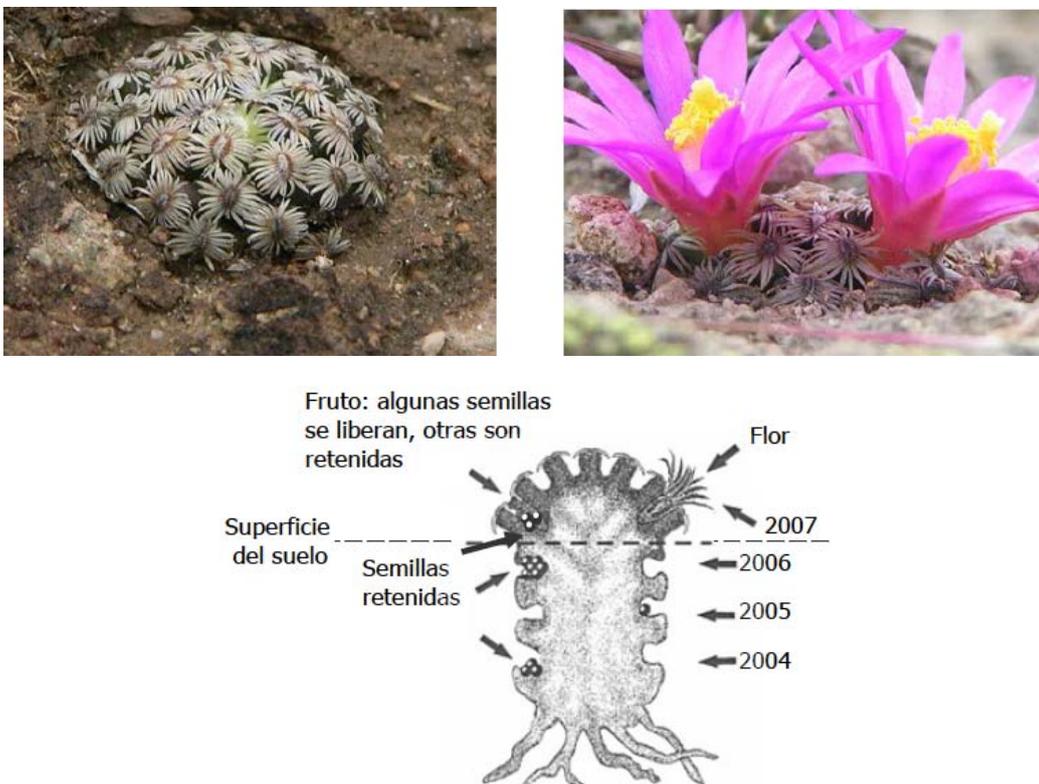


Fig 3. Arriba a la izquierda: Tallo de *M. hernandezii*; arriba a la derecha: Flores de *M. hernandezii* (Fotos: Delfín Montañana); Abajo: Almacenamiento de semillas durante diferentes años reproductivos (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006).

Se conocen 11 poblaciones de *Mammillaria hernandezii* (Peters y Martorell, 2001), las cuales se localizan en el estado de Oaxaca en las afueras de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán (Téllez, 2006; Ureta y Martorell, 2009), ocupando un área de tan solo 17.1 km² (Peters y Martorell, 2001). Crece en una zona semiárida a una altitud de 2300 msnm, asociada a praderas del pasto *Bouteloua* y se ha visto que presenta una mejor dinámica poblacional en ambientes con disturbio moderado, sin embargo el disturbio presente en las poblaciones de *M. hernandezii* ha pasado a ser catalogado como alto, por lo que se ve amenazada la permanencia de la especie (Ureta y Martorell, 2009). No existen reportes acerca de las interacciones ecológicas de esta especie y a la fecha solamente se utiliza como planta ornamental; sin embargo, no se descarta la posibilidad de poseer diversos usos así como su importancia ecológica al interactuar con otras especies de animales, plantas, hongos, entre otros.

Esta especie se encuentra incluida en el Apéndice II de CITES, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de Sujeta a Protección Especial y en la lista roja de la UICN en la categoría de en peligro de extinción (endangered). Hasta antes de la presente investigación, solo existía un único reporte de propagación de esta especie por Cultivo de Tejidos Vegetales (Lázaro, 2014), y se desconocen reportes de su propagación mediante otra técnica, ya sea por semillas, injertos o esquejes; solamente se conoce la existencia de ejemplares de esta especie en los Jardines Botánicos de El Charco del Ingenio (Guanajuato), Cadereyta (Querétaro), FES Cuautitlán-UNAM, Cassiano Conzatti (Oaxaca) (Caballero y Cortés, 2012), así como su propagación en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por medio de semillas, desconociendo la cantidad de plantas producidas (observación personal), sin embargo debido al grado de amenaza que presenta es necesario realizar estudios para su propagación rápida y a gran escala para favorecer su permanencia, por lo que el Cultivo de Tejidos Vegetales representa la mejor opción para propagar esta especie altamente amenazada.

Cultivo de Tejidos Vegetales

Debido a la creciente problemática que amenaza la sobrevivencia de las diferentes poblaciones de cactáceas, es necesario llevar a cabo estudios que deriven en procedimientos que ayuden a disminuir los riesgos de extinción, por lo que es urgente proteger las diferentes especies de cactáceas. Una parte básica es desarrollar mediante una investigación experimental protocolos de propagación eficientes con el fin de asegurar la permanencia de las especies.

Una alternativa que puede contribuir a la supervivencia de especies vegetales es la utilización del Cultivo de Tejidos Vegetales; esta ciencia es una rama de la Biología que permite explorar, y una vez superada la fase experimental, llegar a controlar el crecimiento, multiplicación y desarrollo de células y tejidos vegetales al utilizar soluciones nutritivas en un ambiente controlado y aséptico (George *et al.*, 2008). Esta

biotecnología explora condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro* (Loyola y Vázquez, 2006). Se basa en la totipotencialidad celular, la cual se refiere a la capacidad de las células de formar cualquier tejido de la planta al pasar por procesos de dediferenciación y diferenciación mediante el uso y manejo de distintos factores, entre ellos, los reguladores de crecimiento vegetal (fitoreguladores) adicionados a un medio nutritivo específico.

El proceso de Cultivo de Tejidos Vegetales con fines de regeneración y propagación se puede dividir en cinco fases (Trigiano y Gray, 2004):

Fase 0. Consiste en la elección de la planta que se utilizará como donadora de células o fragmentos de tejidos (explantes) para realizar su cultivo. Es recomendable elegir individuos en condiciones morfo-fisiológicas y fitosanitarias óptimas, que se encuentren sanos y sin signos de estrés; sin embargo, en investigaciones con especies en peligro de extinción pocas veces se dispone de esta elegibilidad, por lo que corresponde un nivel superior de responsabilidad y complejidad; además de la elección de la planta donadora, en esta fase se puede realizar el acondicionamiento de la planta que se utilizará mediante la aplicación de fungicidas, antibióticos y/o fitoreguladores para, respectivamente, disminuir la posibilidad de contaminación y/o propiciar una mejor respuesta morfogénica *in vitro*.

Fase 1. En esta fase se debe lograr el establecimiento aséptico de los cultivos mediante la aplicación de procesos de desinfección de los explantes para dar inicio a su proliferación. Además de superar los problemas de contaminación, comúnmente por hongos y bacterias, en esta etapa puede existir oxidación de los explantes, por lo que la Fase 1 resulta crítica para el cultivo *in vitro*.

Fase 2. Una vez establecidos los cultivos y eliminados los problemas de contaminación microbiana y oxidación, la siguiente fase consiste en encontrar experimentalmente condiciones de diferenciación celular y regeneración de estructuras organizadas, ya sean brotes, raíces, embriones o plántulas, para establecer la proliferación de las plantas. La regeneración y proliferación de plantas nuevas puede ser mediante tres vías de regeneración: organogénesis directa o indirecta; embriogénesis somática directa o indirecta; y activación de yemas preformadas. La organogénesis es el proceso mediante el cual se forman estructuras como raíces o tallos a partir del explante directamente (organogénesis directa) o a partir de una fase intermedia en la que se da la división desordenada de células que dan origen a una estructura denominada callo, a partir del cual pueden surgir órganos vegetales (organogénesis indirecta). De igual manera la embriogénesis somática es el proceso de formación de embriones sin llevarse a cabo la fusión de gametos, que surgen a partir del explante (directa) o a partir de callo (indirecta). La activación de yemas preformadas es un tipo de organogénesis en el que los nuevos órganos regenerados

surgen a partir de una zona meristemática preexistente. Esto se logra comúnmente mediante el empleo de reguladores del crecimiento vegetal (fitoreguladores), principalmente auxinas y citocininas, en alguna concentración precisa. Siendo tal concentración, distinta para cada tipo de explante y de especie que se desee propagar.

Fase 3. En esta fase, una vez que se tienen brotes, embriones y/o plantas regeneradas, se procede a realizar su individualización y preparación para pasar las plantas de un estado *in vitro* a *ex vitro* por lo que se realiza el enraizamiento de los brotes individualizados y la germinación de los embriones somáticos, de igual manera se lleva a cabo el crecimiento o elongación de las plantas hasta obtener un tamaño apropiado, así como la formación de un sistema radicular que faciliten su establecimiento *ex vitro*.

Fase 4. Se lleva a cabo el proceso de aclimatización, en el cual se trasplantan los nuevos individuos de una condición *in vitro* a *ex vitro*. Este es un paso crucial, ya que las plantas *in vitro* se encuentran en condiciones de alta humedad, alta disponibilidad de nutrientes y condiciones de temperatura y luz controladas, por todo esto las plantas no tienen una actividad fotosintética adecuada, considerándose plantas mixotróficas, pueden carecer de cutícula o estar poco engrosada; así como pueden tener estomas y raíces poco funcionales; por lo que deben adquirir estructuras, formas y funciones normales de manera gradual (Malda *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008).

Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

Para llevar a cabo el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*, es necesario proveer a las células vegetales con nutrientes, los cuales se suministran mediante el medio de cultivo; este medio consiste en una solución de sales que integran los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, el cual puede estar adicionado con vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono. Existen diferentes tipos de medios de cultivo, dependiendo los requerimientos de cada planta estudiada, los cuales varían en cuanto a la concentración de sales que contienen, así como la adición de otros nutrientes específicos; de esta manera se pueden citar el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), el medio Litz (1984), el medio Knudson (1922), entre otros. De igual manera, los medios de cultivo pueden ser semisólidos o líquidos, dependiendo del tipo de cultivo, así como de la especie de planta. Los medios semisólidos se obtienen al adicionar al medio un gelificante, este tipo de medio es ampliamente utilizado para el establecimiento de explantes de diversas plantas; a su vez, los medios líquidos se utilizan principalmente en el cultivo de células en suspensión, sin embargo, existe la posibilidad de utilizar medio líquido con algún material de sostén, sobre el que se colocan los tejidos vegetales, por ejemplo papel filtro o una red plástica, que permiten el suministro de medio nutritivo a las células vegetales (George *et al.*, 2008).

Además de suministrar a las células vegetales con nutrientes, es posible adicionar al medio de cultivo fitoreguladores, los cuales son hormonas vegetales exógenas a las plantas, que, al igual que las hormonas endógenas, regulan diversos procesos durante el desarrollo y la vida de las plantas. Existen muchas hormonas vegetales reconocidas, sin embargo, cinco grupos de ellas son las más conocidas y empleadas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, siendo las auxinas y las citocininas las más utilizadas en la regulación del crecimiento y la morfogénesis en Cultivo de Tejidos Vegetales, para el que se utilizan tanto hormonas naturales, como sintéticas (George *et al.*, 2008).

Las auxinas son hormonas que influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular; están involucradas en la formación de raíces secundarias, la regulación de tropismos, la dominancia apical y la diferenciación vascular. Algunos ejemplos de auxinas naturales empleadas en cultivo de tejidos son: ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB); y de auxinas sintéticas: ácido α -naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Jordán y Casaretto, 2006).

Las citocininas son hormonas esenciales en varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas; promueven la división celular, reducen la dominancia apical al activar las yemas laterales y retrasan la senescencia. Algunos ejemplos de citocininas naturales empleadas en cultivo de tejidos son: Zeatina y 2-isopenteniladenina (2-ip); y de citocininas sintéticas: 6-benciladenina (BA) y Kinetina (Jordán y Casaretto, 2006).

Por su parte, las giberelinas (GA) están involucradas en el crecimiento en altura de las plantas, en el desarrollo de la floración y la germinación de semillas en dormancia; el ácido abscísico (ABA) es el encargado de establecer la dormancia en las semillas y tiene un papel importante en la respuesta a estrés biótico y abiótico; y el etileno tiene la función de llevar a cabo la maduración de frutos y la abscisión de hojas (Jordán y Casaretto, 2006 y George *et al.*, 2008).

Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales

Dentro de las ventajas que ofrece propagar plantas mediante cultivo de tejidos vegetales, se encuentran: la obtención de un gran número de plantas en tiempos cortos y en áreas reducidas, además de que dichas plantas se encuentran libres de patógenos; a su vez, se puede propagar una especie con ciertas características de interés (tamaño o color de flores, mayor producción de metabolitos, frutos de mejor calidad, híbridos, entre otras características de interés), debido a que se obtienen clones de las plantas madre, con lo que se logra conservar dichas características que de otro modo se verían alteradas al producirse plantas por polinización cruzada, esto es de utilidad, por ejemplo, en la producción de plantas de ornato principalmente; de igual manera el cultivo de tejidos es de utilidad para la producción de metabolitos de

interés medicinal sin afectar la sobrevivencia de especies silvestres, como es el caso de la obtención del paclitaxel, medicamento usado en el tratamiento de carcinomas, a partir de árboles del género *Taxus* (Lenka *et al.*, 2012); asimismo, el cultivo de tejidos es de gran utilidad para la conservación de especies al existir la posibilidad de producir plantas nuevas a partir de pequeños fragmentos de tejido, con lo que se propicia la sobrevivencia de especies que incluso se consideran extintas en la naturaleza, como es el caso de *Mammillaria san-angelensis*, la cual fue propagada y reintroducida a su ambiente (Rubluo *et al.*, 2002) y a su vez con la posibilidad de conservar material vegetal en bancos de germoplasma (Loyola y Vázquez, 2006).

Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales ha sido ampliamente utilizado como una alternativa de propagación de especies vegetales con distintos fines, ya sea para producir especies de interés ornamental, alimenticio, medicinal, industrial o con fines de conservación. Esto es debido a que la demanda de especies es muy elevada debido al crecimiento poblacional, convirtiendo al cultivo de tejidos vegetales en una herramienta de gran utilidad para satisfacer dicha demanda de materia prima (Tabla 9).

Tabla 9. Cultivo de Tejidos Vegetales empleado para la propagación de diversas especies con diferentes usos.

| Especie | Fitoreguladores | Respuesta | Uso | Fuente |
|--|------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Agave sisalana</i> | BA 5 mg/l | Brotes | Industrial, Ornamental | Das, 1992 |
| <i>Agave victoriae-reginae</i> | 2, 4-D 0.5 mg/l | Callo y brotes | Ornamental Conservación | Martínez <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Azadirachta indica</i> | AIA 0.5 mg/l BA 1 mg/l | Embriones somáticos | Medicinal | Wen <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Capsicum annum</i> | BA 5 mg/l | Brotes | Alimenticio | Agrawal <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>Ceratozamia mexicana</i> var. <i>robusta</i> | Kin 1 mg/l 2, 4-D 1 mg/l | Embriones somáticos | Ornamental Conservación | Chávez <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Encyclia microtos</i> | AIB 2 mg/l BA 2 mg/l | 1.8 Brotes/ explante | Ornamental Conservación | Condemarin <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Gladiolus hybridus</i> | ANA 1 mg/l BA 2 mg/l | 33.15 Brotes/ Explante | Ornamental | Prasad and Dutta, 2006 |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | Zea 0.5 mg/l AIA 0.4 mg/l | 3 Brotes/ explante | Alimenticio | Fuentes <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Musa spp.</i> | BA 2 mg/l AIB 0.2 mg/l | Brotes | Alimenticio | Bhagyalakshmi & Singh, 1995 |
| <i>Platyserium bifurcatum</i> | ANA 1 mg/l BA 1 mg/l | 1-1520 Esporofitos | Ornamental | Teng, 1997 |
| <i>Persea americana</i> | BA 2 mg/l AIB 0.5 mg/l | Organogénesis | Alimenticio | Dalsaso y Guevara, 1989 |

| | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|--|----------------------------|
| <i>Rubus idaeus</i> | BA 2 mg/l GA ₃ 1 mg/l | Organogénesis | Alimenticio | Jones y Flores, 2007 |
| <i>Taxus mairei</i> | BA 2.5 mg/l | Brotes | Medicinal Reforestación Ornamental | Chang <i>et al.</i> , 2001 |

Kin: Kinetina; 2, 4-D:Ácido 2,4-diclorofenoxiacético ; BA: Benciladenina; AIA: 3-ácido indolacético; AIB: Ácido indolbutírico; Zea: Zeatina

Cultivo de tejidos en Cactáceas

El Cultivo de Tejidos Vegetales ha demostrado ser una herramienta útil para la propagación de cactáceas; el primer estudio sobre la propagación de cactáceas fue reportado en 1976 por Kolar y cols. en el que obtuvieron brotes vía indirecta del cactus mexicano *Mammillaria woodsii* al utilizar medio MS 50/100 con 2mg/l de AIA y 2 mg/l de Kin (Trejo *et al.*, 2005; González, 2008), y a partir de esta fecha, se han realizado diversos estudios tendientes a la propagación de cactáceas en diferentes géneros de esta familia, se han utilizado diferentes concentraciones de fitoreguladores así como diferentes medios y fuentes de explantes (Tabla 10).

Tabla 10. Estudios de propagación por Cultivo de Tejidos en cactáceas.

| Especie | Reguladores (mg/l) | Explante | Respuesta/explante | Fuente |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| <i>Ariocarpus bravoanus</i> | 0-0.5 BA/ 0-5 ANA | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | Brotes | Gómez, 2008* |
| <i>Astrophytum myriostigma</i> | 2 Kin | Secciones longitudinales de tallos | 14.5 Brotes | Santos <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Aztekium ritteri</i> | 0.1 BA 0.1 BA/ 0.01 ANA | Brotes de plantas germinadas <i>in vitro</i> | Brotes | Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992* |
| <i>Backebergia militaris</i> | 3 Kin | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | 4.4 Brotes directos | Fernández, 2014 |
| <i>Cephalocereus apicicephalium</i> | 3 BA | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | Brotes | Saucedo, 2006* |
| <i>Cereus peruvianus</i> | 4 2-4D/ 6 Kin | Segmentos transversales del hipocotilo | 17.3 Brotes indirectos | Aparecida <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Coryphantha minima</i> | 0.5 BA/ 0.1 ANA | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | 21.7 Brotes | Malda <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>C. retusa</i> | 2 BA | Secciones laterales de tallos | 10.4 Brotes | Ruvalcaba <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | 0.2 ANA/ 3 2iP | Callo de ápice | 8 Brotes | Manzo, 2010 |
| <i>Escobaria minima</i> | 0.008 ANA/ 5 BA | Secciones basales de | 4.25 Brotes | Giutsi <i>et al.</i> , 2002 |

| tallos | | | | |
|--|-------------------|---|----------------------------|--------------------------------------|
| <i>Hylocereus undatus</i> | 2 BA/ 1 Kin | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | Plántulas | Cuéllar <i>et al.</i> , 2006* |
| <i>Leuchtenbergia principis</i> | 10 BA/ 0.1 ANA | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | Brotes | Starling, 1985 |
| <i>Mammilaria albicoma</i> | 5 BA/ 0.1 ANA | Botones florales | 58 brotes totales | Wyka <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>M. bocasana</i> | 10 Kin | Brotes | 3.8 Brotes | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. coahuilensis var. coahuilensis</i> | 2 2iP | Callo de ápice | 9 Brotes | Manzo, 2010 |
| <i>M. densispina</i> | 6 Kin/ 2 AIA | Brotes | 5 Brotes | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. elongata</i> | 2 BA/ 0.18 ANA | Brotes | 1.3 Brotes | Papafotiou <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>M. hahniana</i> | 10 Kin/ 4 AIA | Brotes | 2.4 Brotes | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. mathildae</i> | - | Secciones laterales de tallos | 4.09 Brotes | García y Malda, 2009 |
| <i>M. orcutii</i> | 10 Kin/ 1 AIA | Brotes | 17.4 Brotes | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. pectinifera</i> | 6 Kin/ 4 AIA | Brotes | 4.5 Brotes | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. san-angelensis</i> | 6 AIA | Secciones de tallo | 26.7 Brotes | Rubluo <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Pelecypora aselliformis</i> | 1.98 BA | Secciones laterales del epicotilo | 4.97 Brotes | Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>P. strobiliformis</i> | 1 BA | Secciones apicales de plántulas | 136.3 Brotes | Pérez-Molphe y Dávila, 2002 |
| <i>Turbinicarpus laui</i> | 2 BA | Secciones longitudinales de plántulas | 269.8 Brotes indirectos | Mata <i>et al.</i> , 2001 |

Kin: Kinetina; 2-4D:Ácido 2,4-diclorofenoxiacético ; BA: Benciladenina; AIA: 3-ácido indolacético; 2iP: 2-isopentiladenina; *Citado por Ronquillo, 2009

Se ha visto que la mejor respuesta morfogénica se obtiene al adicionar al medio de cultivo concentraciones de citocininas relativamente altas en combinación con una menor cantidad de auxinas o en ausencia de estas (Tabla 10). Aunque existen algunos protocolos para la propagación de cactáceas mediante cultivo de tejidos, es difícil unificar un procedimiento de propagación, debido a que cada especie tiene requerimientos hormonales y nutritivos específicos, por lo cual es necesario generar protocolos de propagación específicos.

Como se observa en la Tabla 10, diversos han sido los estudios que se han llevado a cabo para la propagación de cactáceas amenazadas y que a su vez resultaron de utilidad en el apoyo a la sobrevivencia de especies con algún grado de amenaza.

Justificación

Mammillaria hernandezii es un cactus endémico de Oaxaca, en donde ocupa un área de tan solo 17.1 km² con 11 poblaciones fuera de cualquier zona protegida. Debido a diversas amenazas de origen antrópico como extracción ilegal, cambio de uso de suelo, ganadería, cambio climático, así como factores naturales e intrínsecos de la especie como bajos índices de reclutamiento, tasas de crecimiento lentas y requerimientos ambientales específicos hacen que *M. hernandezii* se encuentre en peligro de desaparecer. Actualmente se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) en la categoría de Sujeta a Protección Especial (Pr). Al ser una especie de crecimiento lento y nula o muy baja producción de brotes laterales al presentar tallos simples, es necesario utilizar métodos de propagación que mejoren la producción de nuevos individuos. El Cultivo de Tejidos Vegetales representa una manera de favorecer su sobrevivencia, ya que hace posible la propagación masiva de la especie sin necesidad de contar con semillas, además de permitir almacenar material vegetal para generar un banco de germoplasma, ayudando de esta manera a favorecer la permanencia de las poblaciones de *M. hernandezii*.

Objetivos

General

Establecer condiciones de cultivo *in vitro* para dirigir el desarrollo de las células a la regeneración de plantas de *Mammillaria hernandezii* que contribuyan a su conservación.

Particulares

Determinar condiciones para la germinación *in vitro* de semillas de *Mammillaria hernandezii*.

Lograr el establecimiento *in vitro* de explantes de *Mammillaria hernandezii*

Explorar las respuestas morfogénicas de fragmentos de tallo y raíz.

Describir el efecto de auxinas y citocininas en la regeneración de órganos y plantas como pruebas sobre el control del desarrollo celular.

Lograr la aclimatización en invernadero de plántulas regeneradas *in vitro*.

2. Materiales y Métodos

Material Biológico

Semillas

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM. Para la germinación se utilizaron tres lotes de semillas (producto de polinización cruzada) con cifras que variaron entre 20 (lote 1), 127 (lote 2) y 64 (lote 3) semillas. Los lotes 1 y 3 fueron proporcionados por el M. en C. Octavio González Caballero, y el lote 2 proporcionado por Omar González Zorzano, Área de Colecciones del Jardín Botánico del IB-UNAM. El lote 1 fue obtenido en el 2011 de un fruto de una planta cultivada en condiciones de invernadero (Fig. 4) y sembrado una semana posterior a su colecta. El lote 2 se obtuvo en el 2012 de diversos frutos de otra planta cultivada en invernadero mezclado con semillas almacenadas entre los tubérculos de la planta y fue sembrado 8 días posteriores a su colecta. El lote 3 proveniente de frutos de una tercera planta cultivada en invernadero colectados en 2011 y sembrados 2 años después.

Plantas adultas

Para el cultivo de estructuras somáticas de plantas se utilizaron dos individuos adultos, diferentes a los ejemplares donadores de semillas, de aproximadamente 2 cm de altura por 2 cm de diámetro propagados en invernadero y donados por la Sociedad Mexicana de Cactología A.C. (Fig. 5).



Fig. 4. Fruto con semillas (S) en su interior colectado de una planta de *M. hernandezii* cultivada en invernadero.



Fig. 5. Planta adulta de *M. hernandezii*, fuente de explantes somáticos utilizados.

Desinfección y medio de cultivo

Las semillas de *M. hernandezii* se colocaron en una solución con detergente antibacterial al 10% (v/v) por 10 min, seguido de una solución de ETOH 70% (v/v) por 1 min, enseguida se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) 30% (v/v) por 20 min y finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua

destilada esterilizada en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Una vez concluido el proceso de desinfección se colocaron las semillas en un frasco con agua destilada esterilizada en refrigeración (5°C) por 2 días.

Una vez transcurrido el tiempo de hidratación y estratificación, se sembraron las semillas de manera individual en frascos que contenían medio Murashige y Skoog (1962), con las sales inorgánicas al 50% y compuestos orgánicos al 100% de su concentración (MS 50/100), 30 g/l de sacarosa [se ajustó a pH 5.7 con NaOH y HCl en concentración 0.1-1 M] y se adicionaron 3.5 g/l de Gellan Gum como gelificante. De las semillas del lote 1 se colocaron 10 en fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad y otras 10 en oscuridad para determinar si la especie era fotoblástica positiva o negativa. Mientras que todas las semillas de los lotes 2 y 3 se mantuvieron en fotoperiodo. Debido a la baja germinación obtenida en el lote 2, se sembraron las semillas en un medio MS 50/100 adicionado con 3 mg/l de GA₃.

Para la desinfección de las plantas cultivadas en invernadero se separó el tallo de todo el sistema radicular (Fig. 6), para tratar por separado cada fragmento; a la parte aérea se le recortaron las espinas, enseguida se realizó un lavado en un flujo de agua directamente para eliminar partículas de polvo; después, se colocó en una solución de jabón antibacterial al 10% (v/v) 20 min, seguido de un período de 1 min en una solución de etanol al 96% v/v, una vez transcurrido el tiempo se procedió a colocar el tallo en una solución que contenía 2 g/l de Benomil®, así como de Cuprimicin® esterilizados por 40 min, enseguida pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 20% v/v por 20 min; en una solución estéril de 250 mg/l de cefotaxima 40 min, para concluir con 3 enjuagues con agua destilada esterilizada en condiciones asépticas. El explante proveniente de la raíz, fue desinfectado con los mismos compuestos que la parte aérea; con 1h de permanencia en cada una de las soluciones de Benomil®/Cuprimicin® y Cefotaxima; y 30 min en la solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico).



Fig 6. Planta adulta cultivada en invernadero, fuente de los explantes utilizados para la investigación, la línea punteada muestra el corte que se realizó para separar la raíz e iniciar la desinfección.

Plantas adultas. Obtención de explantes e Inducción

Una vez realizada la desinfección, se procedió a realizar un corte transversal del tallo para separar ápice y base (1 cm c/u). De la parte superior de la base se realizó un corte transversal para obtener una sección de 5 mm de espesor de la cual se extrajo la médula (compuesta por la médula *sensu stricto*, junto con tejido de su periferia) y se obtuvieron 4 fragmentos de tubérculos. El fragmento que quedó de la base, fue dividido longitudinalmente para así obtener dos secciones laterales (Fig. 7). Cada fragmento se colocó en medio MS 50/100 gelificado con 4.5 g/l de Gellan gum, adicionado con diferentes concentraciones de ANA/BA (mg/l): Dos explantes apicales en medio adicionado con 0/3 y 0/2 respectivamente (Fig. 8); 2 explantes provenientes de la médula en medio adicionado con 0.5/3; 4 explantes laterales, dos de los cuales se sembraron en medio adicionado con 0.5/3 y otros 2 en medio con 0/3 y 0/2 respectivamente; y 8 explantes de tubérculos, que se sembraron dos explantes por tratamiento en 0/2, 0/3, 0.5/2 y 0.5/3. Los cultivos fueron incubados en fotoperiodo de 16h luz y 8 oscuridad.

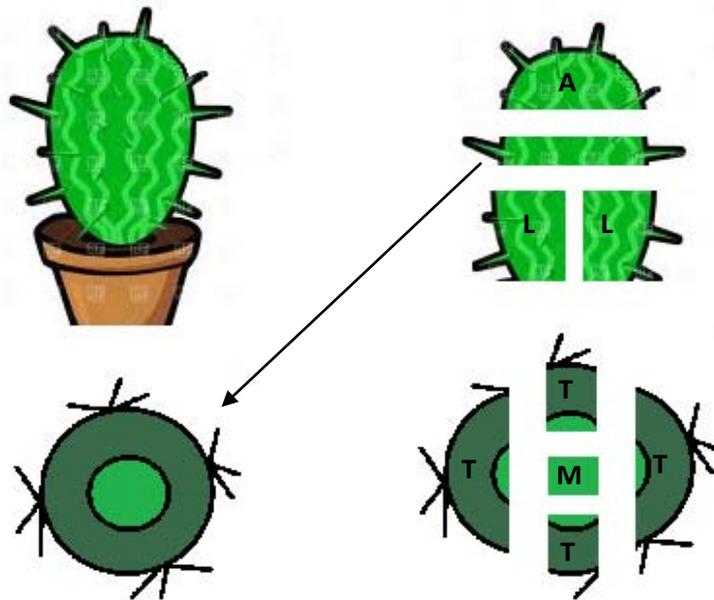


Fig 7. Proceso de obtención de explantes: Apicales (A), Laterales (L), provenientes de la Médula (M) y Tubérculos (T) a partir de plantas cultivadas en invernadero de *M. hernandezii*.

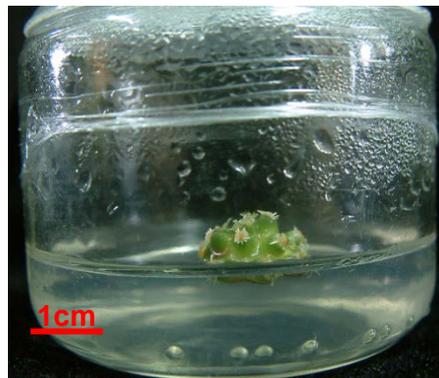


Fig 8. Explante apical establecido asépticamente en medio MS 50/100 adicionado con 0/3 mg/l de ANA/BA.

Plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas. Obtención de explantes e Inducción morfo genética

Para la inducción de los explantes de plántulas se utilizó medio MS líquido 50/100 con puentes de papel filtro y 5 combinaciones diferentes de los reguladores de crecimiento 6-benciladenina (BA) y ácido α -naftalenacético (ANA) (Tabla 10); se colocaron 25 ml de medio en c/u de 10 frascos.

Tabla 10. Concentraciones de fitoreguladores (ANA/BA) empleadas para la inducción de *M. hernandezii* (Muestra 1).

| ANA (mg/l) | BA (mg/l) |
|------------|-----------|
| 0 | 2 |
| 0.5 | 2 |
| 1 | 2 |
| 0 | 3 |
| 0.5 | 3 |

Muestra 1. A partir de 5 plántulas germinadas *in vitro* de 6 meses de edad y alrededor de 4 mm de altura del tallo se les realizó un corte transversal a la mitad del tallo para separar el ápice de la base (hipocótilo), la cual conservó las raíces (Fig. 9); el corte se llevó a cabo bajo inmersión, empleando una solución antioxidante que contenía ácido ascórbico y cítrico c/u 200 mg/l; se colocaron el ápice y la base de cada plántula por separado en medio MS 50/100 líquido con puente de papel, de esta manera se sembraron 10 explantes en 5 tratamientos hormonales (Tabla 10). Al transcurrir 6 meses en el medio original se procedió a realizar subcultivos en medio MS 50/100 sin reguladores de crecimiento adicionado con agar bacteriológico 9 g/l.

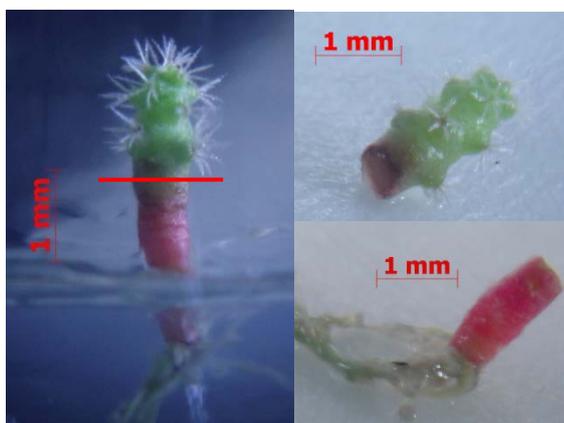


Fig 9. Obtención de los explantes apical y basal a partir de plántulas germinadas *in vitro* de *M. hernandezii*.

Muestra 2. Para la comprobación de los resultados obtenidos, se colocaron 5 nuevas plántulas germinadas *in vitro* de la misma edad y talla aproximada en las concentraciones hormonales que produjeron mejores resultados en la muestra 1 (Tabla 11), para lo que se utilizó medio MS 50/100 adicionado con 4.7 g/l de Gellan gum para evitar posibles problemas de hiperhidratación. Los explantes se mantuvieron

en inducción por un mes (Mata *et al.*, 2001) para después pasarse a medio MS 50/100 sin fitoreguladores, con carbón activado 0.5 g/l y agar bacteriológico 9 g/l.

Tabla 11. Concentraciones de ANA/BA empleadas para la comprobación de los resultados (Muestra 2) del primer ensayo de inducción (Muestra1).

| ANA (mg/l) | BA (mg/l) |
|------------|-----------|
| 0 | 2 |
| 0.5 | 2 |
| 0 | 3 |
| 0.5 | 3 |

Muestra 3. Se tomaron 30 de las plántulas regeneradas a partir de las muestras 1 y 2 de aproximadamente 1 año de edad y de 5-8 mm de longitud. Los explantes se sometieron a diferentes combinaciones de fitoreguladores (Tabla 12) para evaluar su respuesta morfogénica; a las plántulas se les removió la raíz y se realizó un corte transversal separando ápice y base. Se procedió a sembrar cada tipo de explante (ápice, base y raíz) en medio MS 50/100 líquido con puente de papel. Transcurridos 3 meses de inducción se subcultivaron los explantes a medio MS 50/100 sin reguladores de crecimiento; carbón activado 0.5 g/l; y agar bacteriológico 9 g/l, con el fin de permitir la respuesta a los fitoreguladores empleados, así como disminuir el potencial osmótico del medio y favorecer la formación de plantas bien consolidadas.

Tabla 12. Concentraciones de fitoreguladores empleadas para la inducción de explantes de plántulas regeneradas de *M. hernandezii* (Muestra 3).

| ANA (mg/l) | BA (mg/l) |
|------------|-----------|
| 0 | 0 |
| 0 | 1 |
| 0 | 2 |
| 0 | 3 |
| 0.5 | 1 |
| 0.5 | 2 |
| 0.5 | 3 |
| 0.1 | 3 |

Tanto los medios de cultivo, como soluciones de fungicidas, antibióticos y antioxidantes se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C y 1.5 kg/cm² de presión por 17 min.

Enraizamiento y Aclimatización

Los nuevos brotes formados, al alcanzar una talla de 3 mm a 5 mm de altura se separaron del explante original y se sembraron en medio MS 50/100; 0.5 g/l de carbón activado; y 9 g/l de agar bacteriológico para promover su enraizamiento.

Para la aclimatización, 45 plántulas regeneradas de 0.7 a 2 cm de longitud se enjuagaron con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo, enseguida se lavaron con jabón comercial por un minuto para eliminar restos de medio de cultivo y carbón activado persistentes en las plantas, para luego ser enjuagadas en una solución de yodo (1 ml/l) por un minuto. Enseguida, las plántulas se dejaron reposar por 24 h sobre papel. Transcurrido este tiempo, se plantaron en una charola con una mezcla de tepojal, tierra negra, agrolita, sphagnum y tezontle en proporción 5:3:1:1:1 (Grácidas, 2011, comunicación personal) que fue previamente cernida y esterilizada en un horno de microondas por 15 min.

La charola con las plantas en proceso de aclimatización se mantuvo en un cuarto ventilado y con luz natural indirecta por 5 meses; los primeros 3 meses se conservó la charola tapada para evitar la pérdida de humedad; con riego 1 vez por semana mediante la utilización de un aspersor, para el 4^o mes se destapó la charola y se incrementó la frecuencia de los riegos a 2 veces por semana y ya para el quinto mes se redujo la frecuencia de los riegos a 1 vez por semana. Se evaluó la sobrevivencia de las plantas a los 6 meses de iniciado el proceso de aclimatización.

3. Resultados y Discusión

Germinación

Las semillas de *M. hernandezii* presentaron un tamaño de aproximadamente 1 mm de longitud por 0.5 mm de ancho y pesaron en promedio 0.306 mg, son de color negro, piriformes y con la testa foveolada (Fig. 10), características similares se presentan en varias especies del género *Mammillaria*, por ejemplo *Mammillaria tetrancistra*, *M. longiflora*, *M. guelzowiana* y *M. saboae*, entre otras que de igual manera presentan ornamentación de la testa foveolada (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

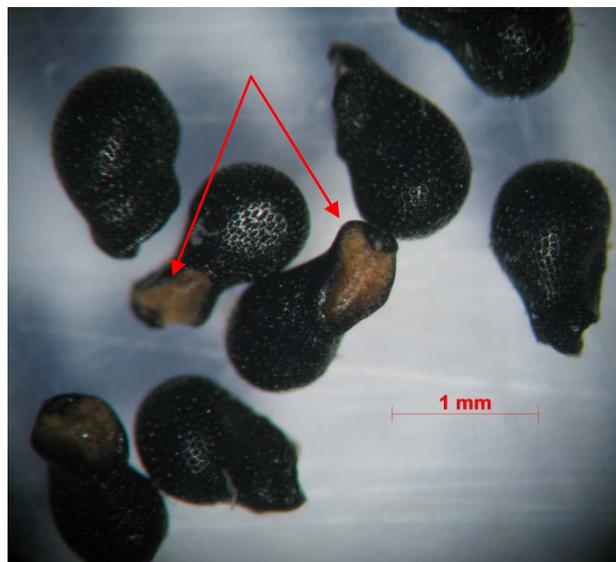
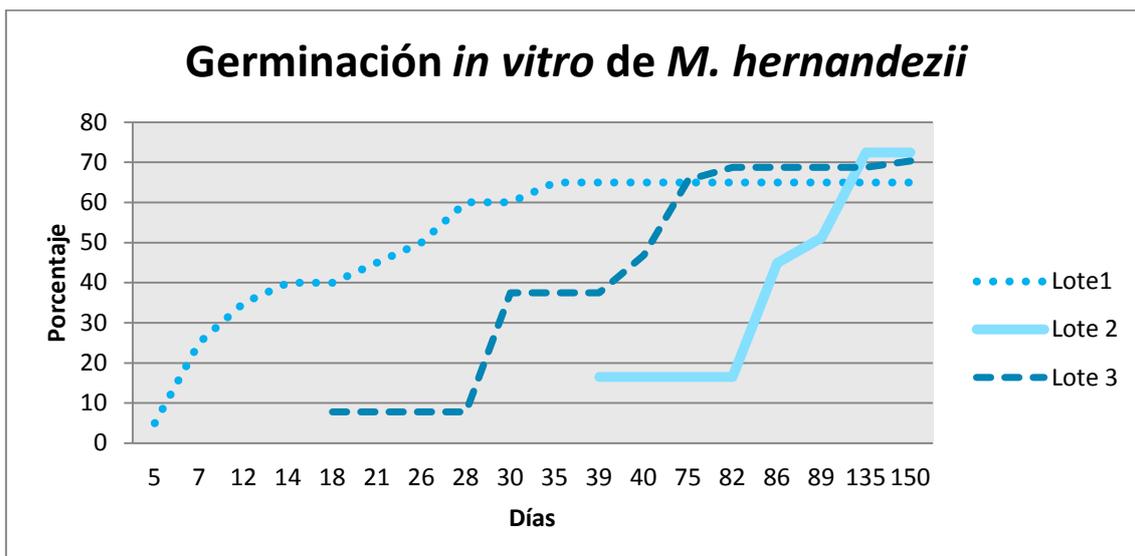


Fig 10. Semillas de *M. hernandezii* de aproximadamente 1mm de longitud, se observa la ornamentación de la testa (foveolada), así como el hilo (flechas). 35

El método de desinfección empleado para las semillas fue efectivo, ya que ninguna de las semillas en los frascos de cultivo presentó contaminación; al comparar la desinfección empleada por Lázaro (2014) para la misma especie, se observa que a pesar de que la desinfección utilizada en la presente investigación fue menos severa, resultó igual de efectiva. La germinación obtenida fue de 65%, 16% y 70% de los Lotes 1, 2 y 3 respectivamente en fotoperiodo. La germinación comenzó en el día 5 después de la siembra y se observó la germinación de algunas semillas hasta los 150 días, tomándose como indicador, la emergencia de la radícula (Gráfica 5). El porcentaje de germinación del Lote 2 mejoró a 72% a los 53 días después de pasar las semillas a medio de cultivo fresco adicionado con 3 mg/l de GA₃; en los lotes 1 y 3 no se probó la adición de giberelinas debido a que se consideró que se habían logrado altos índices de germinación y además de que se tomó en cuenta la germinación asincrónica de las semillas de la especie, por lo que las semillas permanecieron en los frascos de cultivo para su posible germinación, la cual al transcurrir un año no ocurrió, probablemente debido a que las semillas eran inviables ó sufrieron daño al momento de desinfectarlas.



Gráfica 5. Porcentajes de germinación de semillas de *M. hernandezii* en fotoperiodo de 16h luz, divididas en 3 Lotes: Lote 1 (20 semillas), Semillas de un fruto maduro; Lote 2 (127 semillas), Semillas provenientes de una mezcla de semillas de frutos maduros y del banco de la planta madre; y Lote 3 (64 semillas), Semillas de un año de edad provenientes de frutos maduros.

La diferencia en los porcentajes de germinación obtenidos inicialmente de 65%, 16% y 70% de cada lote probablemente se vio influenciada por el origen de las semillas, ya que los lotes 1 y 3 fueron obtenidos a partir de frutos maduros de *M. hernandezii*, mientras que el lote 2 se obtuvo de una mezcla de semillas almacenadas en la planta madre y semillas provenientes de frutos maduros. Es posible que algunas semillas se encontraran en dormancia, la cual se rompió mediante la adición de giberelinas, con lo que su germinación aumentó de 16% a 72%, con lo que se observó

germinación de semillas a los 3 días después de su siembra en medio con giberelinas; de igual manera, el paso de las semillas a medio de cultivo fresco pudo propiciar la germinación al proveer a las semillas mayor disponibilidad de agua originando un segundo proceso de hidratación.

Porcentajes de germinación similares fueron reportados por Santini en el 2009, en un cultivo no aséptico en el que obtuvo 76% de germinación en 35 días para *M. hernandezii* en cajas de Petri con papel filtro humedecido y fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, al someter semillas de 8 meses de edad a 4 ciclos de hidratación (4 días) y deshidratación (2 días), para semejar lo que ocurre en el banco de semillas de la planta madre y así tratar de incrementar la cantidad de semillas germinadas (priming). Se puede notar que el porcentaje reportado por Santini (2009) es muy parecido al obtenido en el presente estudio. Posiblemente los ciclos de hidratación y deshidratación empleados por Santini favorecieron la germinación de las semillas, ya que al pasar por el proceso de priming, se lleva a cabo la movilización, síntesis y degradación de proteínas que promueven la germinación (Santini y Martorell, 2013). En la presente investigación se obtuvo un 65, 16 y 37% de germinación en los lotes 1, 2 y 3 respectivamente a los 35 días de su siembra, y es posible que si se realizara un priming a las semillas utilizadas, los porcentajes y la velocidad de germinación se podrían ver incrementados. De igual manera, Rodríguez-Ortega *et al.* (2006) reportaron 87% de germinación para la misma especie en 31 días utilizando cajas de Petri con agar al 1% (10g/l); este alto porcentaje de germinación se pudo deber a que las semillas utilizadas fueron colectadas del banco de semillas de ejemplares adultos de *M. hernandezii* por lo que pudieron haber pasado por un preacondicionamiento natural, además de esto, al emplear solo agar, la posibilidad de presentar contaminación pudo verse disminuida por la baja cantidad de nutrientes como fuente de alimento, a diferencia del medio de cultivo MS empleado en el presente estudio. La desinfección empleada por Rodríguez-Ortega *et al.* (2006) fue más ligera que la empleada en la presente investigación, por lo que la posibilidad de haber dañado semillas por este proceso, pudo ser más elevada en el presente estudio. Igualmente, Lázaro (2014) reportó un 90% de germinación a las 9 semanas en semillas de 1 año de edad al emplear medio MS al 100% sin reguladores de crecimiento, en fotoperíodo de 16 h de luz, siendo este reporte el más alto en cuanto al porcentaje de germinación de esta especie.

Como se observa en la Gráfica 5, el lote de semillas que presentó la germinación más elevada fue el lote 2, seguido del lote 3 y del lote 1; el mayor porcentaje en el lote 2 se puede explicar debido al uso de GA₃, que es un fitoregulador que promueve la germinación de las semillas, inicialmente en ese lote se tenía el menor porcentaje de germinación (16%), lo que probablemente se debió a que las semillas se encontraban en dormancia, la cual se rompió al adicionar GA₃. Rodríguez-Ortega *et al.* (2006) reportaron que la viabilidad y germinación de semillas de *M. hernandezii* decrecen con

el tiempo, al mostrar un decremento en su germinación del 90% de germinación en semillas de dos años a 38% en semillas de 8 años de edad y en su viabilidad de 96% en semillas de dos años a 80% en semillas de 8 años de edad; sin embargo, en el presente estudio, las semillas de dos años de edad (lote 3) fueron las que presentaron el mayor porcentaje de germinación (70%) sin la adición de fitoreguladores en comparación con los lotes 1 y 2 que fueron semillas obtenidas de frutos maduros de reciente colecta, pero al comparar este resultado con los de Rodríguez-Ortega *et al.* (2006), se puede ver que se obtiene mayor germinación en semillas de cosecha reciente y a su vez se corroboró que semillas de dos años de edad tienen una viabilidad elevada (70% de germinación), así como la elevada dormancia que presentan las semillas de *M. hernandezii*. Los porcentajes de germinación de los lotes 1 y 3 fueron muy similares (65% y 70%), probablemente debido a que ambos provenían de frutos maduros, se esperaba que la germinación del lote 1 fuera mayor, ya que las semillas fueron cosechadas de frutos de reciente maduración, mientras que las del lote 3 tenían dos años de edad; sin embargo, la comparación de estos dos lotes resulta complicada debido a la diferencia del tamaño de las muestras, con 20 semillas para el lote 1 y 64 del lote 3.

La Gráfica 5 muestra que el lote 1 fue el que germinó primero y más rápido, esto se pudo deber a que las semillas eran recientes y provenían de un fruto maduro, mientras que el lote 3 se componía de semillas provenientes de frutos de dos años de edad, lo que pudo provocar que la activación de su metabolismo fuera más lenta y por consecuencia su germinación se viera retrasada (Santini y Martorell, 2013; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006); y el lote 2 que tenía semillas provenientes del banco de semillas de una planta cultivada en invernadero, en la cual no se llevó a cabo el preacondicionamiento que presentan las plantas silvestres, por lo que posiblemente la germinación no se vio favorecida. De igual manera se observó que las semillas germinaron asincrónicamente, lo cual puede ser una ventaja para la sobrevivencia y establecimiento de la especie, al existir diferentes condiciones ambientales presentes a lo largo del tiempo que pueden afectar de manera positiva o negativa al establecimiento de las plántulas, resultados similares de germinación asincrónica fueron reportados por Mata y cols. (2001) para *Turbinicarpus laui* a lo largo de 5 semanas. Observaron que se tenía un mayor porcentaje de germinación de semillas en las primeras tres semanas, con un porcentaje de germinación acumulado de 41.7% en medio MS basal, lo cual también pudo ser observado en el presente estudio, con la germinación de un mayor número de semillas en las primeras semanas, y su disminución conforme pasaba el tiempo (Gráfica 5).

La germinación tanto en fotoperiodo (Lotes 1, 2 y 3) como en oscuridad (Lote 1) inició con el rompimiento de la testa y emergencia de la radícula (Fig. 11a y b). A los 7 días después de la germinación, las plántulas se encontraban aun unidas a los restos de la testa. La radícula era ya de 3 mm de longitud aproximadamente, con pelos

radiculares. Desde la germinación, no se lograron distinguir los cotiledones (Fig. 11c). La luz resultó ser un factor necesario para la germinación de esta especie, ya que solamente 2 de 10 semillas germinaron en condiciones de oscuridad. Las plántulas que germinaron en oscuridad presentaron el tallo de color blanco y su tamaño era reducido (Fig. 11d), por lo que se pasaron a fotoperiodo después de 10 días de su germinación, mediante lo cual las plántulas adquirieron una tonalidad verde en el tallo y continuaron su desarrollo. En promedio para el día 26 después de su germinación, comenzó el desarrollo de las aréolas, las cuales surgieron de la parte central del ápice y conforme se dio el crecimiento de las plantas se fueron recorriendo hacia la base de las mismas y nuevas aréolas surgieron en el ápice; para esos momentos se lograban apreciar algunas espinas que surgían a partir de las aréolas recién formadas.

El fotoblastismo positivo de *M. hernandezii* que se encontró en el presente estudio, ya había sido reportado por Santini (2009) y por Rodríguez-Ortega y cols. (2006), por lo que se corroboró dicha característica. Sin embargo, en el presente estudio se logró la germinación de 2 semillas en oscuridad a los 7 días, lo cual pudo ser debido a una proceso que puede ser interpretada como falla técnica; pues los cultivos se revisaron los 3 días posteriores a su siembra sacándolos de su condición de oscuridad por unos minutos, lo cual brindó pequeños estímulos de luz a las semillas que posiblemente promovieron la germinación. Otra posible explicación puede estar basada en la variabilidad genética obtenida por las semillas durante la polinización, lo cual podría ser benéfico para enfrentar condiciones ambientales cambiantes. Esta germinación de *M. hernandezii* en condiciones de oscuridad no había sido reportada en ningún otro estudio previo. El fotoblastismo positivo que presenta *M. hernandezii* y otras especies serótinas como *M. pectinifera* o *M. napina* es de gran utilidad para las mismas debido a la existencia de los bancos de semillas dentro del tallo (Santini, 2009; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006; Santini y Martorell, 2013), para así asegurar la germinación de las semillas solo estando fuera del tallo de la planta madre. En adición, se ha demostrado para algunas especies de cactáceas como *Mammillaria plumosa*, *Turbincarpus schmiedickeanus* subsp. *rubriflorus*, *T. lophophoroides* y *Ariocarpus kotschoubeyanus* que la oscuridad favorece una dormancia en sus semillas (Flores *et al.*, 2006) lo cual en este caso sería de gran utilidad para el mantenimiento del banco de semillas y quizá esta sea una posible razón por la cual no germinaron todas las semillas ensayadas, no obstante que eran de reciente colecta.

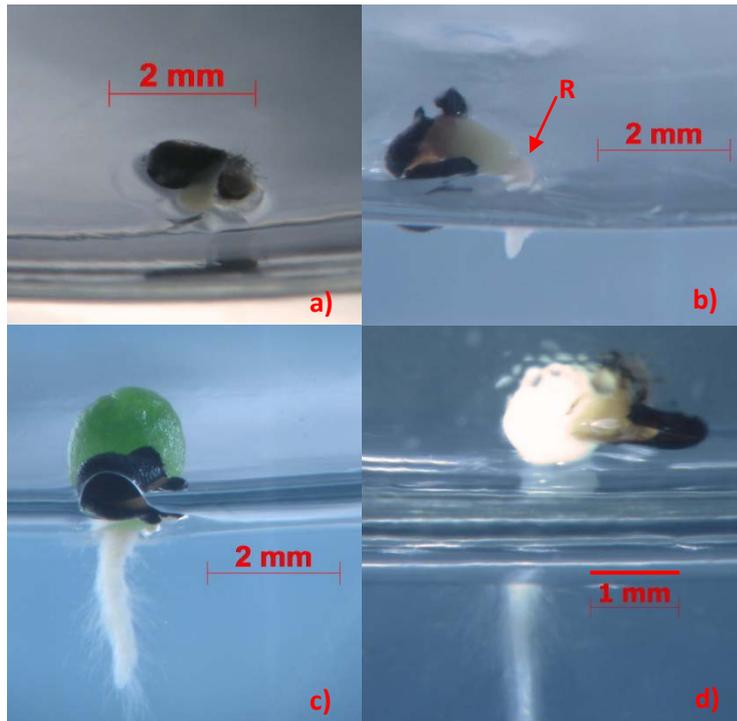


Figura 11. Etapas del proceso de germinación *in vitro* de semillas de *M. hernandezii* en medio MS 50/100: **a)** Semilla con la testa fracturada; **b)** Emergencia de la radícula (R) a los 5 días; **c)** Plántula a los 7 días de su germinación en fotoperiodo con raíz de 3mm de longitud y algunos pelos radiculares unida a los restos de la testa y **d)** Plántula a los 7 días de su germinación en oscuridad, se nota el color blanco de su tallo.

Desinfección de plantas adultas cultivadas en invernadero

La desinfección inicial de las plantas de invernadero no resultó eficiente, debido a que se presentó contaminación por hongos directamente sobre los explantes utilizados, a excepción del explante proveniente de la médula; esto se puede explicar debido a que *Mammillaria hernandezii* presenta lana en las axilas de los podarios, la cual puede albergar partículas de polvo, así como esporas de hongos, entre otras partículas. Se procedió a realizar una segunda desinfección de los explantes que se contaminaron, con el incremento de los tiempos de permanencia en fungicida, con lo cual se logró la eliminación de los hongos, pero a su vez el tejido de las plantas fue gravemente dañado y murió.

Debido a la contaminación que se presentó en las plantas, sería recomendable realizar un pretratamiento de las mismas rociando fungicidas posiblemente durante un mes al tallo de las plantas previo a su desinfección en el laboratorio (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007; Viñas *et al.*, 2012).

El explante proveniente de la médula permaneció sin cambios en su morfología y al transcurrir 1 mes desde su establecimiento sufrió oxidación y murió, probablemente

debido al estrés ocasionado por la desinfección, la disección y al cambio de condiciones.

Plántulas, cultivo *in vitro* de explantes somáticos

Cultivo *in vitro* de muestras 1 y 2

Los ensayos realizados con las muestras 1 y 2 fungieron como una etapa de multiplicación de brotes, debido a la escasez de material vegetal obtenido inicialmente; además de esto, tomando en cuenta la falta de material, estas pruebas funcionaron para determinar las mejores condiciones para la regeneración de brotes y proliferación de esta especie. Ensayos similares de multiplicación han sido utilizados por otros autores, debido a la escasez de plantas. Como Ramírez-Malagón y cols. (2007) con diversas especies del género *Mammillaria*; Pérez-Molphe y cols. (2012) con diversas especies de *Turbinicarpus*; Palomino y cols. (1999) con *Mammillaria sanguelensis* para medir la estabilidad genómica, entre otros. Los resultados obtenidos en el presente estudio para las muestras 1 y 2 evidenciaron que la mejor respuesta se obtuvo al utilizar medio líquido con puentes de papel filtro, ya que se formaron la mayor cantidad de regenerantes vía organogénesis directa e indirecta a partir de explantes apicales, al obtener *ca.* 100 plántulas a lo largo de año y medio de cultivo; mientras que los explantes cultivados en medio sólido presentaron una respuesta escasa, al obtener solamente la regeneración de los ápices en los explantes basales y la formación de las raíces en los explantes apicales, a lo largo de un año.

Los resultados antes mencionados variaron considerablemente en ambas muestras probablemente debido a distintos factores: la inducción de la muestra 1 se realizó en medio MS 50/100 líquido con puentes de papel filtro, lo que pareció propiciar que los explantes contaran con un suministro de nutrientes, agua y reguladores de crecimiento más eficiente (Spomer y Smith, 1996; Hvoslef-Eide & Preil, 2005), de esta manera se pudo acelerar la respuesta, aunado a que el tiempo de inducción de la muestra 1 fue de 6 meses, mientras que el de la muestra 2, fue solo de 3 meses. Además de esto, al subcultivar los explantes de un medio con reguladores de crecimiento a uno sin la presencia de éstos en la muestra 1 se realizó a un medio MS 50/100 adicionado con agar bacteriológico, mientras que en la muestra 2 se adicionó además 0.5 g/l de carbón activado al medio, provocando que el acceso a reguladores de crecimiento se viera limitado (Pérez-Molphe y Dávila, 2002), por lo que posiblemente la respuesta organogénica se vio disminuida en la muestra 2.

Tabla 13. Respuesta obtenida al año de iniciados los cultivos de explantes procedentes de plántulas de 6 meses de edad de *M. hernandezii* germinadas *in vitro* (Muestra 1).

| Fitoregulador (mg/l) | Explante (1/tratamiento) | 158 días | 380 días |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| 2 BA | Ápice | Raíz | - |
| | Base | SR | - |
| 1 ANA, 2 BA | Ápice | Callo friable | - |
| | Base | SR | - |
| 0.5 ANA, 2 BA | Ápice | 3 Brotes | 13 Brotes |
| | Base | Regeneración de ápice | - |
| 3 BA | Ápice | 3 Brotes | 5 Brotes |
| | Base | SR | - |
| 0.5 ANA, 3 BA | Ápice | Callo friable y 11 brotes | 78 Brotes indirectos |
| | Base | Regeneración de ápice | - |

SR= Sin respuesta; BA= Benciladenina; ANA= Ácido naftalenacético

A los 15 días de iniciada la inducción de la muestra 1, la respuesta obtenida en todos los explantes apicales (1 explante/tratamiento) fue un incremento en su volumen, y a su vez se observó la oxidación del área de corte en todos los explantes, ya después de 1 mes de cultivo comenzaron a producirse respuestas diferentes en las distintas combinaciones de fitoreguladores empleadas:

En el tratamiento 0/2 (ANA/BA) se dio la formación de raíces de aproximadamente 1 mm de longitud, las cuales surgieron de la periferia de la zona de corte (Fig. 12a), conformando así la planta completa.

En el tratamiento 1/2 se formaron pequeños cúmulos de callo friable de color blanco hialino alrededor de todo el explante, semejando escarcha, mientras que el explante incrementó su volumen al triple del inicial, hasta convertirse en callo friable de color verde y apariencia húmeda (Fig. 12e), el cual al subcultivarse se desmoronaba al tacto con el instrumental y continuaba su crecimiento.

El explante del tratamiento 0.5/2 continuó con un incremento en su volumen hasta duplicar su tamaño inicial, conservando su estructura y a su vez, se vio la formación de muy poco callo friable blanco hialino con apariencia de escarcha en la periferia de la zona de corte del explante. A los 120 días se observaron protuberancias de color verde intenso provenientes de las aréolas existentes en el explante, las cuales se distinguieron como brotes adventicios 7 días después, a los 158 días el explante poseía un tamaño de 1.2 x 1 cm de largo y ancho, era de color verde con tonalidades rojizas en el ápice posiblemente por el estrés al que se sometió el explante (González, 2008), además se habían formado 3 brotes mediante activación de yemas preformadas que alcanzaron un tamaño de aproximadamente 3mm de longitud y ya contaban con aréolas y espinas propias (Fig. 12d).

En el tratamiento 0/3 se llevó a cabo la formación de raíces de aproximadamente 5 mm de longitud y el crecimiento del tallo del explante, hasta alcanzar una talla de 1 cm de longitud, y a su vez se produjo una esfera de callo compacto de 5mm de diámetro y de una coloración verde oscura en la parte basal de la planta. Este callo dio origen a 3 brotes en 158 días, los cuales surgieron de zonas abultadas del mismo (Fig. 12c).

En el explante del tratamiento 0.5/3 se formaron de igual manera parches de callo friable de color blanco hialino alrededor de todo el explante, mientras que al mismo tiempo, se dio la activación de yemas preformadas, al observarse zonas con coloración verde intenso en las aréolas del explante, a partir de las cuales se dio la diferenciación de 9 brotes de manera directa al mes de iniciada su inducción; sin embargo, al segundo mes dentro del período de inducción, dichos brotes comenzaron a incrementar su volumen adquiriendo una apariencia más turgente, hasta que se reventaron y se transformaron en callo friable de color verde, alrededor del cual se originó nuevamente callo semejante a la escarcha. A 2.5 meses de iniciada su inducción el callo formado tenía un tamaño de aproximadamente 3 cm de diámetro y dio origen a 11 brotes nuevos (Fig. 12b).

En los explantes basales se observó respuesta nula en los tratamientos 0/2, 1/2 y 0/3, mientras que en los tratamientos 0.5/2 y 0.5/3 se dio la regeneración de los ápices, los cuales surgieron de la periferia de la zona de corte (Tabla 13), no es posible indicar de manera precisa la zona de la cual surgieron dichos brotes, debido a que no se realizaron cortes histológicos del surgimiento de los mismos.

Esta respuesta diferencial de los explantes apicales y basales con respecto al número de brotes formados es similar a la reportada por Papafotiou y cols. (2001) que al trabajar con *Mammillaria elongata* observaron que los explantes apicales producían una respuesta mayor (0.9 ± 0.15 brotes/explante) que aquella obtenida de explantes de la parte media (0.5 ± 0.18) y más aun de la parte basal en la que solo se obtuvo la formación de callo; de igual manera Pérez-Molphe y Dávila (2002) al trabajar con *Peleciphora aselliformis* obtuvieron mayor formación de brotes en los explantes apicales (13.7 ± 1.37 brotes/explante) que en explantes inferiores (13 ± 1.66). En el presente estudio de igual manera se obtuvo mayor producción de brotes en los explantes apicales en comparación con los explantes basales, este comportamiento se pudo deber a que la parte basal no se separó de las raíces, las cuales pueden ser una fuente endógena de hormonas, principalmente citocininas que pudieron promover la activación de yemas laterales (Jordán y Casaretto, 2006), pero al tratarse del hipocótilo, los explantes no conservaron aréolas, que son zonas meristemáticas con alta actividad mitótica, mediante las cuales se puede facilitar la formación de brotes nuevos; y al mismo tiempo las raíces son una fuente endógena de auxinas, producidas por los ápices de las mismas (Jordán y Casaretto, 2006), lo que pudo inhibir la formación de brotes laterales y conservar la dominancia apical; además se ha visto que

en las cactáceas al sufrir daño en la parte apical o perderla por completo, tienden a recuperar la parte faltante de la planta (observación personal), que fue lo que ocurrió en la presente investigación.

Como se observa en la Tabla 13 el tratamiento que mostró mejores resultados para la formación de brotes en las muestras 1 y 2 fue el de 0.5/3 (ANA/BA) en medio líquido con puente de papel filtro, ya que se logró la formación de la mayor cantidad de brotes (78 brotes en un año) por vía indirecta; sin embargo, en los tratamientos de 0.5/2 y 0/3 también se logró la formación de 13 y 5 brotes respectivamente por vía directa, lo cual puede brindar más estabilidad genética a las nuevas plantas, ya que se evita la fase de callo, en la cual debido a la acelerada división celular la segregación de cromosomas puede verse afectada (Evans, 1989, citado por Palomino *et al.*, 1999). Aunado a que las concentraciones de fitoreguladores empleadas fueron menores, lo cual puede propiciar de igual manera mayor estabilidad genética a los nuevos individuos (Pérez-Molphe y Dávila, 2002).

La mayor formación de brotes se obtuvo al adicionar solamente BA al medio o en combinación con cantidades muy pequeñas de ANA, esto concuerda con estudios previos realizados en diversas especies de cactáceas en los que se vio que la mejor respuesta se obtiene al adicionar principalmente citocininas al medio de cultivo, debido a que muchas cactáceas tienen la capacidad de producir un exceso de auxina *in vitro* (Hubstenberger *et al.*, 1992), algunos ejemplos de esto son: en *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* en ausencia de auxinas exógenas y al utilizar BA (0.49, 0.99 y 1.98 mg/l), 2iP (1.9 y 4 mg/l) y TDZ (0.49 mg/l) se promovió la formación de brotes (Pérez-Molphe y Dávila, 2002); en *Turbincarpus laui* al utilizar 3 mg/l de BA con 0.5 mg/l de ANA se obtuvieron en promedio 146 brotes por explante (Mata *et al.*, 2001); en *Mammillaria bocasana* al utilizar 10 mg/l de kinetina se indujo la proliferación de 3.8 brotes por explante (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007); *Notocactus magnificus* con 5mg/l de BA (Aíra de Medeiros *et al.*, 2006); en *Mammillaria albicoma* Wyka y cols. (2006) utilizaron 0.1 mg/l de ANA en combinación con 5 mg/l de BA y obtuvieron 58 brotes totales a partir de botones florales; Moebius-Goldammer y cols. (2003) obtuvieron 1.2 brotes por explante de *Ariocarpus kotschoubeyanus* al adicionar al medio 1 mg/l de BA, en ausencia de auxinas; en *Backebergia militaris*, Fernández (2014) logró la regeneración de 22 brotes al utilizar 3 mg/l de kinetina; y en *Coryphantha retusa* se obtuvieron 8.8 brotes en promedio de explantes apicales al adicionar 2 mg/l de BA (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010).

Es notable que una vez que los explantes se encontraban en medio sin reguladores de crecimiento, continuaron presentando respuesta similar de producción de callo y brotes con el proceso de inducción, de igual manera, los brotes individualizados de los diferentes tratamientos seguían presentando regeneración de brotes de manera directa e indirecta; resultados similares fueron reportados por Moebius-Goldammer y

cols. (2003) para *Ariocarpus kotschoubeyanus* y Ruvalcaba-Ruíz y cols. (2010) con *Coryphantha retusa*, lo que se puede interpretar como la respuesta al proceso de inducción al que se sometieron los explantes, pero a su vez, es posible que los explantes presentaran indicios de pequeños cambios en la expresión de su genoma (Smulders y Klerk, 2011).

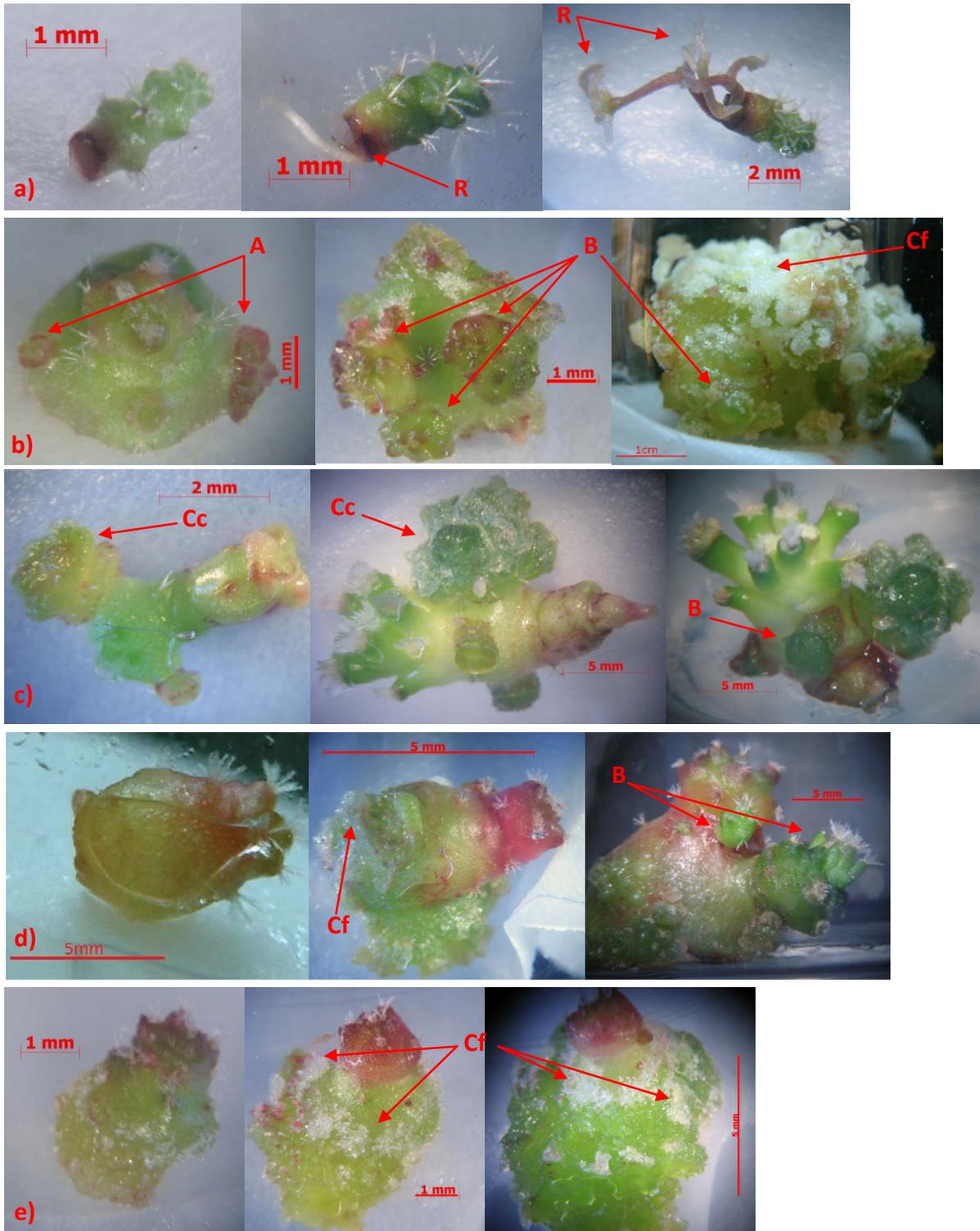


Fig 12. Respuesta morfogénica de los explantes apicales de *M. hernandezii* a los tratamientos con ANA/BA: **a)** En el tratamiento 0/2 se muestra la formación de raíces (R) en la periferia de la zona de corte; **b)** En el tratamiento 0.5/3 se observan las aréolas hinchadas (A) que dieron origen a los brotes laterales (B), así como la formación de callo friable (Cf) hialino rodeando el explante; **c)** En el tratamiento 0/3 se dio la formación de callo compacto (Cc) en la base de la planta y el crecimiento y desarrollo del explante con la formación de podarios con espinas, además se logró la formación de brotes (B) a partir de la base; **d)** En el tratamiento 0.5/2 se observa la formación de callo friable (Cf) hialino en la base del explante, así como la formación de brotes adventicios (B), es notable observar el incremento en el tamaño del explante; y **e)** Se observa en el tratamiento 1/2 el desarrollo de callo friable hialino (Cf) sobre el explante, así como el incremento en el volumen del explante. De izquierda a derecha: 15 días, 1 mes y 3 meses aproximadamente.

Cultivo *in vitro* de muestra 3: ápices de plántulas regeneradas

A los ocho días de inducción fue notoria la oxidación del tejido de la periferia de la zona de corte en todos los explantes (Fig. 13a), denotada por un oscurecimiento del tejido vegetal, así como la adquisición de tonalidades rojizas en la base del explante que incluso mancharon el papel filtro sobre el cual se sembraron; lo que se puede deber al estrés que sufrió la planta, provocado al momento de disectar, a la presencia de reguladores de crecimiento, al efecto de la luz y/o a la variación de condiciones de cultivo en general, llegando a afectar al explante completo (Fig. 13b), dicha coloración rojiza se debe a la producción de betalainas, un pigmento característico de las plantas pertenecientes al orden Caryophyllales (González, 2008). A pesar de que la inducción se llevó a cabo en medio líquido, no se presentaron problemas de hiperhidratación del tejido, que es una condición en la que el tejido vegetal absorbe agua en exceso, provocando un crecimiento desorganizado de la planta con apariencia un tanto hialina, lo cual constituye un problema muy común en el cultivo *in vitro* de cactáceas (Santos *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002) y se presenta debido a factores como alta humedad en los frascos de cultivo, exceso de minerales en el medio de cultivo y alta incidencia de luz (Ziv, 1991 citado por Pérez-Molphe y Dávila, 2002).

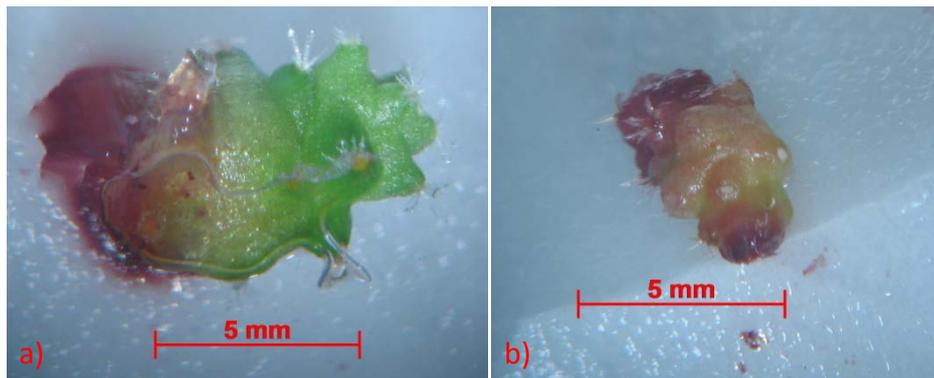


Fig 13. Explantes apicales de plántulas regeneradas de *M. hernandezii* en tratamiento control: **a)** Oxidación de la parte basal denotada por su coloración rojiza y **b)** Cambio de coloración de todo el explante a una tonalidad rojiza. Resultados a los 8 días de iniciada la inducción.

En esta inducción, el volumen de los explantes incrementó; sin embargo, dicho incremento no fue tan evidente en comparación con la inducción de la muestra 1 (al doble y triple de su tamaño inicial), al aumentar solamente 2 mm en promedio al haber transcurrido 3 meses. Transcurrido un mes en inducción, el 89.7% de los explantes de todos los tratamientos habían regenerado en promedio dos raíces, las cuales surgieron de la periferia de la zona de corte. La formación comenzó con la emergencia de una raíz y su posterior elongación, mientras otras raíces comenzaban a emerger de otras zonas del área de corte, algunas de las raíces formadas se bifurcaron en la parte apical conformando así un sistema radicular más complejo (similar a lo que se observa en la Fig. 12a), para finalmente conformar la planta completa (Fig. 14).



Fig 14. Explantes apicales de *M. hernandezii* con raíces formadas a partir de la zona de corte a los 2 meses de iniciada la inducción en tratamientos 0/3, control y 0.1/3 ANA/BA.

A los tres meses de inducción, los explantes se pasaron a medio MS 50/100 sólido sin reguladores de crecimiento, adicionado con 0.5g/l de carbón activado; con el fin de permitir a los explantes responder a los fitoreguladores proporcionados durante el período de inducción, así como reducir la concentración de los mismos, ya que se ha visto que si se mantienen en altas concentraciones, llegan a inhibir la respuesta obtenida (Viñas *et al.*, 2012) además, para favorecer el crecimiento de las raíces formadas, así como el desarrollo de las mismas en los explantes que no las presentaban. Después de un mes del subcultivo a medio sin reguladores, las plantas regeneradas habían alcanzado en promedio 1 cm de altura por 3 mm de diámetro y con una longitud del sistema radicular de 2 cm aproximadamente; a su vez un explante apical del tratamiento 0.5/3 ANA/BA comenzó a presentar un crecimiento desorganizado, perdiendo su estructura y transformándose en callo compacto de color verde intenso (Fig. 15a). De igual manera, 2 de 5 explantes apicales del tratamiento 0.1/3; 1 de 4 explantes del tratamiento 0.5/1; y 2 de 3 explantes del tratamiento 0.5/2 presentaron la formación de brotes de manera directa a partir de las axilas de los nodos (activación de yemas preformadas) y de la base del explante (Fig. 15b y c).

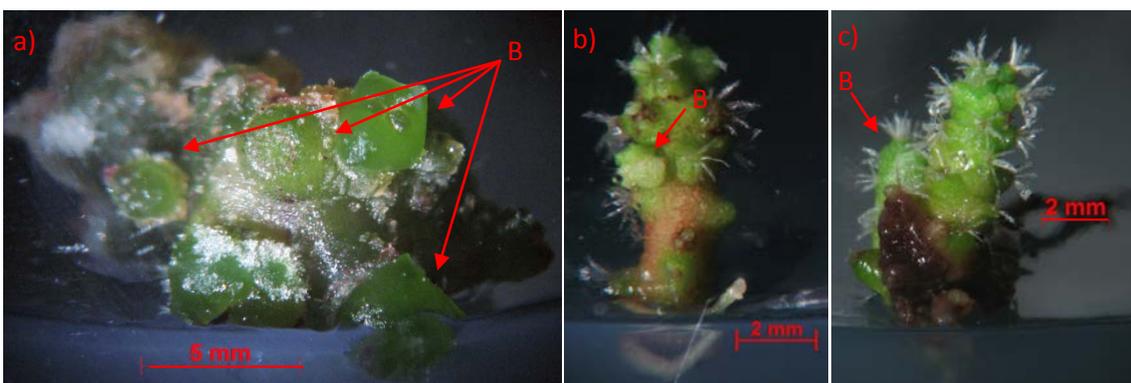
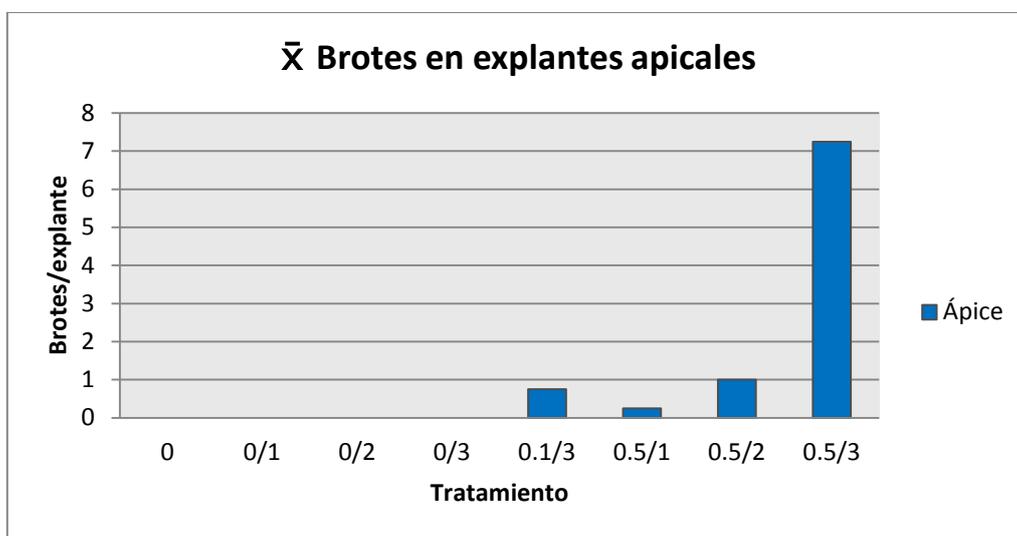


Fig 15. Explantes apicales de *M. hernandezii* en medio sin fitoreguladores, después de 3 meses de inducción y 1 mes en medio basal que presentan **a)** formación de brotes (B) a partir de callo en tratamiento 0.5/3; **b)** formación de brotes a partir de las axilas en el tratamiento 0.5/2; y **c)** formación de brotes a partir de la base del explante en el tratamiento 0.1/3 ANA/BA.

Durante el mes posterior del subcultivo en medio sin reguladores (a cuatro meses de iniciada la inducción), el explante apical que formó callo comenzó a presentar algunas áreas más compactas, definidas y de color verde intenso, de las cuales se dio la formación de brotes, siendo este tipo de explante del cual se obtuvo la mayor cantidad de brotes regenerados a lo largo de un año (29 brotes); sin embargo, esta respuesta solo se observó en uno de cuatro explantes del mismo tratamiento, lo cual pudo deberse a la variabilidad genética intrínseca de la especie, así como la posible variación somaclonal adquirida durante el proceso de obtención de explantes mediante la obtención de plántulas de las muestras 1 y 2, por lo que se puede considerar que la mejor concentración de fitoreguladores fue 0.5/2 ANA/BA, debido a que 2 de 3 explantes formaron brotes, con 1 brote por explante en promedio (Gráfica 6).



Gráfica 6. Promedio de brotes formados en explantes apicales de plántulas germinadas *in vitro* de *M. hernandezii* (Muestra 3) por tratamiento con diferentes concentraciones de ANA/BA (mg/l). Resultados al año de iniciados los cultivos.

Los explantes que presentaron formación de brotes, fueron aquellos que se encontraban en presencia de auxinas exógenas en bajas concentraciones en combinación con citocininas. De igual manera fue reportado por Ramírez-Malagón y cols. (2007) para varias especies del género *Mammillaria*, las que en general mostraron una mayor proliferación vía organogénesis directa e indirecta en las concentraciones 1/10 y 2/10 (AIA/Kin mg/l) con 4.7 y 4.8 brotes por explante respectivamente al término de 2 meses de iniciados los cultivos; Clayton y cols. (1990) reportaron 5.1 brotes axilares por explante en *Pediocactus paradinei* utilizando 0.2/10 mg/l de ANA/Zea al finalizar tres meses. Tanto en los estudios antes mencionados como en el presente, fue necesaria la adición de citocininas en altas concentraciones para lograr la formación de brotes adventicios, lo que se puede deber a la alta dominancia apical que presentan las plantas dada por acción de las auxinas sintetizadas en los ápices, por lo que al adicionar citocininas se ayuda a activar las yemas laterales propiciando la formación de brotes (Hubstenberger, 1992). Cabe

destacar que en el presente estudio, las concentraciones de citocininas empleadas no fueron tan elevadas, a diferencia de los estudios de Ramírez-Malagón *et al.*, (2007) y Clayton *et al.*, (1990), lo cual favorece la estabilidad genética de los regenerantes y con ello su conservación.

La regeneración obtenida para la muestra 3 fue muy baja en comparación con la obtenida en la inducción de la muestra 1, en la que se observó una mayor respuesta en los explantes apicales; esto se pudo deber a que los explantes utilizados para la inducción de la muestra 3 provenían de una regeneración previa, lo que pudo provocar una respuesta distinta debido a pequeños cambios en la expresión del genoma de las plantas (Smulders y Klerk, 2011). Asimismo, la edad de las plantas de la muestra 3 era mayor, de seis meses para la muestra 1 y de aproximadamente un año para la muestra 3, además de que las plantas de la muestra 3 atravesaron por un proceso de formación, enraizamiento y crecimiento para obtener los explantes empleados, por lo que su respuesta se pudo ver afectada. De igual manera, al tomar en cuenta que en la inducción de la muestra 1 no se realizaron repeticiones y solo un explante produjo la mayor cantidad de brotes, al igual que en la muestra 3, se puede atribuir a la variabilidad de la especie.

Al finalizar un año desde el inicio de los cultivos, se lograron obtener 36 brotes regenerados a partir de los explantes apicales, los cuales presentaban las características típicas de la especie y su desarrollo fue normal.

Cultivo *in vitro* de muestra 3: bases de plántulas regeneradas

Al igual que los explantes apicales, en los explantes basales se presentó la oxidación de la zona de corte y su periferia, seguido de un cambio de tonalidad a colores rojizos debido al estrés ocasionado al tejido, llegando a cubrir todo el explante (Fig. 16). Al igual que en los explantes apicales, la hiperhidratación no se presentó en el experimento.

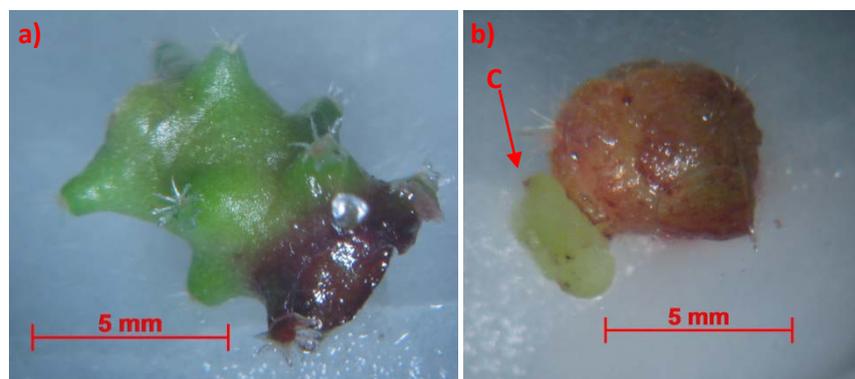


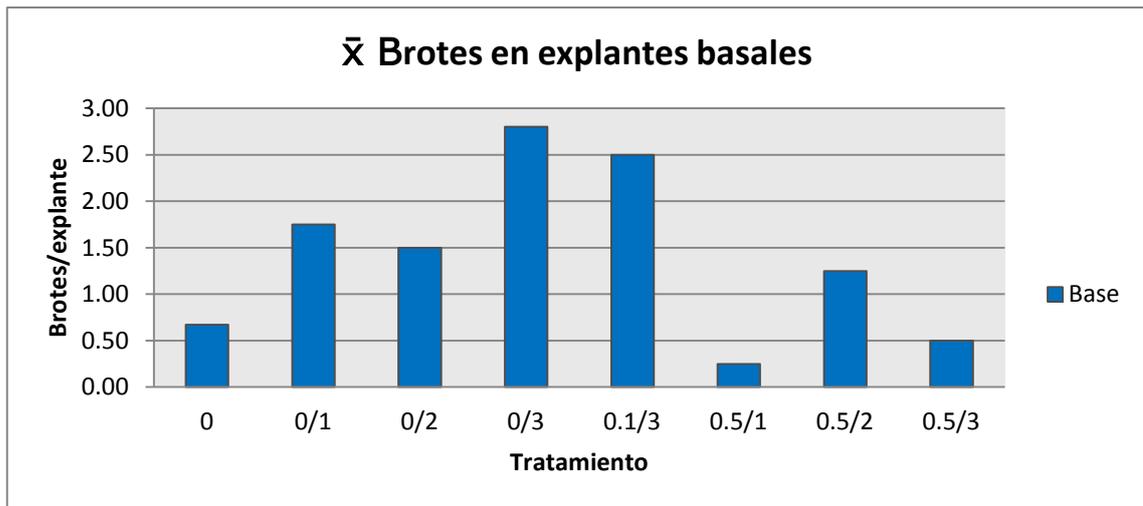
Fig 16. Explantes basales de *M. hernandezii* a los 8 días de inducción, se observa: **a)** Oxidación de la zona de corte y tejido periférico en tratamiento 0/1 ANA/BA y; **b)** Estrés en explante basal denotado por la coloración rojiza que presentó, de igual manera se observa la presencia de callo (C) en tratamiento 0/2 ANA/BA.

Al transcurrir dos meses de inducción, comenzó la formación de brotes en todos los tratamientos, los cuales en un principio se originaron mediante organogénesis directa, que visualmente parecieron surgir a partir de dos zonas principalmente: 1) a partir de las aréolas, tanto de las aréolas del ápice del podario (vegetativas) como de las aréolas de las axilas del mismo (floríferas) mediante activación de yemas preformadas, y 2) a partir de la zona de corte (Fig. 17). La formación de brotes mediante activación de yemas preformadas ha sido reportada por otros autores como Ruvalcaba-Ruíz y cols. (2010) que al estudiar a *Coryphantha retusa* obtuvieron todos los brotes a partir de las aréolas de los explantes apicales y laterales al adicionar diferentes concentraciones de BA solo o en combinación con bajas concentraciones de ANA; de igual manera Moebius-Goldammer y cols. (2003) obtuvieron activación de yemas preformadas en tubérculos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* al adicionar al medio de cultivo 1 o 3 mg/l de BA. Al ser una zona meristemática, se ha visto que las aréolas son zonas en las cactáceas que presentan la relativa facilidad de generar brotes nuevos al adicionar reguladores de crecimiento al medio de cultivo (Hubstenberger *et al.*, 1992), tal y como se observó en el presente estudio.



Fig 17. Formación de brotes en explantes basales de *M. hernandezii* a partir de las aréolas vegetativas (V) y floríferas (F), y de la periferia de la zona de corte (C), resultados a los 2 meses de iniciados los cultivos, aún en proceso de inducción en los tratamientos 0/2, 0/3, 0.1/3 y 0.5/2 ANA/BA.

Al pasar los explantes a medio sin reguladores (después de 3 meses de inducción) adicionado con carbón activado, se propició la formación de raíces, así como la proliferación de brotes. La mayor producción de brotes se obtuvo en ausencia de auxinas o en bajas concentraciones de las mismas, así como concentraciones altas de citocininas (Gráfica 7), siendo el tratamiento 0/3 el que promovió una mayor cantidad de brotes (2.8 brotes por explante), seguido de la concentración 0.1/3 (2.5 brotes por explante). Para este momento, la formación de callo fue reducida y se dio en algunos explantes de las concentraciones 0/2 (3 de 4 explantes); 0/3 (2 de 4 explantes); y 0.5/3 (1 de 4 explantes), originando brotes en todos los casos; el callo formado era de consistencia friable y crecimiento rápido en el tratamiento 0/2, mientras que en los otros dos (0/3 y 0.5/3), se originó callo compacto de crecimiento lento. En las concentraciones restantes, la organogénesis solo se originó de manera directa como se ve en la Fig. 17.



Gráfica 17. Promedio de brotes formados en explantes basales de tallos de plántulas de *M. hernandezii* (Muestra 3) por tratamiento con diferentes concentraciones de los fitoreguladores ANA/BA. Resultados a 1 año de iniciados los cultivos.

Al comparar los resultados de los explantes basales de la muestra 3 con los de la muestra 1, se observa que la formación de brotes fue mayor para la muestra 3, lo que posiblemente se puede explicar debido a que en la muestra 1 se utilizaron plántulas germinadas y al disectar los ápices, la parte basal quedó representada por la zona considerada como el hipocótilo el cual no presenta aréolas, y por ello naturalmente se redujeron las posibilidades de obtener una mayor respuesta morfogénica, mientras que en la muestra 3 se utilizaron brotes regenerados que ya contaban con aréolas, originándose la formación de brotes mediante la activación de éstas y por consecuencia, se obtuvo una mayor regeneración de plantas nuevas.

Cultivo *in vitro* de muestra 3: raíces de plántulas regeneradas

Las raíces permanecieron sin cambio aparente durante los primeros tres meses de inducción, observando un crecimiento de 2 mm en promedio aproximadamente. Al igual que los explantes apicales y basales, presentaron oxidación de la zona de corte y adquirieron una coloración roja oscura (Fig. 18).

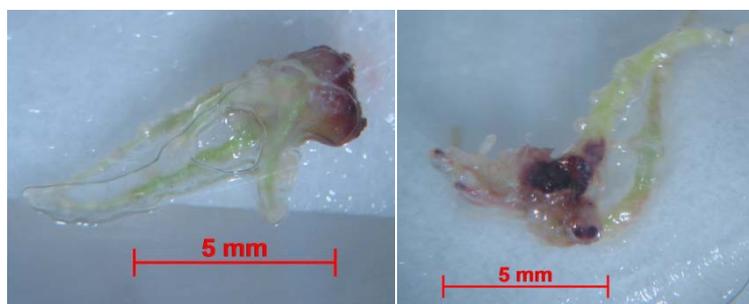


Fig 18. Oxidación de la zona de corte en explantes provenientes de la raíz de *M. hernandezii* a los 8 días de inducción.

A los tres meses de inducción, se pasaron las raíces a medio sin reguladores de crecimiento y al transcurrir un mes desde su subcultivo, 2 raíces comenzaron a formar brotes de manera directa a partir de la zona de corte: 2 brotes en el tratamiento 0/1; y 1 brote en el tratamiento 0/3 ANA/BA, mientras que una raíz en el tratamiento 0.5/3 y otra en 0/1 ANA/BA comenzaron a originar abundante callo compacto de color verde claro y crecimiento rápido a partir de la zona de corte (Fig. 19).

Después de ocho meses de iniciada la inducción, y aún creciendo en el medio sin reguladores, los brotes regenerados adquirieron una forma globosa, formaron las espinas características de la especie y alcanzaron en promedio 5 mm de longitud; a su vez, el callo que se originó de la concentración 0.5/3 continuó su crecimiento hasta triplicar su tamaño (2 cm aproximadamente). De igual manera se observó la diferenciación de ciertas partes del callo formado, denotada por un oscurecimiento de diversas zonas del mismo, a partir de las cuales comenzó la diferenciación de brotes, los cuales continuaron su desarrollo y formaron aréolas y espinas.

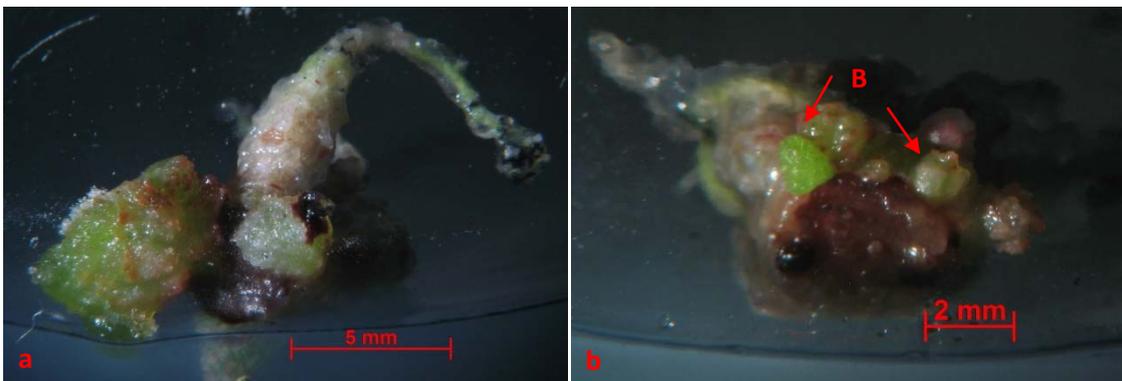
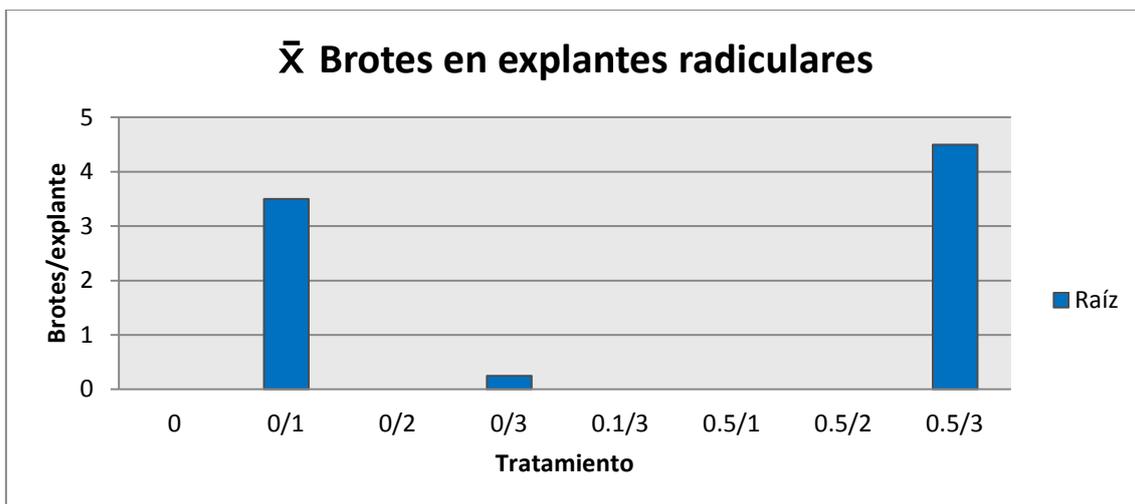


Fig 19. Explantes provenientes de la raíz de plántulas de *M. hernandezii* en la concentración 0/1 ANA/BA que presentan formación de **a)** callo compacto y **b)** brotes (B), a los 4 meses de iniciada la inducción.

Al transcurrir un año de iniciada la inducción, el tratamiento que originó la mayor cantidad de brotes fue el de 0.5/3 con 4.5 brotes por explante, seguido del tratamiento 0/1 con 3.5 brotes por explante (Gráfica 8); sin embargo, solo 1 de 4 explantes presentó la regeneración de brotes en el tratamiento 0.5/3, mientras que en el 0/1 fueron 2 de 4 explantes, por lo que la respuesta observada en el tratamiento 0.5/3 pudo deberse a la variabilidad genética de las plántulas usadas como fuente de explante y no solamente a la acción de los fitoreguladores adicionados, sin embargo también en estos ensayos se observó la necesidad de contar con una fuente exógena de citocininas en combinación con bajas o nulas cantidades de auxinas. Resultados similares fueron reportados por Ronquillo (2009) con *Mammillaria theresae*, al obtener 2 brotes espontáneos a partir de las raíces regeneradas de los explantes de tallo en la concentración 0.1/2 ANA/BA; por Yáñez (2011) con *Mammillaria bombycina* al obtener 2 brotes en la concentración 0/2 y 5 brotes en la concentración 0.5/2 ANA/BA; Olguín (1994) reportó para *Ariocarpus retusus* la formación de 6 brotes

totales en cada tratamiento al utilizar 5/0 y 10/1 mg/l de 2iP/AIA. Sin embargo, de igual manera Bhau (1999) utilizó explantes radicales de *Coryphantha elephantidens* y consiguió mejor respuesta regenerativa con una cantidad de auxina mayor en comparación de la citocinina, en la concentración 1/2 Kin/2,4-D al obtener 1.6 brotes por explante. Es notable que la cantidad de brotes regenerados a partir de explantes radiculares en la presente investigación (33 brotes totales en un año) fue mayor que los reportados para *Mammillaria theresae*, *Mammillaria bombycina* y *Ariocarpus retusus* (2, 2 y 6 brotes totales respectivamente) lo que pudiera indicar un mayor potencial regenerativo de las raíces de *Mammillaria hernandezii*, y a su vez en los cuatro estudios reportados, los brotes se originaron por organogénesis indirecta, mientras que en el presente estudio se obtuvieron 4 brotes directos en los tratamientos 0/1 y 0/3 ANA/BA, lo que brinda mayor estabilidad genética a las nuevas plantas, al no atravesar por la fase de callo (Palomino *et al.*, 1999).

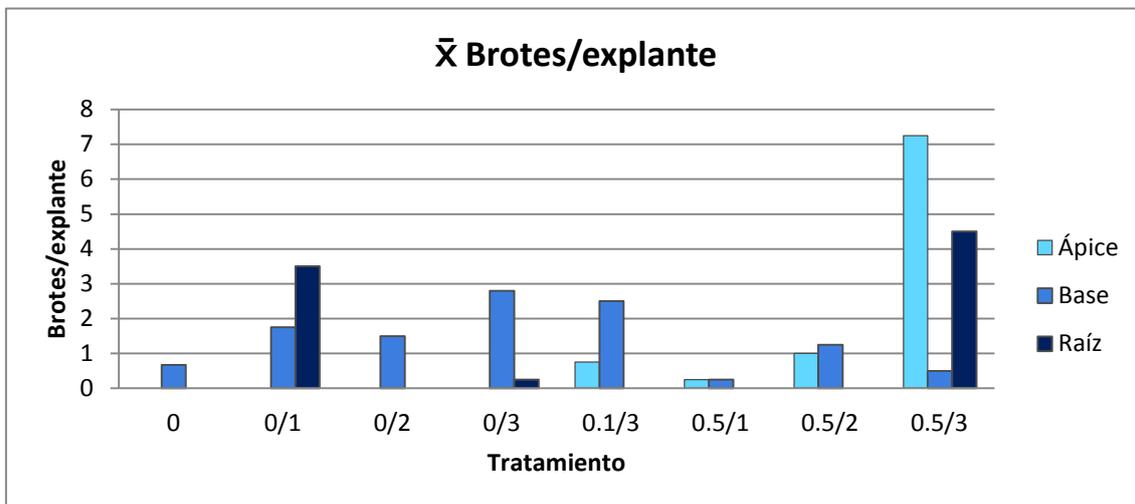
Los estudios antes mencionados, forman parte de los escasos reportes de regeneración de brotes mediante explantes radiculares en la familia Cactaceae, los explantes más utilizados para su propagación son podarios (aréolas), fragmentos del tallo de plantas adultas o de plántulas y epicótilos (Hubstenberger *et al.*, 1992) (Tabla 10); sin embargo, como se comprueba en el presente estudio, es importante explorar el potencial regenerativo de este tipo de explante con el fin de favorecer la propagación por cualquier medio y la sobrevivencia de especies en peligro, además de que el empleo de raíces de plantas *in vitro* como fuente de explantes brinda diversas ventajas como una fácil manipulación, disponibilidad de material, esterilidad y evita la oxidación por metabolitos secundarios en el medio (Bhau, 1999).



Gráfica 8. Promedio de brotes formados en explantes radiculares de plántulas de *M. hernandezii* (Muestra 3) por tratamiento con diferentes concentraciones de los fitoreguladores ANA/BA al finalizar 1 año de iniciados los cultivos.

Comparación de la respuesta morfogénica de los explantes cultivados provenientes de plántulas (Muestra 3)

El explante que presentó la mayor formación de brotes fue el explante basal (47 brotes totales ($\bar{x}=1.6$)), ya que se logró la formación de brotes de manera directa e indirecta en todos los tratamientos, incluido el tratamiento control; enseguida, los explantes apicales generaron un total de 36 brotes totales ($\bar{x}=1.2$), con la formación de brotes en cuatro tratamientos y a su vez solo en 25, 50 y 66% de los explantes por tratamiento; por su parte el explante con la menor respuesta morfogénica fue la raíz (33 brotes totales ($\bar{x}=1$)), al obtener formación de callo y regeneración de brotes en solo tres tratamientos (0/1, 0/3 y 0.5/3), y a su vez la respuesta se obtuvo en solo el 25 y 50% de los explantes por tratamiento (Gráfica 9 y Tabla 14).



Gráfica 9. Comparación del promedio de brotes regenerados por explante (Ápice, Base y Raíz) de *M. hernandezii* en diferentes concentraciones de ANA/BA al finalizar un año de iniciada la inducción.

Como se observa en la Gráfica 9, la formación de brotes fue superior en los explantes basales, al presentar respuesta en todos los tratamientos estudiados, y a su vez se puede notar que la mejor respuesta se observa en concentraciones de 3 mg/l de BA en combinación con ANA o en la ausencia de la misma. Esto fue posiblemente debido a que al eliminar la parte apical, se promovió la activación de las yemas laterales, y además al poseer una fuente exógena de citocininas que promueven la división celular se produjeron brotes a partir del explante; a diferencia de los explantes apicales, en los que la dominancia apical se mantuvo, por lo que se evitó la formación de brotes nuevos y se observó respuesta solamente en presencia de la combinación de BA con ANA, resultados similares fueron observados por Choreño-Tapia y cols. (2002) con *Cephalocereus senilis*, al obtener mejores resultados en los explantes basales en concentración de 0.3/3 mg/l de ANA/BA, así como Giusti y cols. (2002) para

Mammillaria pectinifera y *Escobaria minima* con 0.01/5 mg/l de ANA/BA y para *Pelecypora aselliformis* 0.01/5 mg/l de ANA/Kin.

Tabla 14. Respuesta de los explantes de *Mammillaria hernandezii* a los tratamientos con fitoreguladores al año de cultivo.

| ANA/BA (mg/l) | Explantes apicales | | Explantes basales | | Explantes radiculares | |
|------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|---|
| | \bar{X} Brotes/ explante | Explantes con brotes/Total de explantes | \bar{X} Brotes/ explante | Explantes con brotes/Total de explantes | \bar{X} Brotes/ explante | Explantes con brotes/Total de explantes |
| 0 | 0 | 0 | 0.67 | 3/4 | 0 | 0 |
| 0/1 | 0 | 0 | 1.75 | 2/4 | 3.5 | 2/4 |
| 0/2 | 0 | 0 | 1.5 | 3/4 | 0 | 0 |
| 0/3 | 0 | 0 | 2.8 | 4/5 | 0.25 | 1/4 |
| 0.1/3 | 0.75 | 2/5 | 2.5 | 4/4 | 0 | 0 |
| 0.5/1 | 0.25 | 1/4 | 0.25 | 1/4 | 0 | 0 |
| 0.5/2 | 1 | 2/3 | 1.25 | 3/4 | 0 | 0 |
| 0.5/3 | 7.25 | 1/4 | 0.5 | 3/5 | 4.5 | 1/4 |

En general, para que exista formación de brotes, fue necesario proveer al explante con una elevada concentración de citocininas y una baja o nula concentración de auxinas, lo que ha sido reportado para diversas especies de cactáceas, como *Mammillaria bocasana* que produjo 3.8 brotes en presencia de 10 mg/l de Kin, *M. pectinifera* con 4.3 brotes en 6 mg/l de Kin, *M. densispina* produjo 4.6 brotes con 10 mg/l de Kin, *M. picta* en presencia de 2/10 mg/l de AIA/Kin produjo 6.4 brotes y *M. perbella* con 1/10mg/l de AIA/Kin originó 7.9 brotes, todas ellas con un período de inducción de 2 meses con un subcultivo cada mes a medio fresco con fitoreguladores (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007), se ha visto que las cactáceas responden mejor a elevadas concentraciones de citocininas y en diversos casos la producción endógena de auxinas es suficiente para obtener respuestas favorables de los explantes (Hubstenberger *et al.*, 1992; Clayton *et al.*, 1990; Giusti *et al.*, 2002), lo cual se pudo comprobar en el presente estudio.

La formación de brotes en los explantes basales resultó similar a los reportados por Lázaro (2014), quien encontró la mayor proliferación de brotes al utilizar explantes laterales de tallo de plántulas en presencia de 2 mg/l de Kin o 0.24mg/l de TDZ con 2.9 y 2.8 brotes por explante respectivamente, y a su vez es notable señalar que los resultados obtenidos en la presente investigación se produjeron al utilizar BA, fitoregulador que fue descartado por Lázaro (2014), por lo que no fue ampliamente explorado en su investigación. Estos resultados diferenciales entre estas investigaciones pueden deberse además a la utilización de diferente medio de soporte del medio de cultivo, ya que Lázaro (2014) utilizó medio MS semisólido, mientras que en la presente investigación se utilizó medio MS líquido con puentes de papel filtro, lo cual permite mayor disponibilidad de nutrientes y fitoreguladores, lo que posiblemente pudo mejorar la respuesta morfogénica obtenida.

La organogénesis directa de los explantes basales y apicales se originó a partir de la zona de corte, así como mediante la activación de yemas preformadas, sin embargo para comprobar el sitio de origen de los brotes regenerados, sería necesario realizar estudios histológicos detallados para asegurar su origen a partir de los meristemos axilares y/o apicales de los podarios, así como definir su origen a partir de células epidérmicas, subepidérmicas, entre otras en lugares sin meristemos aparentes. Este tipo de regeneración a partir de yemas preformadas, ha sido obtenido en diversas especies de cactáceas (Choreño-Tapia *et al.*, 2002), y se ha visto que es posible presentar dicha respuesta en presencia de citocininas; sin embargo, Rubluo y cols. (2002) observaron activación de yemas preformadas en cultivos de *Mammillaria san-angelensis* mediante la adición de 6mg/l de AIA; y de igual manera, García y Malda (2009) regeneraron *Mammillaria mathildae* a partir de activación de yemas preformadas en medio sin fitoreguladores.

Se ha reportado la producción de diferentes tipos de brotes regenerados, los cuales presentan una apariencia distinta a la deseada, por ejemplo se producen brotes hiperhidratados o compactos (Ronquillo, 2009). En la presente investigación, todos los brotes producidos presentaron una apariencia normal, semejante a las plántulas obtenidas de la germinación, incluso las provenientes de organogénesis indirecta. Esto es de importancia ya que al tener plantas bien formadas, es posible acortar los tiempos de propagación al evitar la fase de corrección de la apariencia física y fisiológica de las mismas, con lo que a su vez se favorece su aclimatización.

Enraizamiento y Aclimatización

Al individualizar los brotes regenerados y sembrarlos en medio MS 50/100 adicionado con carbón activado, se logró al séptimo día la formación de las raíces en todos los brotes individualizados, con 100% de sobrevivencia de las plántulas en condición *in vitro* a los tres meses de su siembra. Se llevó a cabo la formación de una raíz principal, la cual comenzó a engrosarse después de un mes de su formación, y al mismo tiempo se comenzaron a formar raíces secundarias, lo cual concuerda con las características de la especie que presenta una raíz napiforme. La formación de raíces en medio con carbón activado pudo deberse a que el carbón activado oscurece el medio de cultivo, propiciando una acumulación de auxinas endógenas, al inhibir la penetración de luz y la degradación de las auxinas por medio de ésta, además de que se ha demostrado que la presencia de carbón activado en el medio de cultivo reduce los niveles de BA, lo que promueve el enraizamiento (Hemphill *et al.*, 1998 citado en Pérez-Molphe y Dávila, 2002).

La formación de raíces en medio libre de fitoreguladores ha sido reportada por otros autores como Pérez-Molphe y Dávila (2002) con *Peleciphora aselliformis* y *P. strobiliformis* que obtuvieron una mejor generación de raíces en medio libre de fitoreguladores adicionado con 3 g/l de carbón activado al concluir seis semanas de

cultivo; Ruvalcaba y cols. (2010) con *Coryphantha retusa* obtuvieron 100% de enraizamiento en medio MS basal (tiempo no definido); Rubluo y cols. (2002) obtuvieron el enraizamiento de todos los brotes regenerados de *Mammillaria san-angelensis* en medio MS basal en 6 semanas; Aíra de Medeiros y cols. (2006) para *Notocactus magnificus* obtuvieron 45% de brotes enraizados en 8 meses; Lázaro (2014) para *M. hernandezii* obtuvo el 95% de brotes enraizados después de 4 semanas de cultivo en medio MS. Estos resultados pudieron ser debidos a la producción endógena de auxinas, así como la reducción de fitoreguladores en el medio de cultivo, incrementado por la adición de carbón activado en algunos cultivos.

Después de un año de su enraizamiento, se tomaron 45 plántulas obtenidas de la muestra 1 con raíces de alrededor de 1 cm de longitud bien formadas para transferirse a condición *ex vitro* (Fig. 20). Después de extraer las plantas del frasco, se observó una disminución en sus dimensiones, tanto en altura como en volumen, lo cual pudo ser debido a que en condición *in vitro* existe una humedad relativa elevada, así como disponibilidad de nutrientes y agua; por lo que al estar *ex vitro*, dicha humedad y suministro de nutrientes se ven limitados, por lo que las plantas se contraen, similar a lo que sucede en condiciones de campo con las fluctuaciones entre lluvia y sequía (Santini, 2009; Santini y Martorell, 2013; Rodríguez Ortega *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha visto la necesidad de dicho periodo de deshidratación para favorecer el establecimiento y la sobrevivencia de las plántulas en condición *ex vitro*, evitando la pudrición de las mismas, lo cual fue reportado por Ramírez-Malagón y cols. (2007) con varias especies del género *Mammillaria* en donde casi el total de las plantas aclimatizadas sufrieron pudrición de las raíces, afectando su establecimiento *ex vitro*, de ahí que sea conveniente aplicar un período de deshidratación de las plántulas regeneradas *in vitro* previo a su establecimiento en suelo.



Fig 20. Diferentes tamaños de las plántulas regeneradas de *M. hernandezii* seleccionadas para su aclimatización, provenientes de explantes basales y apicales de manera directa e indirecta. Se observan plántulas desde 0.7 a 2cm de longitud del tallo.

Después de seis meses de aclimatización de plántulas de *M. hernandezii* en condiciones de invernadero, se obtuvo 100% de sobrevivencia de las mismas (Fig. 21), similar a lo reportado por Lázaro (2014) con 95% de sobrevivencia a los dos meses de aclimatización, este porcentaje es elevado comparado con otras especies de cactáceas aclimatizadas (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007; Malda *et al.*, 1999), como sucedió con *Notocactus magnificus* en el cual solo 20% de las plantas regeneradas sobrevivió la

aclimatización (Aíra de Medeiros *et al.*, 2006). Los primeros días de aclimatización, son los de mayor importancia para la sobrevivencia de las plantas propagadas, debido al alto porcentaje de pérdida de agua, así como la baja producción de ceras y disfunción de los complejos estomáticos, características que se pueden adquirir dentro de los primeros 15 días de aclimatización y se estabilizan después de tres meses (Malda *et al.*, 1999). Esta alta sobrevivencia de las plántulas concuerda con lo reportado por Bhagyalakshmi y Singh (1995) en plantas de plátano propagadas en medio líquido y sólido, encontrando una mayor sobrevivencia en plantas cultivadas en medio sólido, debido probablemente a que el cambio de las plantas de condición *in vitro* a *ex vitro* resulta menos drástico al provenir de medio sólido ya que la disponibilidad tanto de nutrientes como de agua es menor, lo que concuerda un poco con las características de la vida silvestre. En la presente investigación la fase de inducción se realizó en medio líquido con el fin de obtener mayor formación de brotes al encontrarse más disponibles los nutrientes y la fase proliferativa y de enraizamiento en medio sólido para favorecer el establecimiento y sobrevivencia *ex vitro*.



Fig 21. Plántulas de *M. hernandezii* a los 2 meses de iniciado el proceso de aclimatización, cultivadas en una mezcla de Tepojal, Tezontle, Tierra Negra, Agrolita y Sphagnum.

4. Perspectivas

Por lo tanto, como perspectivas de esta investigación, sería importante conjuntar los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en la investigación de Lázaro (2014) con el fin de generar un método de propagación más eficiente que permita contar con un alto

número de individuos, por ejemplo el uso de las concentraciones de kinetina y TDZ halladas por Lázaro, suministradas en medio líquido con puentes de papel filtro, según la eficiencia de ese sistema encontrada en la presente investigación, o incluso en sistemas de inmersión temporal; para entonces: a) poder proyectar la reintroducción de los mismos en la proporción que se encuentren en tales poblaciones, y de esa manera no alterar su balance en tal aspecto en el hábitat; b) al contar con un alto número de individuos se podría pensar en abastecer al mercado que hoy comercia de manera ilegal con esta especie; c) se contaría con individuos que posiblemente permitirían realizar nuevas investigaciones en otras áreas de la ciencia sin detrimento de las poblaciones naturales. Acciones como estas harían posible propiciar una real sobrevivencia de la especie. Hoy la prioridad número uno es reproducir esta y otras especies lo antes posible, mediante cualquier procedimiento disponible.

De igual manera resulta de gran importancia seguir explorando el potencial regenerativo de los explantes radicales, mediante la adición de otros reguladores de crecimiento como son los empleados por Lázaro (2014): kinetina, TDZ y metatopolina. Asimismo, deberán realizarse estudios de estabilidad genética a las plantas generadas, más aún a aquellas obtenidas vía indirecta. Estos análisis deberán practicarse de manera periódica a los ejemplares almacenados, tengan o no mucho tiempo en cultivo *in vitro*. Es deseable realizar cortes histológicos de cultivos regenerativos y de las plantas en regeneración para obtener mayor información sobre el desarrollo ontogénico de los individuos y de la especie. Del mismo modo, es necesario el seguimiento de las plantas en aclimatización que las lleve a una condición autótrofa, así como para comprobar la fertilidad de las mismas y de esta manera que sea posible la reintroducción de ejemplares a la naturaleza en caso de ser necesario.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son de gran importancia debido al grado de amenaza de la especie en estudio, así como la baja o incluso nula cantidad de estudios enfocados a la conservación de la misma; de igual manera, es una manera de contribuir a la conservación de la especie al generar cultivos asépticos de la misma, con potencial regenerativo, así como la generación de plantas libres de parásitos y que podrían llegar a ser accesibles para su venta y de esta manera disminuir el saqueo ilegal.

5. Conclusiones

- Se logró establecer una metodología de desinfección de semillas de *Mammillaria hernandezii* y se obtuvo 100% de semillas cultivadas asépticamente *in vitro*.
- Se comprobó el fotoblastismo positivo citado en la literatura de las semillas de *M. hernandezii* al presentarse solo 10% de germinación en condiciones de oscuridad.

- La germinación de semillas de reciente colecta se da de manera más rápida que de semillas almacenadas.
- La desinfección de las plantas de invernadero no fue exitosa, por lo que se recomienda un pre-tratamiento de desinfección en el invernadero.
- El medio MS 50/100 líquido con puente de papel filtro resultó ser más eficiente para la proliferación de *M. hernandezii* en comparación con medio sólido.
- La mejor respuesta vía organogénesis directa del explante apical proveniente de plántulas regeneradas *in vitro* (muestra 3) fue el de 0.5/2 mg/l ANA/BA, al obtener formación de brotes en 2 de 3 explantes, obteniendo en promedio 1 brote por explante a lo largo de un año, generando 3 plantas totales.
- El tratamiento que dio origen a una mayor cantidad de brotes en los explantes apicales de plántulas regeneradas *in vitro* (muestra 3) vía organogénesis indirecta fue el de 0.5/3 mg/l ANA/BA, al formarse 29 brotes totales a partir de un explante al concluir un año de iniciados los cultivos.
- Los mejores tratamientos para los explantes basales de plántulas regeneradas *in vitro* (muestra 3) fueron 0/3 y 0.1/3 mg/l ANA/BA, al obtener formación de brotes en el 80 y 100% de los explantes con un promedio de 2.8 y 2.5 brotes por explante respectivamente al término de 1 año de cultivo, generando 14 y 10 plantas totales por tratamiento respectivamente.
- El mejor tratamiento para los explantes radicales de plántulas regeneradas *in vitro* (muestra 3) fue 0/1 mg/l ANA/BA, al presentar respuesta en 2 de 4 explantes, originando en promedio 3.5 brotes por explante vía organogénesis directa e indirecta al término de un año de cultivo, generando 14 plantas totales.
- El tratamiento que dio origen a una mayor cantidad de brotes en los explantes radicales de plántulas regeneradas *in vitro* fue el de 0.5/3 mg/l ANA/BA, al formarse 18 brotes totales vía organogénesis indirecta a partir de un explante al concluir un año de iniciados los cultivos.
- El explante del cual se obtuvo mayor formación de brotes de plántulas regeneradas *in vitro* vía indirecta y directa fue el basal, al obtener brotes en todos los tratamientos empleados (47 totales, $\bar{X}=1.6/\text{explante}$), seguido del explante apical con 36 brotes totales ($\bar{X}=1.2/\text{explante}$), para finalizar con el explante radical con 33 brotes totales ($\bar{X}=1/\text{explante}$) al finalizar un año de iniciados los cultivos.

- El enraizamiento de todos los brotes (~200) se obtuvo en medio MS 50/100 con 0.5g/l de carbón activado sin la presencia de fitoreguladores, dentro de la primera semana de su siembra.
- Se obtuvo 100% de sobrevivencia de 45 plantas aclimatizadas a lo largo de seis meses en condición de invernadero.
- Se obtuvo un protocolo de propagación mediante Cultivo de Tejidos Vegetales de la cactácea amenazada *M. hernandezii*.

6. Bibliografía

- ANDERSON F. E. (2001). The cactus Family. Timber Press. Portland, Oregon. 776 p.
- AÍRA DE MEDEIROS, Lígia, Roberval Cássia Salvador de Ribeiro, Luiz Antonio Gallo, Enio Tiago de Oliveira & Maria Esmeralda Soares Payao Dematte (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 165–169.
- APARECIDA de Oliveira, Sandra, María de Fátima Pires da Silva Machado, Alberto José Prioli and Claudete Aparecida Mangolin (1995). *In vitro* Propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:47-50.
- ARAKAKI, M., P. Christin, R. Nyffeler, A. Lendel, U. Eggil, R. Ogburn, E. Spriggs, M. Moore and E. Edwards (2011). Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. PNAS. 108 (20): 8379-8384.
- ARIAS Montes, Salvador, Susana Gama López, L. Ulises Guzmán Cruz y Balbina Vázquez Benítez (2012). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Fascículo 95. Cactaceae Juss. 2ª edición. Instituto de Biología, UNAM. México, DF. 246p.
- BALVANERA, P., H. Cotler *et al.* (2009). Estado y tendencias de los servicios ecosistémicos, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, pp. 185-245.
- BECERRA, R. (2000). Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. Biodiversitas 32:1-5.
- BHAGYALAKSHMI & Narendra S. Singh (1995). Role of liquid versus agar-gelled media in mass propagation and *ex vitro* survival in bananas. Plant Cell Tissue and Organ Culture 41:71-73.
- BHAU, Brijmohan Singh (1999). Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. Scientia Horticulturae 81: 337-344.
- BISBY, F.A. (1995). Characterization of biodiversity, en V.H. Heywood y R.T. Watson (eds.), Global biodiversity assessment. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 21-106.
- BRAVO-HOLLIS H. (1978). Las cactáceas de México. Vol. I UNAM. México. 741p.
- BRAVO-HOLLIS H. y H Sánchez-Mejorada. (1991). Las cactáceas de México. Vol. III UNAM. México. 791p.
- CABALLERO, J. y L. Cortés (compiladores). (2012). Lista de las especies presentes en las colecciones de plantas vivas de los jardines miembros de la Asociación Mexicana de

Jardines Botánicos A.C. En: J Caballero (Coordinador). Jardines Botánicos: contribución a la conservación vegetal de México. Conabio. México. Disco Compacto.

- CASAS, A. (2002). Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. CONABIO. Biodiversitas 40:18-23.
- CASTILLO-CAMPOHERMOSO A.D., A. López-Espinosa e I. Ocampo-Fletes (2010). Conocimiento y Uso de Cactáceas por Familias Campesinas en Coxcatlán, Puebla. Ra Ximhai 6 (3): 347-353.
- CCA (2005). El comercio ilegal de flora y fauna silvestres. Perspectivas de América del Norte. Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, Montreal.
- CHOREÑO-TAPIA, J.M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera (2002). Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areólas. Revista Chapingo Serie Horticultura 8 (2): 183-196.
- CLAYTON, Philip, John F. Hubstenberger and Gregory C. Phillips (1990). Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 (2): 337-343.
- CONABIO. Datos tomados del Sitio de la CONABIO en el 2012 en Internet: <http://www.biodiversidad.gob.mx/>
- CONAPO. Datos tomados del Sitio de la CONAPO en Internet: <http://www.conapo.gob.mx/>
- FERNÁNDEZ Téllez, María Alejandra (2014). Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- FLORES, Joel, Enrique Jurado and Alberto Arredondo (2006). Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, Mexico. Seed Science Research. 16: 149–155.
- GAMFELDT, L., T. Snäll, R. Bagchi, M. Jonsson, L. Gustafsson, P. Kjellander, M. Ruiz-Jaen, M. Froberg, J. Stendahl, C. Philipson, G. Mikusinski, E. Andersson, B. Westerlund, H. Andren, F. Moberg, J. Moen & J. Bengtsson (2013). Higher levels of multiple ecosystem services are found in forests with more tree species. Nature Communications, Macmillan Publishers Limited. 4:1340.
- GARCÍA Rubio, Oscar y Guadalupe Malda Barrera (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.
- GEORGE, Edwin F., Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (2008). The Componentes of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Netherlands, 115-173p.
- GIUSTI, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo, M. Tucci (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae 95: 319–332.
- GODÍNEZ, Alvarez, Héctor and Pablo Ortega Baes (2007). Mexican cactus diversity: environmental correlates and conservation priorities. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 81: 81-87.
- GONZÁLEZ Caballero, Octavio (2008). Regeneración *in vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R.A.Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- GONZÁLEZ Medrano, F. (2003). Las comunidades Vegetales de México. 1ª edición. INE, SEMARNAT. México. 77p.
- GUZMÁN, U., S. Arias y P. Dávila (2007). Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIBCONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.

- HERNÁNDEZ, M.H. (2006). La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económica, México.
- HERNÁNDEZ, H.M. and R.T. Bárcenas (1995). Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conservation Biology* 9: 1176-1188.
- HERNÁNDEZ, Hector M. Y Hector Godinez A. (1994). Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 26: 33-52.
- HERNÁNDEZ, H.M., Verónica Alvarado y Roberto Ibarra (1993). Base de datos de Colecciones de Cactáceas de Norte y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología, UNAM Ser. Bot.* 64(2): 87-94.
- HVOSLEF-EIDE, A.K. and W. Preil (2005). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. © 2005 Springer. Printed in Netherlands. 588p.
- HUBSTENBERGER, J. F.; P.W. Clayton y G.C. Phillips. (1992). Micropropagation of cacti. En: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer Verlag, Heidelberg,, pp. 1-37.
- INEGI. Datos tomados de Sitio del INEGI en Internet: www.inegi.org.mx.
- JONES Castro, Fiorella y Dora Flores Mora (2007). Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*. 20 (3): 46-54.
- JORDÁN, Miguel y José Casaretto (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En F. A. Squeo & L. Cardemil, eds., *Fisiología Vegetal (Capítulo XV)*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- LAMONT, B.B. y N.J. Enright (2000). Adaptive advantages of aerial seed banks. *Plant species Biology* 15, 157-166.
- LÁZARO Castellanos, Jesús Omar (2014). Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii* Glass & Foster y *Mammillaria dixanthocentron* Backeb. ex Mottram y análisis de estabilidad genética de sus regenerantes. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- LENKA, Sangram K., Nadia Boutaoui, Bibin Paulose, Kham Vongpaseuth, Jennifer Normanly, Susan C Roberts and Elsbeth L Walker (2012). Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. *BMC Genomics*. 13:148.
- LLORENTE-BOUSQUETS, J., y S. Ocegueda (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 283-322.
- LOYOLA-Vargas, Victor M. y Felipe Vázquez-Flota (2006). *Plant Cell Culture Protocols*. 2nd edition. Humana Press. Totowa, New Jersey. Printed in the United States of America. 411p.
- MALDA, Guadalupe, Humberto Suzán and Ralph Backhaus (1999). *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81, 71-87.
- MANZO Rodríguez, Sinai Mariana (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. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillos.
- MARTORELL, C. y E.M. PETERS (2008). Disturbance-Response Analysis: a Method for Rapid Assessment of the Threat to Species in Disturbed Areas. *Conservation Biology*, 23 (2): 377–387.
- MATA Rosas, Martín, Mario Alberto Monroy de la Rosa, Katja Moebius Goldammer and Víctor M. Chávez Avila (2001). Micropropagation of *Turbincarpus Laui* Glass et Foster, an Endemic and Endangered Species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:400-404.

- MÉNDEZ-LARIOS, I., Enrique Ortiz y José Luis Villaseñor (2004). Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 75 (1): 87-104.
- MOEBIUS-GOLDAMMER, Katja G., Martín Mata-Rosas y Víctor M. Chávez-Ávila (2003). Organogénesis 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.
- MORA C, D.P. Tittensor, S. Adl, AGB Simpson, B. Worm (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol* 9(8): e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127.
- NARANJO, E.J., R. Dirzo *et al.* (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna, en *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, pp. 247-276.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo específicas para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección* (Jueves 30 de diciembre de 2010), México, pp. 1–78.
- OLGUÍN Santos, Laura Patricia (1994). Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ORTEGA Baes, P y H. Godínez Álvarez (2006). Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15: 817-827.
- PALOMINO, G., J.Dolezel, R. Cid, I. Brunner, I. Méndez and A. Rubluo (1999). Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxin in long-term *in vitro* culture. *Plant Science* 141: 191-200.
- PAPAFOIQU, Maria, George N. Balotis, Panayiota T. Louka & John Chronopoulos (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163–167.
- PÉREZ-MOLPHE, Eugenio, Martha Evelia Pérez-Reyes and Ma. de Lourdes de la Rosa-Carrillo (2012). *In vitro* conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *Haseltonia* 17: 51-57.
- PÉREZ-MOLPHE, Eugenio and Carlos Antonio Dávila-Figueroa (2002). *In Vitro* Propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 73–78.
- PETERS, E. y C. Martorell (2001). Conocimiento y conservación de las *Mammillarias* endémicas del Valle de Tehuacán- Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. Informe Final SNIB-CONABIO proyecto No. R166. México D. F.
- PRASAD, V.S.S. and S. Dutta Gupta (2006). *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 63-271.
- RAMÍREZ-MALAGÓN, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Perez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43: 660–665.
- REBOLLO, S., D. G. Milchunas, I. Noy-Meir and P. L. Chapman (2002). The role of a spiny plant refuge in structuring grazed shortgrass steppe plant communities. *OIKOS* 98: 53–64.
- ROBBINS, C.S. (ed.) (2003). *Prickly trade: Trade and conservation of Chihuahuan Desert cacti*. traffic-World Wildlife Fund, Washington, D.C.

- RODRÍGUEZ-ORTEGA, César Edgardo (2008). Consecuencias Demográficas y Evolutivas del Secuestro de Semillas en tres Especies del Género *Mammillaria* (Cactaceae). Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- RODRÍGUEZ-ORTEGA, C, M. Franco y M.C. Mandujano (2006). Serotiny and seed germination in three threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Basic and Applied Ecology* 7: 533—544.
- RODRÍGUEZ, Ramón Gerardo G., Ma. Eufemia Morales R., Ma. Julia Verde S., Azucena Oranday C., Catalina Rivas M., Ma. Adriana Núñez G., Gloria M. González G., Jaime Fco. Treviño N (2010). Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41 (1): 55-59.
- RONQUILLO Vázquez, Neri (2009). Regeneración *in vitro* y Conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae* Cutak. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- RUBLUO, Abraham, Teresita Marín-Hernández, Karina Duval, Agustín Vargas and Judith Márquez Guzmán (2002). Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultures *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia horticultrae* 95: 341-349.
- RUVALCABA-RUIZ, D., D. Rojas-Bravo y A.J. Valencia-Botín (2010). Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 139-143.
- SANTINI González, B.A (2009). Efecto del Preacondicionamiento (priming) y la liberación oportuna de las semillas retenidas sobre el éxito del establecimiento en la especie serótina *Mammillaria hernandezii* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- SANTINI, Bianca y Carlos Martorell (2013). Does retained-seed priming drive the evolution of serotiny in drylands? An assessment using the cactus *Mammillaria hernandezii*. *American Journal of Botany* 100(2): 365-373.
- SANTOS del Blanco, L., R. Chambel, E. Notivol, R. Alía y J. Climent (2013). Ecología evolutiva de la reproducción en dos pinos mediterráneos: *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. 6° Congreso Forestal Español. © Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- SANTOS Díaz, María del Socorro, José Manuel Martín del Campo Macías, Alberto Arredondo Gómez y María de Lourdes Santos Díaz (2001). Efecto del Medio de Cultivo, Cinetina y Agentes Osmóticos sobre la Respuesta Morfogenética de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae) *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.*, 24 (2): 133-138.
- SANTOS-DÍAZ, María del Socorro, Ricardo Méndez-Ontiveros, Alberto Arredondo-Gómez and María de Lourdes Santos-Díaz (2003). *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 480-484.
- SEMARNAT. (2013). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México.
- SIACON. (2012). Sistema de información agropecuaria de consulta (Siacon), en <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=2>, (Consultado el 5 de noviembre de 2013).

- SMULDERS, M.J.M. and G.J. de Klerk (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulators* 63:137-146.
- SPOMER, L. ART and Mary Ann Lila SMITH (1996). Direct Measurement of Water Availability in Gelled Plant Tissue Culture Media. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32:210-215. © 1996 Society for In Vitro Biology.
- TAIZ, Lincoln y Eduardo Zeiger (2010). *Plant Physiology*. 5th edition. Sinauer Associates. 782p.
- TÉLLEZ, O (2006). *Proyecto Evaluaciones de Conservación de Especies de Cactaceae en Peligro de Extinción. Informe Final.* Disponible en Línea en: [http://www.poramoralplaneta.com.mx/ganadores/2006/docs/Inf_vw_final_Sept2009.pdf]
- TÉLLEZ, O, P. Dávila, M. Ayala, K. Gutiérrez e I. Melchor (2007). Case studies on the effect of climate change on the flora of Mexico. *Botanic Gardens Conservation International*, 4 (2) Disponible en línea en: <http://www.bgci.org/resources/article/0567/>.
- TILMAN, D y Clarence Lehman (2001). Human-caused environmental change: Impacts on plant diversity and evolution. *Colloquium*, 98 (10): 5433-5440.
- TREJO Orozco, C.K., C. Ramírez Serrano y R. Soltero Quintana (2005). Micropropagación de cactáceas. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA.*, pp. 542-546.
- TRIGIANO, R. y D. Gray (2004). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. USA. 358p.
- URETA, Carolina y Carlos Martorell (2009). Identifying the impacts of chronic anthropogenic disturbance on two threatened cacti to provide guidelines for population-dynamics restoration. *Biological Conservation* 142, 1992–2001.
- Velázquez, A., J.F. Mas, J.R. Díaz-Gallegos, R. Mayorga-Saucedo, P.C. Alcántara, R. Castro, T. Fernández, G. Bocco, E. Ezcurra y J.L. Palacio (2002). Patrones y tasas de cambio de uso de suelo en México. *Gaceta* 62. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT, México pp. 21-37.
- VILLASEÑOR, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28: 160-167.
- VILLASEÑOR, J. L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75: 105-135.
- VILLASEÑOR, J. L. y Enrique Ortiz (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 134-142.
- VIÑAS, María, Mainor Fernández-Brenes, Alvaro Azofeifa and Víctor M. Jiménez (2012). *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. ©The Society for In Vitro Biology.
- VRCIBRADIC, Davor y Carlos Frederico Duarte Rocha (2002). Use of cacti as heat sources by thermoregulating *Mabuya agilis* (Raddi) and *Mabuya macrorhyncha* Hoge (Lacertilia, Scincidae) in two restinga habitats in southeastern Brazil. *Revta bras. Zool.* 19 (1): 77-83.
- WEN, Wei, Wen-Ing Hwang, Se Young Kim and Yoneo Sagawa (1997). Induction of Somatic Embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 50 (2): 91-95.
- WOLF, B. O. and C. Martínez del Rio (2002). How Important Are Columnar Cacti As Sources Of Water And Nutrients For Desert Consumers? A Review. *Isotopes Environ. Health Stud.*, 39 (1): 53–67.
- WYKA, TomaszP., Marta Hamerska and Marta Wróblewska (2006). Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87 :27-32.

- YÁÑEZ Martínez, Marisela (2011). Regeneració *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.