



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb.
(Cactaceae), especie endémica amenazada

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ERIKA BAUTISTA MONTES



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

Ciudad de México

2016



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

Bautista
Montes
Erika
55 49 19 63 16
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308071544

2. Datos del tutor

Dra.
Ana Laura
López
Escamilla

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Ángel Salvador
Arias
Montes

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Laura Patricia
Olguín
Santos

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Octavio
González
Caballero

7. Datos del trabajo

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica
amenazada
85 p.
2016

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias dentro de las actividades del taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla.

A la memoria de mi madre Reyna y mi abuela Auguria quienes me brindaron todo su amor y apoyo, jamás dejaré que sus enseñanzas mueran

La verdadera muerte es el olvido

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, máxima casa de estudios, por permitirme crecer como persona, por todas las enseñanzas tanto en el área académica como en la vida misma, iniciando desde las aulas preparatorias.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla académico del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología de la UNAM por todo el apoyo, comprensión y compromiso para realizar este trabajo.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, Técnico Académico quien estuvo a cargo de la Unidad de Ambientes Controlados, por facilitar el uso de las cámaras de ambientes controlados para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* y el invernadero de la Facultad de Ciencias durante la aclimatización de las plantas propagadas, además por sus enseñanzas, asesoría y revisión del manuscrito.

Al Dr. Ángel Salvador Arias Montes, la Dra. Sonia Vázquez Santana y al M. en C Octavio González Caballero por sus comentarios que enriquecieron este trabajo y por todas las enseñanzas que me proporcionaron dentro del aula.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco y al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong Técnicos Académicos responsables del Laboratorio de Desarrollo en Plantas por toda la asesoría técnica y paciencia para realizar este proyecto.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León, Técnico Académico responsable del Taller de Plantas I y II, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las instalaciones y equipos para llevar a cabo algunos experimentos de este proyecto.

A la Biól. Laura Lorena Rodríguez Núñez por el establecimiento *in vitro* de las semillas de *Mammillaria humboldtii* utilizadas en esta investigación.

A las profesoras del taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Karina Jiménez Duran, Dra. Ana Laura López Escamilla y M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por todas sus enseñanzas y consejos.

Personales

Son tantas las personas a quienes quiero agradecer, que difícilmente podré plasmar el nombre de cada uno, sin embargo sé que ustedes sabrán de mi gratitud en algún momento de la vida, si no es que ya lo saben.

A Fernando, por todo el apoyo que me ha brindado desde hace 18 años y contando, por estar ahí en los momentos más difíciles y por mantenerse ahí para mí a pesar de mi tan peculiar personalidad. No dejaré que el vínculo que nos une desaparezca.

A mis tíos, Olivia y Gustavo, por formar parte de mi vida desde bebé, ustedes han plasmado su huella en mí para siempre. A pesar del tiempo, la distancia y las adversidades tienen un lugar especial en mis memorias. A mi primo Juan Carlos, con quien compartí peleas y risas siendo niños.

A Juan José, de quien he aprendido muchísimo en la vida, has sido mi gran ejemplo académico, la distancia no ha impedido que nos unamos ante las adversidades.

A Gorette, quien sin la responsabilidad de ofrecerme su hombro en lo peor, lo hizo. Por estar ahí, mantenerme la pista y por querer encaminarme por el buen camino de la ciencia e investigación. Hasta una prima me diste, gracias.

A Juan Montes, por brindarme su apoyo en esta vida, muy a su manera, pero sé que está ahí, abuelo te quiero.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

A Ana y Paty, por todo el apoyo incondicional, por esos jalones de oreja, risas y momentos inigualables, ustedes son el pilar de la familia CTV, no dejen que muera el espíritu y la pasión por lo que hacemos.

A Octavio, quien con clase a clase me transmitió su pasión por el CTV, inspiró en mí el interés por la biotecnología vegetal y me demostró que los excelentes profesores sí existen.

A Laura Clapés, mi guía en la apreciación más nutricia de esta vida, agradezco infinitamente a la vida y a Dianita el haberte conocido, sin duda sé que todo tiene sentido en esta vida aunque no lo veamos en principio.

A mis grandes amigas de antaño, Daniela y Karent, ustedes son mi pasado, presente y espero que futuro más bello desde la primaria y secundaria, me han demostrado que son un verdadero apoyo incondicional para mí, gracias por abrirme las puertas de sus hogares.

A Sonia, Mónica, Franco y Miguel, a quienes conocí cuando éramos unos cachorros de puma, mil gracias por todas esas ocurrencias, risas y apoyo durante todos estos años. No cabe duda que con ustedes comencé a vivir cosas totalmente nuevas para mí, gracias por ser mis confidentes y amigos a través de los años.

A Laura y Marcelo, por ser mi placozoo favorito, con ustedes las clases y prácticas de campo fueron sublimes. Hemos y seguimos compartiendo momentos tan variados que no lograría recordarlos todos. Agradezco enormemente que sean mis amigos, su apoyo en las buenas y en las malas no lo cambiaría por nada. ¡Arre!

A Yes, otro de mis más grandes apoyos en esta vida, no sólo eres la primera persona con quien hablé en ese primer día de clases de la carrera, también eres alguien de quien puedo aprender demasiado en las artes del perdón, espero al menos cachar una pizca de los sentimientos tan nobles que tienes hacia para los demás. Igualmente agradezco a tu familia por hacerme sentir como uno de los suyos.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

A Cris, Claudio y Kevin, con ustedes compartir el mundo del CTV fue mucho mejor, cuando estoy con ustedes el tiempo se vuelve tan relativamente corto, agradezco todos los momentos llenos de risas y retroalimentación, me han enriquecido como no se lo imaginan.

A Enya por ser una gran amiga, por acompañarme durante las arduas jornadas de trabajo en el laboratorio, tu compañía y apoyo son excepcionales.

A Dulcerri y Mine, chicas con ustedes rio como no tienen idea, las comidas se vuelven toda una experiencia gratificante. Quiero que formen parte de mi dieta en esta vida que aún me falta por vivir.

A Diana y Humberto gracias por darme el empujón necesario para ir en busca del CTV; Yeimi, tu calidez es inigualable; Arturo, contigo las pláticas y el café/chocolate saben mucho mejor; Andreopsida, tu sarcasmo y claridad realmente son los mejores, sabes que te quiero infinitamente. Lulú, Rosy y Yuri, gracias por soportarme en mi hablar y hablar mientras ustedes trabajaban; Lore gracias por haberme donado el material necesario para realizar este proyecto y por resolverme mis dudas interminables; Lalo mi compadre del alma, sabes que tienes un lugar muy especial en mi ser. A mis ponis Luis y Joselin, con quienes compartí grandes aventuras en aquel primer semestre de la carrera, la distancia no hará que los deje de querer por montones.

A mis compañeros del laboratorio, Sandra, Ikal, Alde, Nadia, Vera, Valeria, Rocío, Moni, Ric, las Dras., Ma. Félix, con quienes aprendí a relacionarme mejor, a disfrutar de la vida y a que sí la hago como vendedora de postres.

Sencillamente gracias a todos, cada uno de ustedes ha plasmado algo en mi ser y ha contribuido en lo que soy, sus palabras de aliento para finalizar este trabajo fueron de suma importancia. Agradezco inmensamente a la vida el haberlos presentado ante mí.

| | | |
|---|---------------|-----------|
| | ÍNDICE | 10 |
| ABREVIATURAS | | 11 |
| RESUMEN | | 12 |
| INTRODUCCIÓN | | 14 |
| ANTECEDENTES | | 14 |
| Generalidades de la familia Cactaceae | | 16 |
| Problemática de las cactáceas | | 18 |
| Género <i>Mammillaria</i> | | 19 |
| <i>Mammillaria humboldtii</i> | | 23 |
| Estrategias de conservación | | 25 |
| Cultivo de Tejidos Vegetales | | 30 |
| Micropropagación | | 32 |
| Micropropagación en cactáceas | | 33 |
| Micropropagación en <i>Mammillaria</i> | | 39 |
| JUSTIFICACIÓN | | 39 |
| OBJETIVOS | | 39 |
| Objetivo general | | 39 |
| Objetivos particulares | | 40 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | | 40 |
| Material biológico | | 40 |
| Experimento preliminar (BA 0.5 y 1 mgL ⁻¹) | | 41 |
| Barrido hormonal | | 42 |
| Elongación y enraizamiento | | 42 |
| Aclimatización | | 43 |
| Análisis estadístico | | 45 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 45 |
| Experimento preliminar (BA 0.5 y 1 mgL ⁻¹) | | 45 |
| Explantes apicales | | 46 |
| Explantes laterales | | 49 |
| Respuestas morfogénicas con el barrido hormonal | | 52 |
| Organogénesis | | 52 |
| Explantes apicales | | 52 |
| Explantes laterales | | 58 |
| Análisis estadístico | | 61 |
| Elongación y enraizamiento | | 65 |
| Aclimatización | | 67 |
| PERSPECTIVAS | | 71 |
| CONCLUSIONES | | 73 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 75 |
| ANEXO 1. Descripción botánica del género <i>Mammillaria</i> (Arias et al., 2012) | | 84 |
| ANEXO 2. Descripción botánica y clasificación taxonómica de <i>Mammillaria humboldtii</i> (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Guzmán et al., 2007) | | 85 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxi-acético |
| 2iP | N ⁶ -(2-Isopentenil) adenina |
| 4-Cl-AIA | Ácido 4-cloroindol-3-acético |
| AIA | Ácido indol-3-acético |
| AIB | Ácido indol-3-butírico |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| ANP | Áreas Naturales Protegidas |
| APA | Ácido fenilacético |
| ATIB | Ácido 2,3,5-triyodobenzoico |
| BA | 6-bencilaminopurina |
| CA | Carbón Activado |
| CAM | Crassulacean Acid Metabolism (Metabolismo Ácido Crasuláceo) |
| CTV | Cultivo de Tejidos Vegetales |
| GGPP | Geranil-geranil-difosfato |
| IUCN | Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza |
| K | Kinetina |
| MS | Murashige y Skoog (1962) |
| N&N | Nitsch & Nitsch |
| UMA | Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |

RESUMEN

Mammillaria humboldtii, especie endémica del estado de Hidalgo, se encuentra en la categoría de Amenazada en la Norma Oficial Mexicana debido a su distribución geográfica restringida y escasas poblaciones dentro de la Barranca de Metztitlán, además del saqueo ilegal con fines ornamentales. El objetivo del trabajo fue establecer una metodología para su propagación por medio del cultivo de tejidos vegetales. A partir de brotes previamente obtenidos de plántulas de semillas germinadas *in vitro* se obtuvieron explantes apicales y laterales que fueron cultivados en medio Murashige y Skoog con doce combinaciones de 6-bencilaminopurina/ácido naftalenacético (BA/ANA).

Para los explantes apicales los mejores tratamientos fueron BA/ANA 2/0.1 y 1/0.5 mgL⁻¹ generando un promedio de 8.75 y 8.6 brotes respectivamente. Los explantes laterales respondieron mejor en el tratamiento sin reguladores de crecimiento, formando en promedio 4.7 brotes por explante. La formación de brotes ocurrió por organogénesis directa vía activación de aréolas vegetativas en ambos tipos de explantes.

La rizogénesis se dio de manera espontánea en medio MS adicionado con 1.5 gL⁻¹ de Carbón Activado, la aclimatización fue exitosa obteniendo el 98.5% de sobrevivencia. En el presente trabajo se logró la micropropagación de esta especie y su establecimiento en condiciones de invernadero, lo que representa una alternativa viable para su propagación masiva, favoreciendo la conservación de los ejemplares silvestres en su hábitat natural.

INTRODUCCIÓN

México presenta una gran diversidad biológica debido a su topografía, a su variedad de climas y a su compleja historia geológica y biológica. Estos factores contribuyen a las condiciones ambientales y microambientales que promueven una variedad de hábitats y de formas de vida. Su ubicación en el límite de dos zonas biogeográficas: la neotropical y la neártica, propició el enriquecimiento de la fauna y flora, dando como resultado que nuestro país posea entre el 10 y 12% de las especies del planeta (Neyra y Durand, 1998).

En México, la familia Cactaceae está bien representada debido a que posee el mayor número de especies (660), distribuyéndose la mayor parte de éstas en zonas áridas y semiáridas (Hernández y Godínez, 1994; Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006).

Mammillaria es uno de los géneros más numerosos de esta familia, con alrededor de 221 a 232 especies (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Hunt *et al.*, 2006), y de los más populares en el mercado debido a la variedad de formas que posee, al color de sus flores, su pequeño tamaño y sencillo mantenimiento. Al igual que muchas otras especies de cactáceas éstas son usadas como plantas ornamentales (Jiménez, 2011), por lo que sus poblaciones han sido afectadas por la colecta ilegal y el mercado negro, reduciendo el número de individuos (Robbins, 2003), problemática sumada a la destrucción de su hábitat situando a 114 especies de este género en alguna categoría de riesgo según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

Mammillaria humboldtii (Anexo 1) es endémica del estado de Hidalgo, presenta lento crecimiento y debido a la colecta ilegal de ejemplares silvestres está en la categoría de Amenazada (Guzmán *et al.*, 2007; SEMARNAT, 2010), motivo por el cual es necesario establecer estrategias para su propagación y conservación. Una alternativa para llegar a

alcanzar un programa de conservación es el empleo de la micropropagación por medio de las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), en donde es posible obtener altas tasas de multiplicación a partir de porciones de material vegetal que es sembrado en condiciones asépticas, en medios de cultivo químicamente definidos y a temperatura e intensidad luminosa controladas (George *et al.*, 2008). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones que permitan la propagación masiva y la aclimatización de brotes de *M. humboldtii* como parte de una estrategia para su conservación *ex situ*.

ANTECEDENTES

Generalidades de la familia Cactaceae

La familia Cactaceae es originaria de América, cuenta con una distribución desde Canadá hasta el sur de Argentina (Bravo-Hollis, 1997). Dos de los principales centros de diversidad se ubican en México y en el sureste de Estados Unidos (Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006).

Conforman un grupo monofilético que se caracteriza principalmente por la presencia de aréolas (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991; Arias y Flores, 2013) y comprende 124 géneros con más de 1800 especies (Hunt *et al.*, 2006).

México es el país con el mayor número de géneros (46) y especies (660), con 517 especies endémicas, que representa una alta proporción de endemismos respecto al número total de especies (78%) (Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006). La mayor parte de las especies se distribuyen en las regiones áridas y semiáridas, principalmente en la porción sureste del Desierto Chihuahuense, así como en la Zona Árida Queretano-Hidalguense (Hernández y Godínez, 1994). Los estados con mayor diversidad son San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León, Oaxaca, Zacatecas, Tamaulipas y Sonora con más de 100 especies cada uno (Godínez-Alvarez y Ortega-Baes, 2007; Guzmán *et al.*, 2007).

Las cactáceas presentan características anatómicas y fisiológicas de adaptación al medio árido, entre las más notables se encuentran el gran desarrollo de parénquima en sus tallos, lo que les permite almacenar y conservar el agua en sus tejidos; la reducción o ausencia de sus hojas, con lo cual reducen la evapotranspiración; el engrosamiento de la cutícula y el tipo de fotosíntesis conocido como “metabolismo ácido crasuláceo” (CAM por sus siglas en inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*), en el cual el intercambio gaseoso se realiza

durante la noche cuando la temperatura del ambiente es más baja (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Jiménez, 2011).

La característica distintiva de los miembros de esta familia es la presencia de aréolas, que son yemas de crecimiento que se desarrollan en nuevos tallos, flores, espinas, glóquidas, cerdas y pelos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Jiménez, 2011). Además presentan determinadas formas de crecimiento, entre ellas las cilíndricas, columnares, globosas y globosas-deprimidas (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012).

Las cactáceas desempeñan un papel muy importante desde el punto de vista biológico, social y económico. Muchos de sus frutos y tallos son alimentos importantes en la dieta de los mexicanos, aunque también se utilizan como forraje, ornamento y fuente de sustancias químicas de interés médico y farmacológico (Benítez y Dávila, 2002). Hay muchas especies que son fuente de materia prima para la construcción y elaboración de armas de caza y pesca, algunas otras se utilizan como cercos vivos, para retener el suelo, como fuentes de mucílagos, gomas, pectinas y colorantes, entre otros, pero actualmente su papel más común desde el punto de vista humano es el de plantas ornamentales (Becerra, 2000). Por mencionar algunos están los frutos (chilitos) de *Mammillaria* que son consumidos por el hombre, tallos de diversas especies *Cylindropuntia* se utilizan tanto para consumo humano como de ganado, además de que sus frutos son comestibles, mientras que con individuos de *Pachycereus* se construyen cercos vivos (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

Problemática de las cactáceas

En 2015 Goettsch *et al.* realizaron un estudio sobre la cantidad de cactáceas amenazadas, resultando ser el quinto grupo taxonómico con mayor número de especies amenazadas. Las dos principales áreas en América donde se encuentran susceptibles son el sur del Río Grande del Sur (Brasil) y el norte de Artigas (Uruguay), mientras que en México se localizan en Querétaro, San Luis Potosí, Oaxaca y Puebla.

Las principales causas que ponen en riesgo a las cactáceas son la agricultura y el cambio de uso de suelo para asentamientos humanos y la colecta de ejemplares con fines biológicos, por ejemplo como plantas para colecciones (Goettsch *et al.*, 2015). En el mundo, los principales comerciantes de cactáceas (de manera legal) son los Estados Unidos, el Reino Unido, Alemania, Suecia, México, España, Italia y Canadá, teniendo al primero con un 17 % de especies exclusivas, es decir, especies que sólo pueden adquirirse de manera legal dentro de ese país, al contrario de México, que a pesar de ser el país con la mayor diversidad y la mayor cantidad de endemismos, el número de especies comercializadas es mucho menor (91) y con tan sólo 3 especies exclusivas (Bárceñas, 2006).

Sin embargo, a pesar de que existen lugares con los permisos necesarios para la propagación y venta de cactáceas, en muchas ocasiones la producción no llega a satisfacer la demanda o lo hace parcialmente, por lo que se promueve la venta ilegal de estas plantas (Martorell, 2013), actualmente esta práctica afecta a un 47% de las cactáceas amenazadas (Goettsch *et al.*, 2015). Los coleccionistas pueden llegar a pagar miles de dólares por alguno de estos ejemplares sin importar que eso ponga en riesgo a la planta, tal es el caso de *Geohintonia mexicanum* y *Aztekium hintonii* por las que compradores japoneses llegaron a ofrecer dos mil dólares por un ejemplar (Becerra, 2000). Se sabe que los principales

saqueadores provienen de países europeos y asiáticos, quienes de alguna manera logran pasar la aduana y sacan las plantas y/o semillas del país para su venta ilegal por internet (Álvarez *et al.*, 2004; National Geographic en Español, 2015).

Otras causas que aumentan la problemática de las cactáceas, son que la mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, son de distribución restringida o son especies que recientemente se han descubierto, por lo que se conoce poco de su biología (Becerra, 2000), aunado a que tienen ciclos de vida muy largos, bajas tasas de crecimiento, altos niveles de endemismos y alta especificidad ambiental de sus poblaciones (Jiménez, 2011).

Debido a las causas anteriores, en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentran enlistados 42 de los 46 géneros que se localizan en el país, en las categorías de Sujeto a protección especial (157 especies), Amenazado (87 especies) y En peligro de extinción (32 especies) (SEMARNAT, 2010). Asimismo, en la Lista Roja de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) se encuentran enlistadas 1477 especies de la familia (IUCN, 2015), en las categorías En peligro crítico, En peligro, Vulnerable, Casi Amenazado, Preocupación Menor y Datos Insuficientes, sin contener especies en las categorías de Extinto y Extinto en estado silvestre (Goettsch *et al.*, 2015). A pesar de que ambos listados evalúan el estado de riesgo de las especies, la diferencia reside en los criterios que se consideran para designar cada categoría, así como la existencia de problemas de sinonimias en la nomenclatura, además de que la Lista Roja de la IUCN se actualiza constantemente (Arias *et al.*, 2005).

Género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* (Anexo 1) fue nombrado en 1812 por Haworth, haciendo alusión en su nombre a las pequeñas mamilas que son los tubérculos que presentan estas especies. Los individuos pueden ser solitarios, como *M. hernandezii*, *M. napina* y *M. zephyranthoides*, o cespitosos, como *M. decipiens*, *M. elongata* y *M. schumannii*, con un crecimiento aún más lento en comparación con otras cactáceas (Anderson, 2001).

Mammillaria se caracteriza por presentar dos tipos de aréolas, las reproductivas (o florales) ubicadas en las axilas de los tubérculos y las vegetativas localizadas en el ápice de éstos, de donde se generan espinas, las cuales pueden ser centrales o radiales de diferentes tamaños, formas, número y colores. Sus flores generalmente se disponen en corona cerca del ápice, son pequeñas (10-25 mm de longitud y 15-50 mm de diámetro), con tonalidades que van desde blancas hasta rojizas. Los frutos, son bayas pequeñas sin aréolas, normalmente sin escamas, de color rosado hasta escarlata, con una gran cantidad de semillas (10-150) (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Rubluo, 1997).

Este género es el más grande y popular dentro de la familia Cactaceae, de acuerdo a Hunt *et al.* (2006) y Villaseñor (2004) cuenta con 232 y 306 especies, respectivamente. Se distribuye desde Estados Unidos hasta Sudamérica, incluyendo a las Antillas (Arias *et al.*, 2012). En México, los estados con la mayor riqueza de especies son San Luis Potosí con 31 especies, Querétaro, Guanajuato y Zacatecas con 28 especies cada uno, y por último Oaxaca y Durango con 26 especies cada uno (Flores y Manzanero, 2010).

Oaxaca destaca como uno de los estados con mayor número de endemismos (9 especies), seguido de Baja California Sur (8 especies), Sonora (6 especies), Guanajuato, Puebla y Tamaulipas (5 especies cada uno) (Flores y Manzanero, 2010). Estos endemismos

junto con la alta demanda por los aficionados, la colecta ilegal y la destrucción de sus hábitats, pone en alto riesgo al género (Rubluo, 1997), además del pequeño tamaño de las especies que dificulta encontrar nuevas localidades o incluir a todos los individuos en un conteo de sus ejemplares (Martorell, 2013).

En contraparte, la gran popularidad que ha ganado *Mammillaria* ha promovido el inicio de estudios tanto científicos como por aficionados (Anderson, 2001), teniendo en consideración que aún hay un gran camino por recorrer para aumentar el conocimiento que se tiene sobre estas plantas y así mismo tomar las medidas adecuadas para su conservación.

Mammillaria humboldtii

Mammillaria humboldtii, conocida como “biznaga bola de nieve” (Fig. 1a) (Anexo 2), puede tener tallos simples o cespitosos y globosos-aplanados hasta algo columnares (Brachet *et al.*, 1990). Sus tubérculos son cilíndricos con el ápice redondeado, sus aréolas no presentan espinas centrales, sólo espinas radiales. Con flores con tonalidades rosas hasta rojo brillante (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Es endémica del estado de Hidalgo (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005; Guzmán *et al.*, 2007), con escasas localidades dentro de la Barranca de Metztitlán y sus alrededores (Brachet *et al.*, 1990). Se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) en la categoría de Amenazada y en la Lista Roja de la IUCN como en Peligro crítico (IUCN, 2015), debido principalmente a las extracciones ilícitas de su medio natural (al ser una especie con pocos individuos), junto con el sobrepastoreo de su hábitat por cabras (Fitz *et al.*, 2013), asimismo influye su lento crecimiento (Fig. 1b) y la baja tasa germinación de sus semillas. La propagación por semilla no es muy exitosa, personal del vivero El Viejo Cactus (Metztitlán,

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

Hidalgo) no ha logrado la germinación y el Biólogo Abel Bonfil Campos (Jardín Botánico - Facultad de Estudios Superiores plantel Cuautitlán, UNAM) señala que de 30 semillas sembradas en sustrato, dos germinaron a los seis días y siete a los 20 días, lo que hace un total de 9 semillas que correspondería al 30% (comunicación personal con ambos). En el vivero El Viejo Cactus las plantas con las que cuentan tienen un tamaño no mayor a seis cm de diámetro con una edad de 10 años, lo que nos indica su lento crecimiento (Fig. 1c).

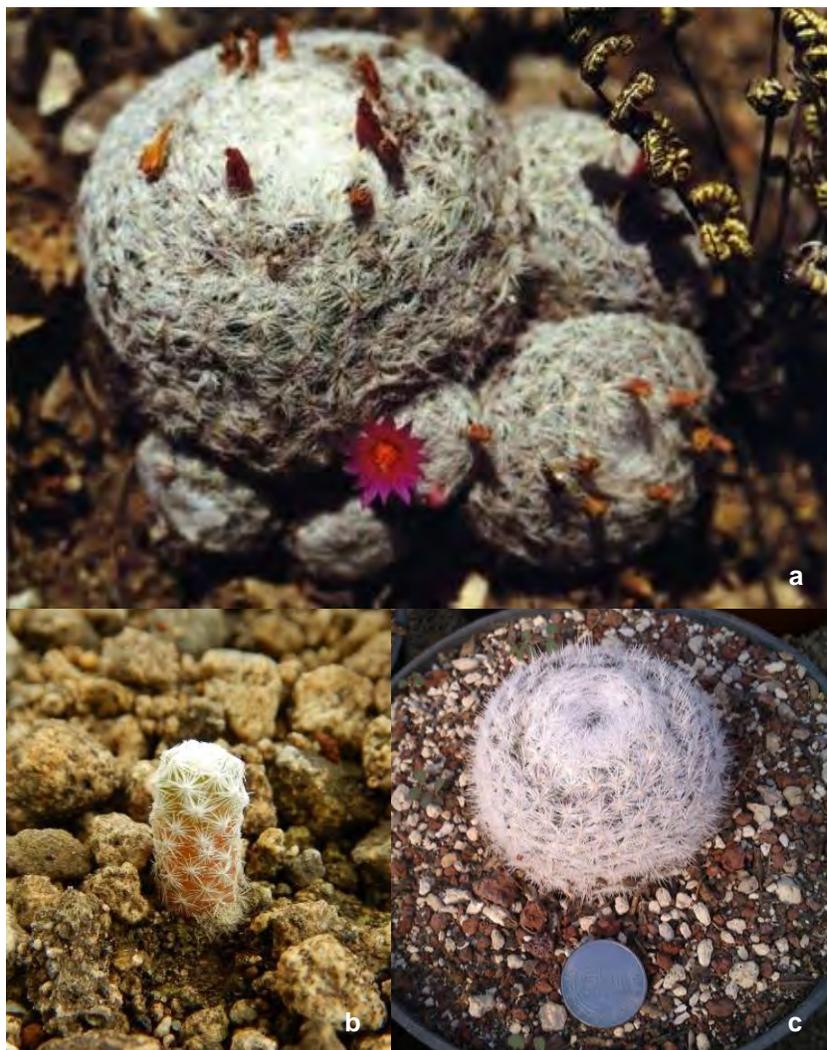


Figura 1. *Mammillaria humboldtii*. a) Ejemplar silvestre con flores y frutos, con crecimiento cespitoso (foto de Michel Lacoste (ML165)), b) planta de tres años 10 meses, con 0.6 cm de diámetro y c) planta de 4.5 cm de diámetro con 10 años de edad del vivero El Viejo Cactus.

Otras causas que podrían contribuir a la amenaza de esta especie pueden ser: el desconocimiento real del tamaño y número de poblaciones, así como la decisión de algunos científicos de no compartir la ubicación de nuevas poblaciones, ya que los saqueadores al conocer estos mismos puntos se darían a la tarea de saquear gran cantidad de individuos (Martorell, 2013).

Esta especie como muchas de la familia, se venden a través del internet. En una búsqueda realizada en 2014 y 2015 se encontraron varios sitios donde está a la venta, ya sean ejemplares y/o semillas. Las páginas que las ofertan son generalmente de procedencia europea. Como se aprecia en la tabla 1, el tamaño de las plantas es de 5 a 16 cm de diámetro, los precios por los ejemplares, dependiendo de su tamaño van desde \$25.25 hasta \$107.76 pesos mexicanos, también se ofrecen paquetes de 10 o 100 semillas, éstos últimos se pueden vender a \$164.15 pesos mexicanos. Tomando en cuenta el lento crecimiento de esta especie y los tamaños de los ejemplares puestos a la venta, así como la cantidad de semillas, muy probablemente este material biológico podría ser extraído de sus hábitats naturales y por lo tanto de procedencia ilegal.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

Tabla 1. Sitios de internet de diferentes países donde se realiza la venta de semillas y ejemplares de *Mammillaria humboldtii* de diferentes tallas, se muestra su precio equivalente en pesos mexicanos.

| Semilla o planta | Tamaño del ejemplar o # de semillas | País | Precio en internet | Equivalencia en pesos mexicanos | Referencia |
|------------------|---|--------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Semillas | 10 | Australia | AUD 4.95 | \$58.63 | www.ebay.com* |
| Semillas | 10 | España | £3.15 | \$79.55 | www.ebay.com** |
| Semillas | 100 | Estados Unidos | USD\$ 8 | \$130.06 | www.mesagarden.com* |
| Semillas | 100 | República de Malta | £6.50 | \$164.15 | cactus-heaven.com* |
| Planta | 7 cm de diámetro (con los hijuelos) y 5 cm de altura | Alemania | 5.50 € | \$98.78 | www.ebay.com* |
| Planta | ne | Alemania | 6 € | \$107.76 | www.kakteenland.de** |
| Planta | 5 cm de diámetro (con los hijuelos) y 3 cm de altura | Hungría | £1 | \$25.25 | www.ebay.com** |
| Planta | 16 cm de diámetro (con los hijuelos) y 8 cm de altura | Hungría | £1.40 | \$35.35 | www.ebay.com* |
| Planta | ne | México | \$40 | \$40 | articulo.mercadolibre.com.mx* |
| Planta | ne | México | \$35 | \$35 | nopalesinc.mercadoshops.com.mx** |
| Planta | ne | República Checa | 4 € | \$71.84 | www.hajek-kaktusy.cz* |

€: Euros, AUD: Dólares australianos, USD\$: Dólares estadounidenses, £: Libras esterlinas, \$: Pesos mexicanos, ne: no especificado. Cotizaciones de las divisas consultadas: *el 22 de noviembre de 2014, ** el 29 de julio de 2015.

Estrategias de conservación

En la actualidad, la alteración ambiental negativa se está dando de una manera acelerada, poniendo en riesgo los recursos vegetales del planeta, esto en gran medida por la actividad humana. Afortunadamente para contrarrestar dichos efectos existen distintas estrategias de conservación (Iriondo, 2001). La conservación de la diversidad vegetal puede realizarse *in situ* o *ex situ*, la primera consiste en proteger los hábitats naturales de las especies amenazadas, manteniendo sus poblaciones o recuperándolas si se han deteriorado (Baena *et al.*, 2003); en cambio, la segunda se refiere a la conservación fuera del hábitat natural mediante la aplicación de técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyan a la recuperación y sobrevivencia de individuos o poblaciones (Iriondo, 2001; Lascuráin *et al.*, 2009).

Para la conservación *in situ* es necesario tener información sobre la Biología de la especie a proteger y sobre el ecosistema que habita, ya que de manera contraria, se verían limitadas las acciones para idear un plan de conservación (Iriondo, 2001). Dentro de las instituciones que pueden llevar a cabo todas estas medidas son las Áreas Naturales Protegidas (ANP), los Corredores biológicos y las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAs), que son áreas de gran importancia por su diversidad que no han sido alteradas significativamente por el ser humano y/o que requieren ser preservadas y restauradas (Robles, 2009; Álvarez, 2013; CONANP, 2015)

En cambio, la conservación *ex situ* implica coleccionar muestras, con representación de la variabilidad genética de una especie, así como su mantenimiento fuera de las condiciones en las que se ha desarrollado (Iriondo, 2001). Incluye los jardines botánicos, bancos de germoplasma (semillas, polen y yemas vegetativas, entre otros), propagación vegetativa convencional y laboratorios de cultivo de tejidos (Iriondo, 2001; Lascuráin *et al.*, 2009).

Con respecto a los jardines botánicos, son lugares que contienen colecciones vivas de plantas, que además de la conservación, promueven programas de investigación y educación sobre las especies (Becerra, 2000; Lascuráin *et al.*, 2009). En México, los jardines botánicos en conjunto tienen 757 especies de la familia Cactaceae, de las cuales, en el 2003, se documentaron 188 especies que se encontraban incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2001. Actualmente, a pesar de que estas instituciones se utilizan para la conservación *ex situ*, es necesario que se les provea un mayor apoyo ya que a partir de ellas se puedan generar fondos para la conservación *in situ* (Lascuráin *et al.*, 2009).

En el caso de los bancos de germoplasma, estos centros se encargan de almacenar propágulos de especies raras y amenazadas. Basados principalmente en la conservación de semillas a bajas temperaturas y con un bajo contenido de humedad, aunque existen otras alternativas como son los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y yemas vegetativas, que se pueden utilizar cuando la conservación de semillas no es una opción viable. Sin embargo, hay que tomar en consideración que los bancos de polen a pesar de que ocupan poco espacio, sólo conservan la mitad del genoma, mientras que las yemas vegetativas se utilizan principalmente para la conservación de clones de árboles frutales (Iriondo, 2001).

Otro componente fundamental en la conservación *ex situ* es la propagación, principalmente por semilla (en cactáceas se considera el método más recurrido), partiendo de frutos colectados en campo con la autorización correspondiente mediante permisos oficiales, por cosecha en plantas de colecciones o por intercambio (Arredondo, 2002). En cuanto a la propagación vegetativa, actualmente se subdivide en convencional y no convencional, la primera implica la utilización de yemas, esquejes, vástagos e injertos; en cuanto a la segunda hace referencia a la micropropagación, que utiliza técnicas similares a las de los bancos de

cultivo *in vitro* (Iriondo, 2001). En ambos casos, se habla de una reproducción asexual, con el propósito de multiplicar el material vegetal con fines de exposición, estudio o intercambio, ya que además se conserva la identidad genética del material propagado, es decir se generan clones a partir de una misma planta (Iriondo, 2001; Arredondo, 2002). Las diversas estrategias de conservación vegetal mencionadas se muestran en la figura 2.



Figura 2. Diversas estrategias de conservación vegetal. Recapitulado de Becerra (2000); Iriondo (2001); Arredondo (2002); Baena *et al.* (2003); Lascuráin (2009); Robles (2009); Álvarez (2013).

Cultivo de Tejidos Vegetales

Para comprender mejor el concepto de micropropagación, es necesario explicar lo que es el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV). Este es una rama de la biotecnología que reúne un conjunto de técnicas que permiten el cultivo y manipulación aséptica de secciones de tejidos vegetales en medios nutritivos bajo condiciones ambientales controladas, como son: luz, temperatura, pH, reguladores de crecimiento, entre otras (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008; López y Olgún, 2013).

Se basa en el principio de totipotencialidad de las células para regenerar un nuevo individuo completo, el cual fue propuesto por Haberlandt en 1902, motivo por el cual se le conoce como el padre del CTV (Thorpe, 2007; Kumar y Shiong, 2012; López y Olguín, 2013), durante los años 40's, 50's y 60's se desarrollaron las técnicas que actualmente se utilizan (Thorpe, 2007).

El fragmento vegetal con el cual se inicia el cultivo se llama explante, éste puede ser una sección de hoja, tallo, raíz, una semilla, un embrión cigótico aislado (maduro e inmaduro), cotiledones, hipocótilos, pétalos, polen, entre otros (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994; Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008; Kumar y Shiong, 2012). Los explantes se colocan bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas para promover una respuesta, la cual puede darse mediante tres rutas de propagación: 1) la activación de yemas preexistentes, 2) la organogénesis y 3) la embriogénesis somática. La primera se refiere que a partir de esas yemas preexistentes se obtendrán nuevos individuos, la segunda, que a partir de explantes como son raíces, hojas, tallos se formarán de *novo* órganos (brotes o raíces adventicias) y por último, en la tercera, que a partir de células somáticas se formarán embriones que germinarán formando plantas completas; además de que en la segunda y tercera vía las estructuras se forman a partir de una sola célula, en cambio en la primera se parte de una estructura multicelular (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; López y Olguín, 2013).

La organogénesis y la embriogénesis somática se pueden dar de manera directa o indirecta, es decir, en el primer caso, ya sean brotes o plantas completas se formarán directamente sobre la superficie del explante, en cambio en el segundo, se formará primero callo (una masa de células desorganizadas y desdiferenciadas que tienen una división

continua e incontrolada) para posteriormente dar origen a los brotes o embriones somáticos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008; López y Olguín, 2013).

Dentro de las plantas se sintetizan compuestos orgánicos de manera natural, que juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento de las mismas, estos compuestos reciben el nombre de hormonas vegetales (y reguladores de crecimiento vegetal cuando son sintetizados en laboratorio). Para que exista una respuesta en el explante es necesaria la adición de estas sustancias en el medio de cultivo, en una proporción y concentración de acuerdo a lo que se quiera obtener. Se dividen principalmente en auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000; George *et al.*, 2008):

Las auxinas y las citocininas son los reguladores de crecimiento que se utilizan mayormente, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo en los cultivos de tejidos vegetales.

Auxinas: Son compuestos derivados del triptófano, sintetizados principalmente en tejidos jóvenes como meristemos y hojas jóvenes. En la planta completa promueven la división y crecimiento celular, estimulan la formación de raíces adventicias, determinan la dominancia apical, inhiben la abscisión de las hojas, entre otras. De manera natural existen el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido indol-3-butírico (AIB) que se utilizan recurrentemente en el CTV, así como el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (APA). De manera sintética existen el ácido naftalenacético (ANA) el ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D) y el ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (dicamba).

Citocininas: Son derivados de la adenina, se producen principalmente en tejidos donde hay una fuerte actividad mitótica, como es el meristemo apical de la raíz, embriones y hojas

jóvenes. En la planta completa participan junto con las auxinas en la morfogénesis, rompen la dominancia apical promoviendo el crecimiento de las yemas laterales, retardan la senescencia y promueven la movilización de nutrientes. Algunos ejemplos de origen natural son la hidroximetil-butenil-amino purina (zeatina) y la N⁶-(2-Isopentenil) adenina (2iP). La kinetina (K) y la 6-bencilaminopurina (BA) son ejemplos de citocininas sintéticas, que a la vez son dos de las más utilizadas en el CTV.

En la proporción en que las auxinas y citocininas sean empleadas se podrá dirigir la respuesta morfogénica (Fig. 3).

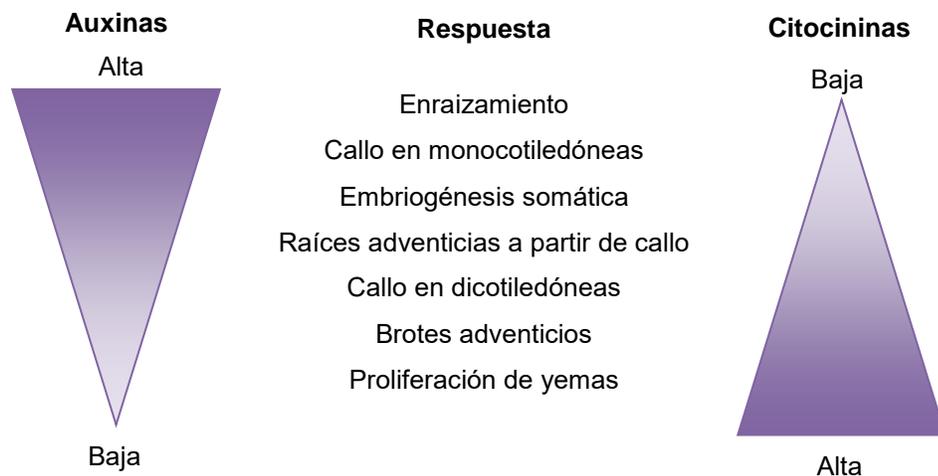


Figura 3. Respuestas morfogénicas generadas en los cultivos *in vitro* por la interacción de diferentes proporciones de auxinas y citocininas. Tomado y modificado de Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1999) y George *et al.* (2008).

Giberelinas: Su precursor es el geranil-geranil-difosfato (GGPP), se sintetiza principalmente en semillas inmaduras, en la región subapical de los meristemas, tejido vascular, en anteras y granos de polen. En la planta completa participan en la embriogénesis y desarrollo del embrión, en la diferenciación celular, promueven la elongación de entrenudos,

de la rizogénesis, la floración y el crecimiento. Algunos ejemplos son GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₁₂ y GA₅₃ (naturales) (Buchanan *et al.*, 2000; George *et al.*, 2008).

Etileno: Tiene como precursor a la metionina y se sintetiza en todos los tejidos de la planta. En la planta completa participa en la maduración de los frutos, promueve la senescencia, la abscisión de hojas, frutos y pétalos, y la formación de pelos radiculares. El etileno es el compuesto que se da de manera natural, en cambio el ácido 2-cloroetilfosfónico (etefón) es un compuesto sintético (Buchanan *et al.*, 2000; George *et al.*, 2008).

Ácido abscísico: Es un derivado del isopentil difosfato, que se sintetiza en semillas en maduración, en raíces y en hojas bajo estrés hídrico. En la planta completa regulan la maduración de la semilla, inhiben la germinación precoz y promueven la latencia de la semilla, así como el cierre de los estomas en respuesta al estrés hídrico, también promueve la latencia de los meristemas del vástago y el crecimiento de la raíz e inhibe el de la parte aérea en condiciones de estrés hídrico (Buchanan *et al.*, 2000).

El CTV conlleva algunas ventajas, como son la obtención de plantas libres de virus, así como la generación de un gran número de individuos en poco tiempo y espacio, a partir de escaso material (Fay, 1994). Además existen diversas técnicas, que permiten la germinación, como puede ser de semillas recalcitrantes (semillas sensibles que pierden viabilidad a bajas temperaturas y a un bajo porcentaje de humedad), de semillas con un bajo porcentaje de germinación, de especies que produzcan una baja cantidad de semillas o que simplemente se cuente con poco material biológico (Iriondo, 2001), además del cultivo de meristemas, el cultivo de células en suspensión, el cultivo de protoplastos y la micropropagación. Algunas de estas técnicas se utilizaron inicialmente para la propagación de especies de importancia

hortícola y para la conservación de recursos genéticos de importantes plantíos, posteriormente para la obtención de metabolitos secundarios y la conservación de especies raras y/o amenazadas, siendo la micropropagación una de las técnicas más empleadas para este propósito (Fay, 1994; Pérez-Molphe-Balch, *et al.*, 1999; Kumar y Shiong, 2012).

Micropropagación

La micropropagación se refiere a la propagación asexual masiva de plantas genéticamente idénticas a la planta madre, en tiempos relativamente cortos en comparación con los métodos convencionales y por medio de subcultivos sucesivos hasta su transferencia a suelo, permitiendo así la obtención de plantas con mayor homogeneidad y calidad (George *et al.*, 2008, López y Olgún, 2013). Beneficios que se están tomando como incentivo para llevar a cabo la propagación de plantas raras y que estén amenazadas o en peligro de extinción (Gratton y Fay, 1999).

La micropropagación consta de cinco etapas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008):

- Etapa 0. Selección de las plantas madre: se mantienen en condiciones de invernadero las plantas donadoras, con un control en su nutrición y riegos adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.
- Etapa I. Establecimiento aséptico de los cultivos: se seleccionan los explantes y se desinfectan para eliminar los contaminantes que puedan tener en su superficie, posteriormente se siembran en los medios de cultivo bajo condiciones asépticas. De acuerdo a la vía de regeneración que se busque obtener, será la elección del explante a utilizar.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

- Etapa 2. Multiplicación del tejido: se promueve la formación y proliferación de nuevos brotes por la presencia de reguladores de crecimiento (principalmente auxinas y citocininas) en el medio de cultivo, ya sea por organogénesis, embriogénesis somática o activación de yemas preexistentes.
- Etapa 3. Elongación y enraizamiento: los brotes obtenidos se individualizan y se subcultivan en un medio de cultivo fresco para promover su elongación, para ello se emplean medios nutritivos suplementados con bajas concentraciones de citocininas o libres de reguladores de crecimiento. En cambio, para promover el enraizamiento de los brotes se emplean auxinas, aunque existe la posibilidad de que los brotes enraícen en el mismo medio donde surgieron o también se puede intentar que enraícen directamente en el sustrato. Si lo que se obtuvieron fueron embriones somáticos no se necesita inducir el enraizamiento, ya que son estructuras bipolares con ambos meristemas (apical y radicular).
- Etapa 4. Aclimatización: Los brotes o plantas deben adaptarse gradualmente a las condiciones ambientales externas. Ésta es la etapa más crítica de la micropropagación, debido a que los individuos regenerados en condiciones *in vitro* tienen cutículas poco desarrolladas y el mecanismo de cierre de sus estomas está atrofiado, lo cual los pone en riesgo de tener una pérdida excesiva de agua. Asimismo, tienen tasas de fotosíntesis bajas o no la realizan debido a que el medio les proveía carbono, además requieren ser manejados con altas medidas higiénicas, ya que al estar en medios libres de contaminantes, las plantas y brotes no han generado resistencias naturales contra ellos.

Micropropagación en cactáceas

Actualmente, uno de los principales motivos para desarrollar técnicas de propagación en las cactáceas es para tratar de disminuir la presión sobre las poblaciones naturales. Se aprovecha la presencia de aréolas en la superficie de los individuos, ya que la probabilidad de que se obtenga una respuesta bajo condiciones *in vitro* aumenta debido a la activación de éstas (Becerra, 2000; López y Olguín, 2013). En particular Gratton y Fay (1999) sugieren tomar explantes con varias aréolas y entre 3-5 mm de tejido circundante. Sin embargo, las espinas presentes en estas zonas pueden dificultar su establecimiento, a causa de que agentes contaminantes puedan mantenerse en ellas aun después de la desinfección, por lo que se recomienda recortarlas previamente tratando de no dañar el tejido.

En los últimos años se han realizado diversos trabajos sobre la micropropagación de cactáceas, en los que principalmente han utilizado solamente citocininas (en su mayoría BA y 2iP) o en combinación con auxinas (por ejemplo ANA o AIA) en menores concentraciones, regenerando plantas tanto por organogénesis como por embriogénesis somática. Algunas de estas especies cultivadas *in vitro* son: *Ariocarpus retusus* (Olguín, 1994), *Melocactus bellavistensis* (Hernández *et al.*, 1994), *Astrophytum myriostigma* (Villavivencia *et al.*, 1999), *Cephalocereus senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000), *Acharagma aguirreana*, *Astrophytum ornatum*, *Coryphantha elephantidens*, *Ferocactus flavovirens*, *Mammillaria bocasana*, *M. oteroi*, *Pachycereus schottii*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Stenocereus stellatus* y *Thelocactus hexaedophorus* (Castro-Gallo *et al.*, 2002), *Echinocereus knippelianus*, *E. schmollii*, *M. carmenae* fo. *rubrisprina*, *M. herrerae*, *M. theresae*, *Melocactus curvispinus*, *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* (Retes-Pruneda *et al.*, 2007), *Aporocactus flagelliformis*

(Lara, 2010) y *Echinocactus grusonii* (Soto, 2013), observándose en todas formación de brotes y en cuanto a la obtención de embriones somáticos se ha reportado en *Mediocactus coccineus* (Infante, 1992), *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y *Astrophytum asterias* (Lema-Ruminska y Kulus, 2012). De entre los géneros mayormente trabajados se encuentra *Mammillaria*, que de acuerdo a Trejo *et al.* (2005), el tener individuos con crecimiento cespitoso facilita la obtención de brotes *in vitro* debido a que muchas de sus especies por naturaleza los producen. No obstante, el número de trabajos sobre el cultivo *in vitro* de este género resulta bajo en contraste con la cantidad de especies que se encuentran enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Lista Roja de la IUCN.

Micropropagación en *Mammillaria*

Del género, *Mammillaria woodsii* fue la primera especie propagada exitosamente mediante el CTV, de la que se obtuvieron brotes a los que se les aplicó un enraizador comercial (Kolář *et al.*, 1976). A partir de ese momento se comenzaron a realizar un mayor número de trabajos, de esta manera en la tabla 2 se muestran algunas de las diferentes especies de *Mammillaria* que se han propagado, así como el tipo de explante utilizado, los reguladores de crecimiento y su concentración, así como la respuesta morfogénica que se obtuvo.

Tabla 2. Estudios de propagación *in vitro* en algunas especies del género *Mammillaria*. Tomada*, actualizada y modificada de Flores (2007).

| Especie | Tipo de explante | Medio de cultivo | Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹) | Respuesta <i>in vitro</i> | Número de brotes por explante | Referencia |
|---|----------------------------------|-----------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>M. prolifera</i> | Plántulas y brotes vegetativos | MS | K (1-2) + 2,4-D (10-20) | Callo | No reportado | Minocha y Mehra (1974) |
| <i>M. woodsii</i> | Meristemos apicales | MS | K (1-2) + AIA (2) | Callo y brotes | No reportado | Kolář <i>et al.</i> (1976) |
| <i>M. elongata</i> | Anteras | Nitsch + 20% sacarosa | 2,4-D (no específica concentración) | Callo | No reportado | Cheema y Mehra (1981) |
| <i>M. glassii</i> | Yemas axilares | No específica | BA (1) | Brotes | No reportado | Starling y Dodds (1983)* |
| <i>M. carmenae</i> <i>M. prolifera</i> | Secciones de tallo | MS | BA (2) + ANA (1) | Brotes | Abundantes | Vyskot y Jára (1984) |
| <i>M. gummifera</i> | Secciones de tallo | MS | Auxinas + Citocininas (no específica) | Callo | No reportado | Ault y Blackmon (1985)* |
| 21 especies diferentes de <i>Mammillaria</i> | Plántulas | MS | BA + 2,4-D (no específica concentración) | Callo y brotes | No reportado | Damiano <i>et al.</i> (1986)* |
| <i>M. san-angelensis</i> | Secciones de tallo | MS | BA (0.1) + ANA (0.01) | Brotes a partir de callo | 21-35 | Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) |
| <i>Mammillaria spp.</i> | Óvulos sin fecundar con placenta | MS | BA (2.25) + AIA (0.18) | Callo y primordios de embriones | No reportado | Corneanu <i>et al.</i> (1990)* |
| <i>M. albilanata</i> <i>M. lasiacantha</i> <i>M. mammillaris</i> <i>M. parkinsonii</i> <i>M. solisoides</i> <i>M. theresae</i> <i>M. viperina</i> | Yemas laterales | MS | No especificado | Micropropagación exitosa | No reportado | Fay y Gratton (1992)* |
| <i>M. huitzilopochtli</i> <i>M. san-angelensis</i> | Secciones de tallo | MS | BA (1) BA (0.1) | Callo y brotes | No reportado | Rubluo <i>et al.</i> (1993) |

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

Tabla 2. Continuación

| Especie | Tipo de explante | Medio de cultivo | Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹) | Respuesta <i>in vitro</i> | Número de brotes por explante | Referencia |
|--|--|------------------|---|---------------------------|--|---|
| <i>M. candida</i> <i>M. craigii</i> <i>M. uncinata</i> | Laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (1) | Brotes | 13.25 4.65 5.25 | Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> (1998) |
| <i>M. formosa</i> <i>M. oscura</i> <i>M. sphacelata</i> | | MS | BA (1) + ANA (0.1) | Brotes | 4.42 4.78 17.50 | |
| <i>M. bocasana</i> <i>M. carmenae</i> | Meristemos de plantas adultas | MS | BA (10) K (1) | Brotes | 19.4 23.5 | Anicua y Rivas (2000) |
| <i>M. carmenae</i> <i>M. herrerae</i> | Secciones de tallos | MS | BA (0-100) + ANA (0-100) K (0-100) + AIA (0-100) | Callo y raíces | No reportado | Márquez (2001) |
| <i>M. elongata</i> | Secciones de tallo | MS | BA (no específica concentración) + ANA (0.2) | Callo y brotes | 7.5 | Papafotiou <i>et al.</i> (2001) |
| <i>M. bocasana</i> <i>M. oteroi</i> | Ápices y laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (0.5-2) + ANA (0-0.1) 2iP (0.5-2) + ANA (0-0.1) | Brotes | 7.4 5.5 | Castro-Gallo <i>et al.</i> (2002) |
| <i>M. pectinifera</i> | Basales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (5) + ANA (0.1) | Callo y brotes | 4.38 | Giusti <i>et al.</i> (2002) |
| <i>M. san-angelensis</i> | Brotes regenerados | MS | AIA (6) | Brotes | 26.77 | Rubluo <i>et al.</i> (2002) |
| <i>M. gracilis</i> | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | No especificado | Callo | Abundantes | Poljuha <i>et al.</i> (2003) |
| <i>M. albicoma</i> | Botones florales | MS | BA (5) + ANA (0.1) | Brotes | No reportado | Wyka <i>et al.</i> (2006) |
| <i>M. coahuilensis</i> | Ápices y laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (0-2) | Callo y brotes | 21.25 | Flores (2007) |
| <i>M. bocasana</i> <i>M. densispina</i> <i>M. hahniana</i> <i>M. hutchisoniana</i> <i>M. orcuttii</i> <i>M. pectinifera</i> <i>M. perbella</i> <i>M. picta</i> <i>M. rhodantha</i> | Secciones del ápice | MS | K (0-10) + AIA (0-4) | Brotes | 3.8 5 2.4 4.1 17.4 4.5 7.9 6.4 5.4 | Ramirez-Malagon <i>et al.</i> (2007) |

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

Tabla 2. Continuación

| Especie | Tipo de explante | Medio de cultivo | Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹) | Respuesta <i>in vitro</i> | Número de brotes por explante | Referencia |
|---|--|------------------------------|--|---------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| <i>M. carmenae</i> <i>M. carmenae</i> fo. <i>rubrisprina</i> <i>M. herrerae</i> <i>M. theresae</i> | Ápices y laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (0.5-2) 2iP (1-5) | Brotes | 7.7 6 8.1 8.2 | Retes-Pruneda <i>et al.</i> (2007) |
| <i>M. theresae</i> | Podarios de planta adulta Ápices y bases de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (0-3.5) + ANA (0-0.5) | Brotes | 10.8 40.12 17.8 | Ronquillo (2009) |
| <i>M. coahuilensis</i> | Secciones de tallos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | 2iP (0-2) TDZ (0-2) ANA (0.01-1) | Brotes | 0.6 | Manzo (2010) |
| <i>M. pectinifera</i> | Ápices de plantas adultas | MS | BA (0.5) + 2,4-D (1) | Callo | No reportado | Reyes (2011) |
| <i>M. schiedeana</i> subsp. <i>schiedeana</i> | Secciones longitudinales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> y de brotes previamente generados | MS | BA (0-2) + ANA (0-0.1) | Brotes | 22.4 | Soria-Campos <i>et al.</i> (2013) |
| <i>M. bombycina</i> | Ápices y laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> Callo | MS 50% Peter's Medio testigo | BA (0-2) + ANA (0-0.5) | Brotes y callo | No especificado | Mancilla (2014) |
| <i>M. coahuilensis</i> | Ápices y laterales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> | MS | BA (0.5-2) 2iP (0.5-2) | Brotes | 13.3 | Rodríguez (2014) |
| <i>M. hernandezii</i> | Ápices, laterales y raíces de brotes regenerados <i>in vitro</i> | MS | BA (0-3) + ANA (0-0.5) | Brotes | 2.8 | Pérez (2015) |

2,4-D = Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
BA = Benciladenina

2iP = N⁶-(2-Isopentenil) adenina
K = Kinetina

AIA = Ácido Indolacético
MS = Medio Murashige y Skoog (1962)

ANA = Ácido Naftalenacético

En la mayoría de los trabajos, los explantes fueron tomados de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, esto con la ventaja de que se redujeron las posibilidades de contaminación al tener plántulas asépticas y que por tanto al no someterse a una desinfección el estrés que recibieron los explantes fue menor, disminuyendo así una posible oxidación; además, al contar con tejido joven se aumentan las posibilidades de generar una respuesta morfogénica. Asimismo, en la mayoría de los casos se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS, 1962), con excepción de *Mammillaria elongata*, donde se utilizó el medio Nitsch (N&N) adicionado con sacarosa 20% (Cheema y Mehra, 1981), este medio se caracteriza por tener una menor concentración de macronutrientes en comparación con el medio MS. En *M. bombycina* además del medio MS, también se utilizaron el medio Peter's y un medio testigo conformado por agua y agar-agar (Mancilla, 2014).

Los reguladores de crecimiento más comúnmente utilizados en cactáceas cultivadas *in vitro* y particularmente en este género, son BA y ANA, principalmente en un rango de 0.5 a 2 mgL⁻¹ para la citocinina y de 0.1 a 1 mgL⁻¹ para la auxina. Se ha observado que bajas concentraciones de la auxina han favorecido la formación de brotes, por ejemplo para *M. pectinifera* se utilizaron 5/0.1 mgL⁻¹ (BA/ANA) obteniendo callo y un promedio de 4.38 brotes por explante (Giusti *et al.*, 2002) y en *M. sphacelata* se utilizaron 1/0.1 mgL⁻¹ (BA/ANA) obteniendo así un promedio de 17.5 brotes por explante. Así como hay casos en los que se utilizan las citocininas y las auxinas en combinación, también los hay en los que sólo se utilizan citocininas, como muestra de ello están *M. candida*, *M. craigii* y *M. uncinata*, dónde se adicionó al medio MS 1 mgL⁻¹ (BA) y se obtuvieron una considerable cantidad de brotes en promedio, haciéndose más notorio en *M. candida* con 13.25 brotes por explante, para los casos de *M. coahuilensis* y *M. san-angelensis* se han obtenido unas de las mejores

respuestas, ya que Flores en el 2007 reportó un promedio de 21.25 brotes por explante para la primera y Rubluo *et al.* (2002) obtuvieron en promedio 26.77 brotes por explante para la segunda. De acuerdo a los trabajos señalados queda asentado que el BA por sí sólo o en combinación con alguna auxina en menor proporción genera brotes en distintas especies del género *Mammillaria*.

JUSTIFICACIÓN

Mammillaria humboldtii, es una especie endémica del estado de Hidalgo, con una limitada distribución geográfica en la Barranca de Metztitlán. Existen escasos estudios sobre la biología, distribución y características de la especie, lo que permite entender que se tengan localizadas pocas poblaciones, los individuos son de lento crecimiento y sus semillas presentan una baja tasa de germinación. Actualmente se encuentra catalogada como especie Amenazada por la Norma Oficial Mexicana debido a la colecta ilegal en su hábitat, además del daño a las poblaciones por el sobrepastoreo. Bajo estas consideraciones se empleó el Cultivo de Tejidos Vegetales como una estrategia para su estudio y propagación que permitan proponer condiciones para su conservación *ex situ*, siendo éste el primer trabajo registrado sobre la micropropagación de *M. humboldtii*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para la propagación de *Mammillaria humboldtii*.

Objetivos particulares

- Determinar el tipo de explante con mayor potencial regenerativo.
- Establecer la concentración de reguladores de crecimiento más eficaz para la formación de brotes.
- Promover el enraizamiento de los brotes regenerados *in vitro*.
- Realizar el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En el presente trabajo se utilizaron brotes obtenidos de cuatro plántulas de semillas previamente germinadas *in vitro* en el 2012, de aproximadamente nueve meses de edad, cuya longitud del tallo escasamente alcanzaba medio centímetro. La formación de brotes axilares se obtuvo después de tres subcultivos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con carbón activado (CA) 1 gL⁻¹ y distintas concentraciones de agar (8, 10 y 12 gL⁻¹). Los brotes fueron mantenidos aproximadamente durante un año tres meses en medio MS adicionado con CA 1 gL⁻¹ y 8 gL⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon® antes de ser utilizados como fuente de explantes (Rodríguez, comunicación personal).

Experimento preliminar

A partir de 12 brotes de uno y medio a dos y medio centímetros de longitud (Fig. 4a) se realizó una prueba preliminar para inducir la propagación de brotes *in vitro*. Cada brote se disectó haciendo un corte transversal separando la parte apical y otro corte longitudinal de la parte basal del resto del tallo. Por cada brote se obtuvo un explante apical y dos laterales de aproximadamente medio a un centímetro de longitud (Fig. 4b), éstos se sembraron en medio MS adicionado con la citocinina 6-bencilamonipurina (BA) en concentraciones de 0.5 y 1 mgL⁻¹, sacarosa 30 gL⁻¹, pH 5.7-5.8 y 8 gL⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon®. La siembra se realizó en frascos Gerber® con 25 mL de medio; para cada concentración de BA se utilizaron seis brotes, dando un total de 12 explantes laterales y seis apicales por tratamiento. Los cultivos

fueron incubados a 25 ± 2 °C con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad e intensidad luminosa de 30-40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Después de dos meses en el medio de inducción, los brotes obtenidos se subcultivaron en medio MS, y posteriormente (dos meses), se transfirieron a medio MS adicionado con CA 1.5 gL^{-1} , donde se mantuvieron dos meses más.

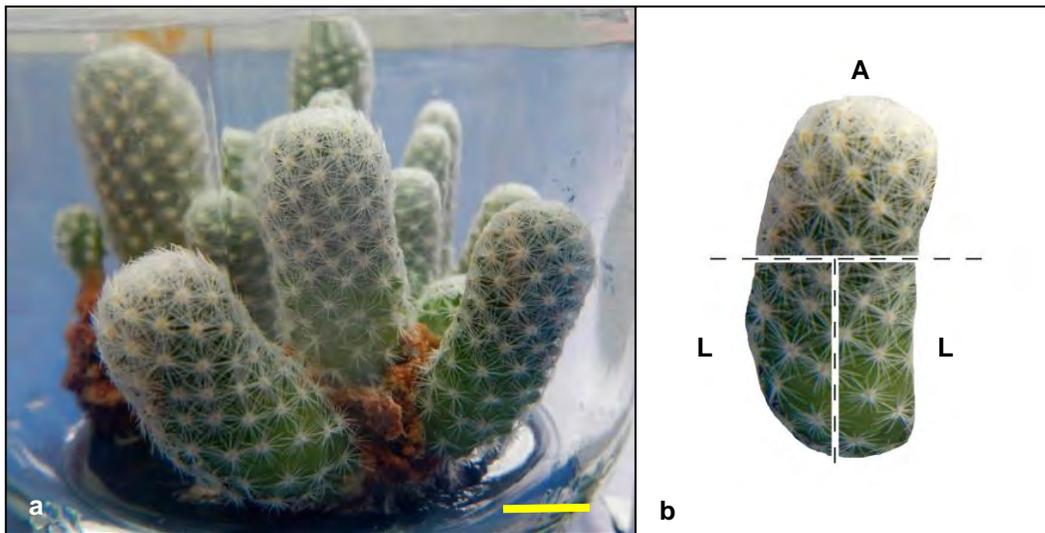


Figura 4. Fuente de explantes de *Mammillaria humboldtii*: a) Brotes *in vitro* utilizados en el experimento preliminar, b) obtención de explantes apicales (A) y laterales (L). Barra= 1 cm.

Barrido hormonal

Con los brotes obtenidos (144) en la prueba preliminar, se realizó un barrido hormonal más amplio en medio MS adicionado con BA (0, 0.5, 1 y 2 mgL^{-1}) en combinación con ácido naftalenacético (ANA) (0, 0.1 y 0.5 mgL^{-1}) conformando un total de 12 tratamientos, adicionados con sacarosa 30 gL^{-1} , pH 5.7-5.8 y agar bacteriológico Bioxon® 8 gL^{-1} .

Por cada tratamiento se utilizaron 12 brotes de medio a un centímetro de longitud. Las condiciones de incubación fueron las mismas que en el experimento preliminar.

Elongación y enraizamiento

Después de dos meses de incubación, los brotes obtenidos (algunos individualizados y otros aún unidos al explante inicial) se subcultivaron en medio MS adicionado con CA 1.5 gL⁻¹ para promover su enraizamiento y que continuaran con su desarrollo.

Aclimatización

Para la aclimatización, se emplearon 83 brotes enraizados (plantas) de uno a cinco cm de longitud en el tallo y 57 brotes sin raíces de medio a dos y medio cm. Las raíces y la zona basal de las plantas y de los brotes sin raíces se enjuagaron con agua destilada para eliminar los restos del medio de cultivo. Posteriormente se les aplicó una solución de fungicida Captan® (1 gL⁻¹) y se dejaron cicatrizar por tres días sobre toallas de papel absorbente. Transcurrido ese tiempo, se les aplicó enraizador comercial Radix 1500® para promover la formación de raíces en los brotes y un mayor número de raíces en las plantas. Se sembraron en charolas transparentes utilizando una mezcla de tierra negra, piedra pómez y arena en proporción 1:1:1. El sustrato se esterilizó previamente en una autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C y a una presión de 1.5 Kg·cm⁻², y antes de colocarse en las charolas fue hidratado con agua destilada y una solución de Captan® (1 gL⁻¹).

Las charolas se mantuvieron en un cuarto de incubación en las mismas condiciones que los cultivos *in vitro* y se conservaron tapadas para evitar la pérdida de humedad; se les proporcionó riego semanal con agua de la llave y la solución de Captan® (1 gL⁻¹). A los tres meses las charolas aún tapadas se llevaron al invernadero y se les dio riego semanal con agua corriente. Después de 7 meses en el invernadero (10 meses *ex vitro*) se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas.

Análisis estadístico

Se contabilizó el número de brotes promedio en los 12 tratamientos y se obtuvieron las medidas de tendencia central (promedio) y de dispersión (error estándar). Se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk y debido a que los datos no presentaron una distribución normal se transformaron logarítmicamente usando la fórmula $X' = \ln (X+1)$, posteriormente se realizó la prueba de ANOVA y de Tukey para separar las medias con diferencias significativas. Se empleó el programa SPSS Statistics 23 y la hoja de cálculo de Excel para elaborar las gráficas correspondientes.

En la figura 5 se muestra un diagrama de flujo de la metodología general para la micropropagación de *M. humboldtii*.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

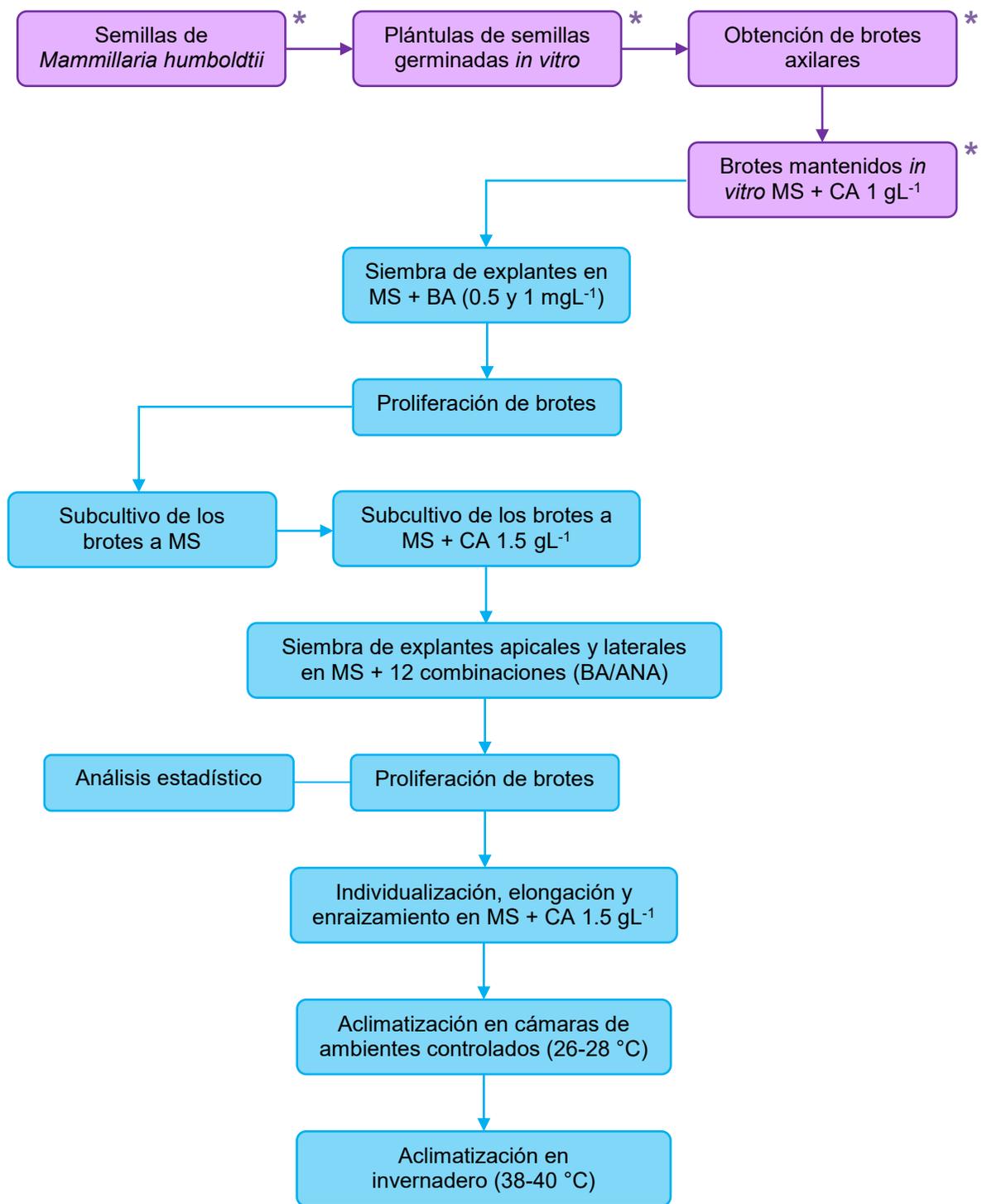


Figura 5. Método general para la micropropagación de *Mammillaria humboldtii* a partir de brotes previamente regenerados *in vitro*. *(Realizado por Rodríguez en 2012, comunicación personal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los siguientes resultados se obtuvieron a partir de semillas que fueron previamente germinadas en condiciones *in vitro* por la Biól. Laura Lorena Rodríguez Núñez en 2012, quien realizó distintos ensayos de germinación en los que modificó la concentración de sales y agar en el medio de cultivo; en total sembró 106 semillas y obtuvo el 38.6% de germinación. De las 41 plántulas obtenidas, el 51.2% se hiperhidrataron y formaron callo compacto, algunas de las plántulas restantes continuaron su crecimiento, llegando a alcanzar medio centímetro de longitud después de nueve meses (Rodríguez, comunicación personal), mientras que en condiciones *ex vitro*, dos plántulas consiguieron tallas de 10 y 12 mm después de tres años 10 meses. Estas observaciones corroboran el bajo porcentaje de germinación y lento crecimiento de esta especie.

A partir de los brotes formados, de plántulas germinadas, en MS adicionado con CA 1 gL^{-1} se realizó un experimento preliminar utilizando medio MS más BA 0.5 y 1 mgL^{-1} para la obtención de más brotes que fueron utilizados posteriormente como fuente de explantes.

Experimento preliminar (BA 0.5 y 1 mgL^{-1})

Cuando el material vegetal *in vitro* es escaso se pueden realizar experimentos preliminares utilizando concentraciones puntuales de reguladores de crecimiento que hayan dado buenos resultados en especies cercanas taxonómicamente. Ejemplo de esto tenemos a *Pelecypora aselliformis*, *P. strobiliformis*, así como a especies y subespecies del género *Turbinicarpus*, en las que se utilizó 0.5 mgL^{-1} de BA (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), del mismo modo Ramirez-Malagon *et al.* (2007) reportaron la micropropagación de especies del género *Mammillaria* utilizando en ensayos previos 3/0.5

mgL⁻¹ de kinetina y ácido indolacético, y finalmente en pruebas preliminares en *Mammillaria hernandezii* se utilizaron cinco diferentes combinaciones con ANA y BA (Pérez, 2015). Tanto en *Mammillaria humboldtii* como en las especies antes mencionadas, la respuesta fue satisfactoria al obtenerse los brotes necesarios que permitieran realizar una exploración más amplia con los reguladores de crecimiento vegetales.

- **Explantos apicales**

A los nueve días de la siembra la respuesta de los explantes apicales en ambas concentraciones (0.5 y 1 mgL⁻¹ BA) fue una ligera oxidación del tejido en la zona de corte que le dio una coloración rojiza al tejido; posteriormente la base de los explantes fue aumentando de tamaño, observándose una separación entre los tubérculos, los cuales cambiaron a un verde más claro (Fig. 6a). A los 15 días, se inició el desarrollo de callo desmenuzable (friable), de color rojizo en la zona de corte de los explantes apicales en ambos tratamientos. En dos de 12 explantes se formaron raíces adventicias en presencia de BA 1 mgL⁻¹, éstas se generaron por debajo de la zona de corte del explante (Fig. 6b) y no continuaron su desarrollo al subcultivarse a medio MS basal, esto posiblemente a que se debilitaron durante el manejo que se les dio a los explantes durante el subcultivo o a la falta de unión entre las raíces y el haz vascular de explante que no permitió su desarrollo.

La formación de brotes se observó a partir de los 24 días de cultivo en ambas concentraciones de BA (0.5 y 1 mgL⁻¹). Estos emergieron de ambos tipos de aréolas, vegetativas en el ápice de los tubérculos (Fig. 6c) y florales o reproductivas en la base o axila de los mismos tubérculos, en forma de diminutas protuberancias (Fig. 6d). Los brotes se desarrollaron siempre en la parte media y la basal de los explantes apicales.

A los 48 días, el crecimiento y desarrollo de los brotes fue evidente, por la presencia de pequeñas espinas entre los tubérculos del explante. Los ápices de los explantes no desarrollaron brotes y mantuvieron su forma. La formación de callo por debajo en la zona de corte fue escasa (Fig. 6e).

A los dos meses de la siembra, la mejor respuesta se observó con BA 1 mgL⁻¹ obteniéndose 10.5 brotes en promedio por explantes, mientras que con BA 0.5 mgL⁻¹ se formaron 7.3 brotes (Fig. 8). La formación de brotes a partir de aréolas vegetativas y reproductivas se puede respaldar por el hecho de que el género *Mammillaria* se caracteriza por la presencia de aréolas dimórficas (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991), por tanto es posible la aparición y desarrollo de brotes tanto en los ápices como en las axilas de los tubérculos. Además como se mencionó, los brotes se formaron en la parte media y basal de los explantes posiblemente por la influencia de la dominancia apical, en donde por la alta concentración de auxinas endógenas en el ápice se inhibe el desarrollo de brotes en el mismo (Taiz y Zeiger, 2006), pero con la adición de BA al medio lograron activarse las aréolas de la zona media y basal de los explantes, y en el caso particular de las aréolas reproductivas, posiblemente se vio influenciada su activación en la parte media del explante porque los individuos del género *Mammillaria* generalmente desarrollan una corona de flores en la región subapical (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991), por tanto las aréolas reproductivas tienen la capacidad de activarse en esa zona. La activación de aréolas vegetativas y reproductivas en explantes apicales también se reportó para *M. schiedeana* ssp. *schiedeana* y *M. coahuilensis* (Soria-Campos *et al.*, 2013; Rodríguez, 2014).

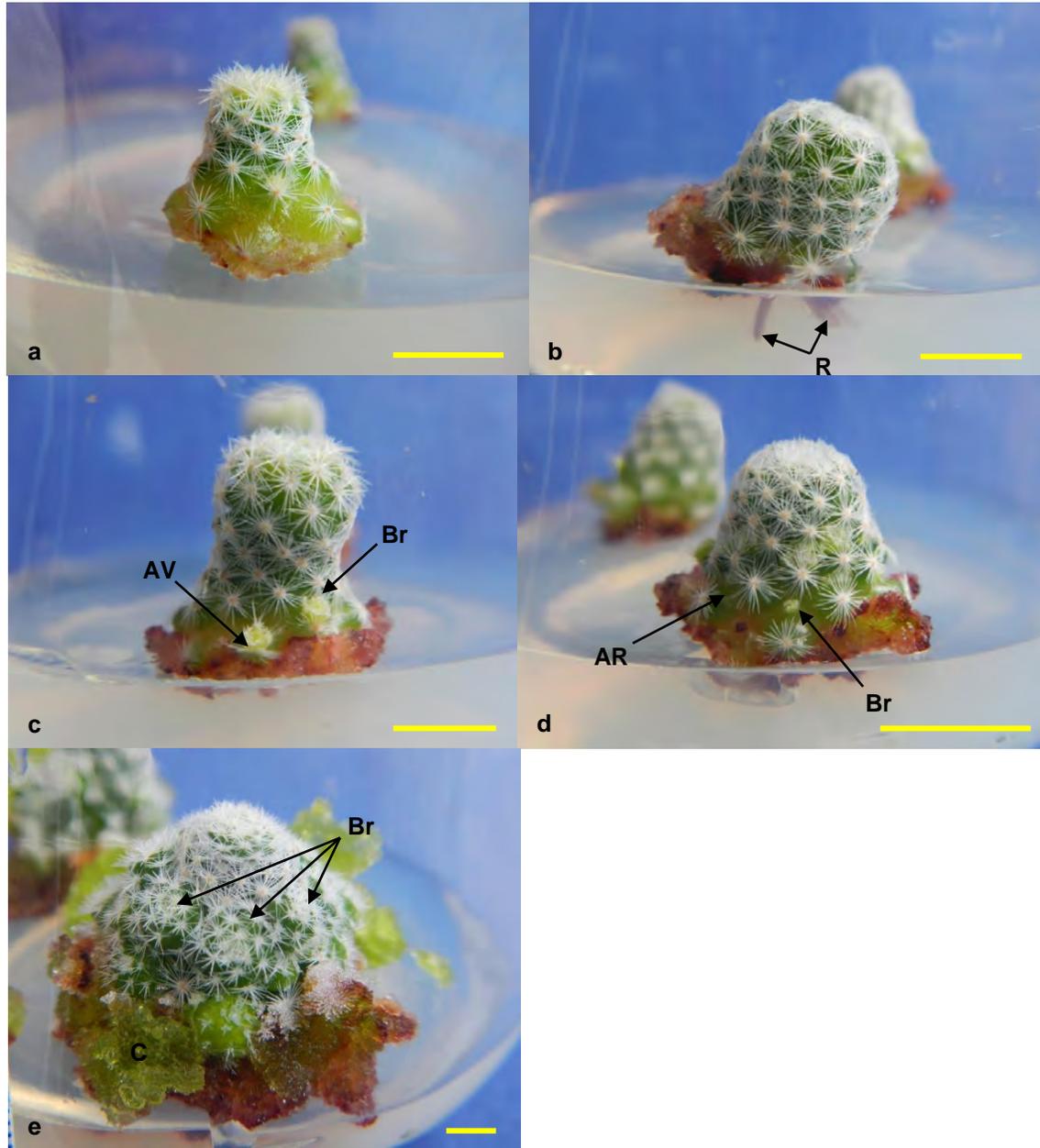


Figura 6. Respuestas morfogénicas de los explantes apicales de *M. humboldtii*: a) separación de los tubérculos por el ensanchamiento de la base del explante en BA 0.5 mgL⁻¹, b) desarrollo de raíces basales en BA 1 mgL⁻¹, c) formación de brotes en las aréolas vegetativas en BA 0.5 mgL⁻¹, d) formación de brotes en las aréolas reproductivas en BA 1 mgL⁻¹ y e) brotes y callo a los 48 días de siembra. AV= aréola vegetativa, AR= aréola reproductiva, Br = brote, C = callo y R = raíz. Barra = 5 mm.

- **Explantos laterales**

A los cuatro días de su siembra los explantes laterales comenzaron a curvarse de forma cóncava hacia el medio de cultivo y presentaron una coloración café en la zona del corte, así como un incremento en el volumen de los tubérculos. A los nueve días la curvatura del explante fue más notoria (Fig. 7a). Después de 15 días sólo en los explantes con BA 1 mgL⁻¹ se observaron pequeños primordios de brotes en forma de protuberancias, esto ocurrió en aréolas vegetativas como reproductivas (Figs. 7b y 7c). Fue hasta los 24 días que en los explantes laterales con BA 0.5 mgL⁻¹ se distinguieron los primordios de brotes, respondiendo en este caso sólo las aréolas vegetativas, a diferencia de lo obtenido en BA 1 mgL⁻¹. Los brotes regenerados en este último tratamiento continuaron su desarrollo y a los 48 días el callo formado en la base de los explantes proliferó, provocando la desorganización de los tejidos y la hiperhidratación de algunos de los brotes ya formados (Fig. 7d).

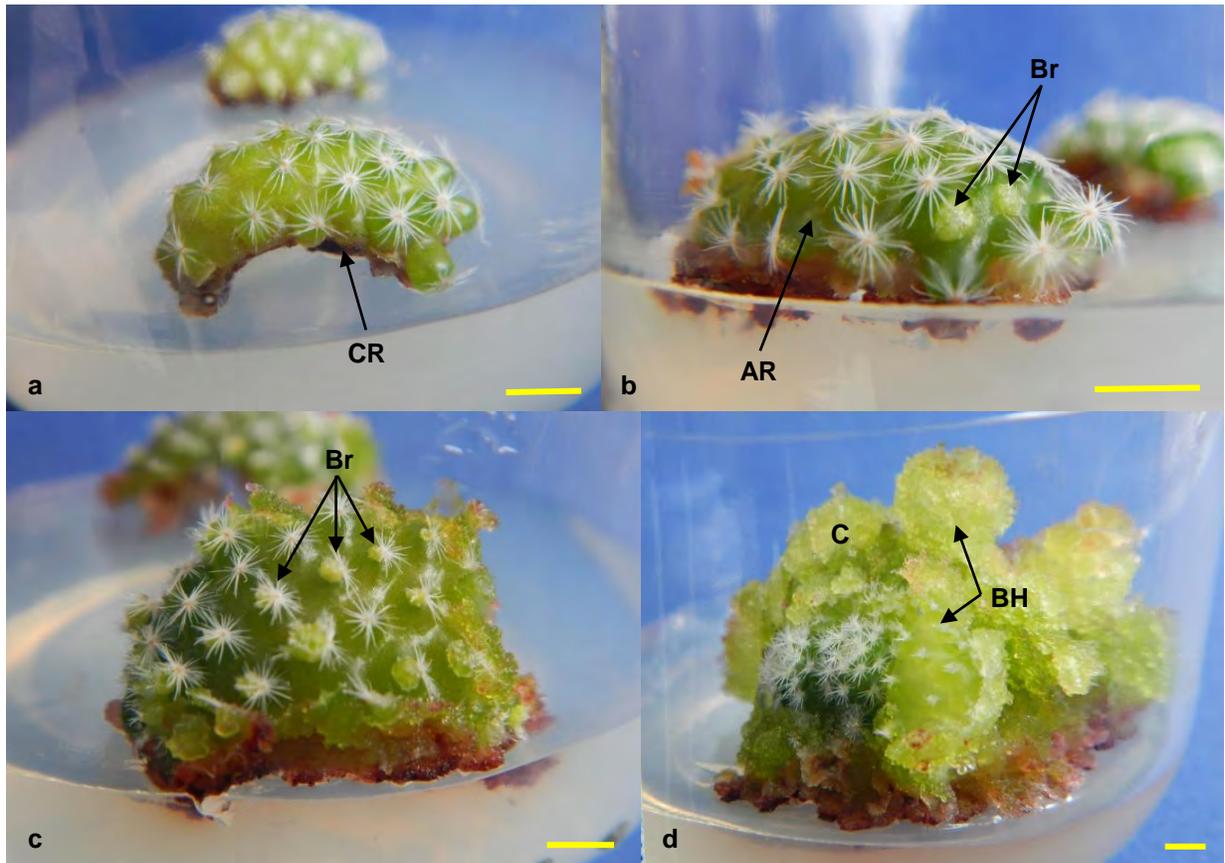


Figura 7. Respuestas morfogenéticas en los explantes laterales de *M. humboldtii*: a) curvatura cóncava y coloración rojiza en la región proximal del explante en BA 0.5 mgL⁻¹, b) formación de brotes en las aréolas reproductivas en BA 1 mgL⁻¹, c) formación de brotes en las aréolas vegetativas en BA 1 mgL⁻¹ y d) brote hiperhidratado con formación de callo en BA 0.5 mgL⁻¹. AR = aréola reproductiva, Br = brote, BH = brote hiperhidratado, C = callo y CR = coloración rojiza. Barra = 25 mm.

A los dos meses de la siembra, la mejor respuesta en los explantes laterales también fue con BA 1 mgL⁻¹ obteniéndose en promedio 6 brotes por explante, mientras que con BA 0.5 mgL⁻¹ se formaron 3.6 brotes, marcándose una diferencia de casi el doble entre ambas concentraciones (Fig. 8). En este tipo de explantes fue necesaria una mayor concentración de BA para estimular la formación de brotes en las aréolas reproductivas, esto posiblemente se vio influenciado porque las aréolas axilares de los tubérculos basales tenían una edad mayor y funcionalmente ya no se esperaba que formaran alguna estructura reproductiva, por lo que para su activación fue necesario un mayor estímulo de BA.

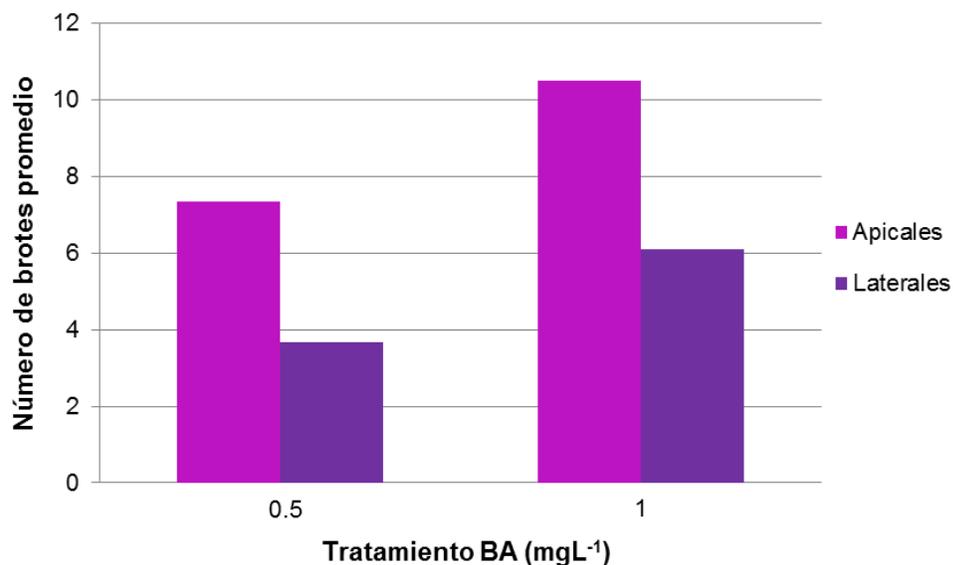


Figura 8. Número de brotes promedio formados en explantes apicales y laterales de *Mammillaria humboldtii* con dos concentraciones de benciladenina (BA), después de dos meses de inducción.

Los brotes obtenidos (de ambos tipos de explantes) a partir del experimento preliminar (algunos aún unidos al explante original) fueron transferidos después de dos meses en el medio de inducción a medio MS basal y dos meses más tarde a medio MS adicionado con CA 1.5 gL⁻¹ para promover su elongación y desarrollo, ya sin el efecto de los reguladores de crecimiento. Después de las primeras dos semanas, el 14.5% de los brotes en MS basal, desarrollaron más brotes a partir de las aréolas vegetativas, es decir, brotes secundarios que surgen de otros previamente regenerados (Fig. 9), tuvieron una apariencia y desarrollo normales, como el que presentaron sus predecesores.

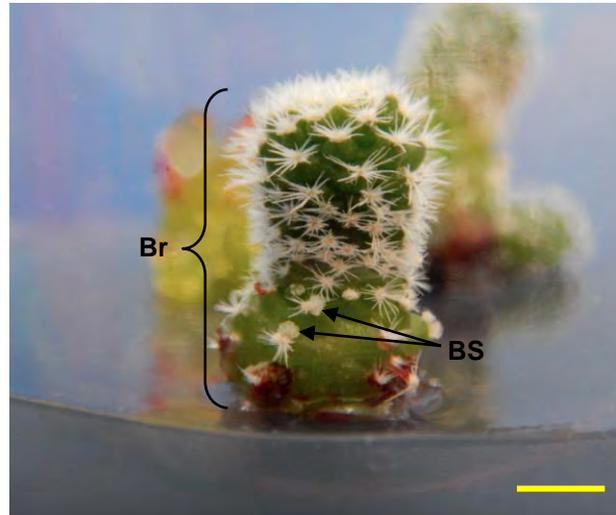


Figura 9. Desarrollo de brotes secundarios a partir de brotes obtenidos en el experimento preliminar, a partir de aréolas vegetativas. Br = brote y BS = brotes secundarios. Barra = 0.5 cm.

Respuestas morfogénicas con el barrido hormonal

Organogénesis

En todos los tratamientos del barrido hormonal BA/ANA, así como en el control, se observó la regeneración de brotes sólo en las aréolas vegetativas de los dos tipos de explantes, a diferencia de lo ocurrido en la prueba preliminar, donde ambos tipos de aréolas (vegetativas y reproductivas) fueron regenerativas. En los explantes apicales se observó la rizogénesis directa en la zona de corte de los explantes, mientras que en algunos brotes del tratamiento control y BA/ANA 0/0.1, 0/0.5, 0.5/0, 0.5/0.5 y 1/0.1 mgL⁻¹ se desarrollaron raíces adventicias a partir de aréolas reproductivas.

- **Explantes apicales**

Durante la segunda semana en el medio de inducción, los explantes de todos los tratamientos se comenzaron a ensanchar de la base, lo que provocó la separación entre sí de los tubérculos. Los explantes cambiaron a un color verde pálido y la zona de corte adquirió una

coloración rojiza, como posible efecto de la escisión o por el efecto de una ligera oxidación provocada por la presencia de radicales libres, como pueden ser especies reactivas de oxígeno (ROS) y compuestos fenólicos que en condiciones de CTV se producen debido a los métodos de desinfección, a los cortes que sufren los explantes y a la composición del medio, entre otros factores (Azofeifa, 2009). Es posible que para *M. humboldtii*, un factor que evitó la necrosis por oxidación de los tejidos haya sido que estos estuvieron previamente en medio MS adicionado con CA, de esta manera cualquier compuesto fenólico o sustancia tóxica que pudiera encontrarse dentro de los brotes fue retirada por la acción del carbón activado (Azofeifa, 2009). En ambos ensayos, el preliminar y el barrido hormonal, la oxidación que se presentó no afectó el desarrollo o respuesta de los explantes. En *Schlumbergera truncata* no se reportaron signos de oxidación (Pérez *et al.*, 1999), mientras que en otras especies de cactáceas el problema de oxidación ha sido tan severo que los explantes mueren, tal es el caso de *Lophophora williamsii* y *Cephalocereus senilis* donde aproximadamente el 30% y el total de los explantes iniciales respectivamente se necrosaron (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997; Flores-León y Ortíz-Montiel, 2000).

En la tercera semana comenzaron a aparecer pequeñas protuberancias en los ápices de los tubérculos (aréolas vegetativas), en los tratamientos con BA/ANA 1/0, 2/0, 1/0.1, 2/0.1, 0.5/0.5, 1/0.5 y 2/0.5 mgL⁻¹, que coincidieron en tener una mayor proporción de BA respecto a ANA. Posteriormente al cabo de ocho semanas ya fueron visibles brotes bien formados en al menos uno de los explantes de cada tratamiento. Durante la formación de los brotes se pudo observar a simple vista un arreglo diferente de las espinas comparado con el de los explantes previo al cultivo en el medio de inducción (Fig. 10).



Figura 10. Comparación del arreglo de las espinas entre a) un brote formado en el experimento preliminar y b) un explante apical en BA/ANA 1/0 mgL⁻¹. Barra = 25 mm.

En los explantes apicales la mayor cantidad de brotes se presentó en BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹ con 8.75 brotes promedio por explante, seguido de 1/0.5 mgL⁻¹ (8.66) y 2/0.5 mgL⁻¹ (6.75), se observó que a bajas concentraciones de citocininas/auxinas el número de brotes fue menor en un rango de 1.66 a 4.33 y se presentó un incremento importante en aquellos tratamientos con solamente citocininas 1/0 y 2/0 mgL⁻¹ (6.33 y 6.5 brotes promedio, respectivamente). El resultado más bajo (1.58 brotes) se obtuvo en el tratamiento control, esta respuesta se puede atribuir a que la concentración endógena de auxina en los ápices es más alta, lo que inhibió la formación de brotes por efecto de la dominancia apical. Las concentraciones más altas utilizadas de la citocinina exógena en presencia de la auxina en el medio de inducción favoreció el incremento en el número de brotes por explante (Tabla 3) (para ver el análisis de comparación de medias revisar la sección *Análisis estadístico*).

Tabla 3. Número promedio de brotes obtenidos a partir de explantes apicales de *M. humboldtii* después de dos meses de inducción.

| Concentración (mgL ⁻¹) | | Brotes por tratamiento | Brotes por explante (media ± ES)* | |
|------------------------------------|------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| BA | ANA | | | |
| 0.0 | 0.0 | 19 | 1.58 ± 1.24 | a |
| 0.5 | 0.0 | 52 | 4.33 ± 0.91 | abc |
| 1.0 | 0.0 | 76 | 6.33 ± 1.05 | bc |
| 2.0 | 0.0 | 78 | 6.5 ± 1.11 | bc |
| 0.0 | 0.1 | 20 | 1.66 ± 0.78 | a |
| 0.5 | 0.1 | 22 | 1.83 ± 0.50 | ab |
| 1.0 | 0.1 | 67 | 5.58 ± 1.06 | bc |
| 2.0 | 0.1 | 105 | 8.75 ± 1.67 | c |
| 0.0 | 0.5 | 22 | 1.83 ± 1.19 | a |
| 0.5 | 0.5 | 44 | 3.66 ± 1.78 | abc |
| 1.0 | 0.5 | 104 | 8.66 ± 2.03 | bc |
| 2.0 | 0.5 | 81 | 6.75 ± 1.21 | bc |

*Letras diferentes indican diferencias significativas

La adición de la auxina exógena pudiera tener un efecto sumatorio con la auxina endógena para inducir en *M. humboldtii* la organogénesis y que a la vez promovería o incrementaría el desarrollo de callo. Un caso contrario fue en *M. bocasana* y *M. oteroi* donde explantes apicales expuestos a BA 2 y 3 mgL⁻¹ respectivamente formaron 2.2 y 2.6 brotes por explante y al adicionar ANA 0.1 mgL⁻¹ (BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹ y 3/0.1 mgL⁻¹) el número de brotes por explante disminuyó a 1.3 y 2 (Castro-Gallo *et al.*, 2002). Algo similar sucede en otras especies de cactáceas como *M. carmenae*, *M. carmenae* fo. *rubrispina*, *M. herrerae* y *M. theresae*, donde una mayor concentración de BA sin la presencia de auxina la respuesta fue más satisfactoria. Así mismo los autores observaron que el tipo de citocinina empleada puede favorecer la respuesta con un incremento en el número de brotes al utilizar 2iP (Retes-Pruneda *et al.*, 2007). En *Peleciphora aselliformis* y *P. strobiliformis* la citocinina BA 2 mgL⁻¹ promovió una mayor formación de brotes (13.7 brotes promedio por explante apical) en comparación con 2iP (6.63 brotes promedio por explante apical) (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002). Es evidente que la especie y el tipo de explante en combinación con

la concentración hormonal influyen en la respuesta morfogénica, como sucedió en el estudio realizado por García-Rubio y Malda-Barrera (2010), donde la mejor respuesta en los explantes apicales de *M. mathildae* se dio en el tratamiento control (1.14 brotes por explante), mientras que al utilizar BA solo o en combinación de AIA la respuesta observada fue de 0.18 a 0.05 brotes por explante.

La formación de raíces se observó en la base de algunos explantes (Fig. 11a), siendo más frecuente en el tratamiento control y ANA 0.5 y 0.1 mgL⁻¹ y únicamente se presentó en un explante en las concentraciones 1/0.1 y 0.5/0.5 mgL⁻¹, la formación de raíces fue notoria a partir de la segunda semana de inducción, algunas continuaron su desarrollo formando raíces secundarias fibrosas, mientras que otras no tuvieron gran desarrollo y no produjeron ramificaciones. Un sólo un explante en BA/ANA 1/0.1 mgL⁻¹ formó un par de raíces que surgieron de entre los tubérculos por organogénesis directa, posiblemente a partir de las aréolas reproductivas ubicadas en la axila de los tubérculos (Fig. 11b). Esta respuesta también se observó en *Thelocactus bicolor*, *Turbincarpus pseudopectinatus* y en *Aporocactus flagelliformis* cultivados con ANA (entre 0.2-1 mgL⁻¹), esto se relaciona con el efecto de las auxinas que *in vitro* estimulan la formación de raíces, sumado a que además los explantes provenían de la parte apical de la planta, por lo que la concentración de auxinas endógenas debió ser mayor en comparación con los explantes del resto de la planta. De esta manera tanto las auxinas endógenas y exógenas trabajaron a la par encontrando el balance ideal para la formación de raíces. De manera similar a lo ocurrido en *M. humboldtii*, algunas de estas raíces se formaron por debajo de la zona de corte y otras más a partir de la superficie del explante (Zamora, 2007; González, 2008; Martínez, 2010).

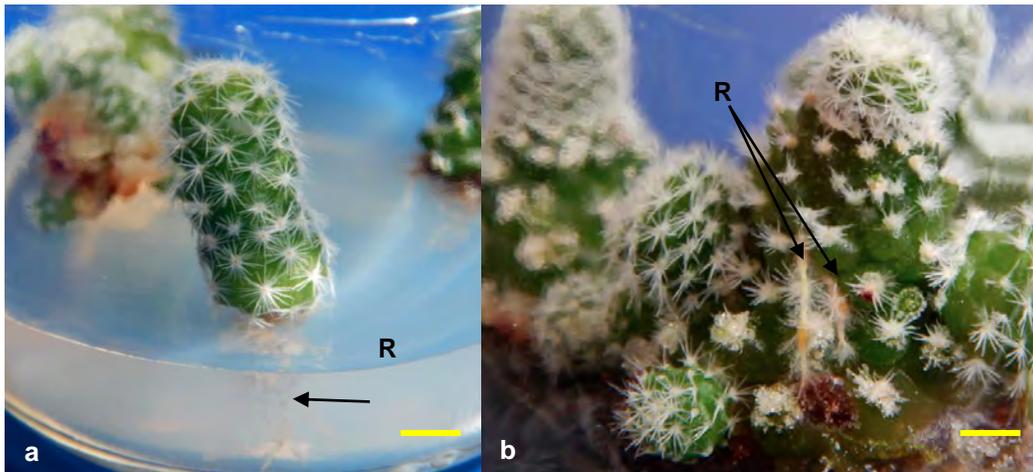


Figura 11. Rizogénesis en explantes apicales de *M. humboldtii*: a) Raíz fibrosa en la base del explante en el tratamiento control y b) raíces adventicias con pelos radiculares generadas posiblemente a partir de aréolas reproductivas en medio BA/ANA 1/0.1. Raíz = R. Barra = 25 mm.

El callo que se desarrolló a partir de la zona de corte fue escaso y presentó una consistencia friable, color verde claro con algunos puntos púrpuras, posiblemente debido a la existencia de betalainas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; López, 2009). La formación de callo es una respuesta común en los trabajos de propagación *in vitro* de cactáceas, tal es el caso de *Lophophora williamsii*, *Mammillaria malthildae* y *Turbinicarpus laui* donde en prácticamente todos los tratamientos con citocininas (BA y K) lo presentaron (Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997; García-Rubio y Malda-Barrera, 2010; Santos-Díaz *et al.*, 2003) sin interferir en la formación de brotes, así como en el caso de *M. humboldtii*. En algunos casos la presencia de callo es predecesora de embriones somáticos, como lo reportado para *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994).

- **Explantes laterales**

Durante la primera semana los explantes laterales de todos los tratamientos comenzaron a curvarse con respecto a la superficie del medio, la zona del corte comenzó a desdiferenciarse y adquirió una coloración rojiza. Una semana después, por efecto de la turgencia de los explantes, los tubérculos se separaron entre sí y se observó la aparición de los primeros primordios de brotes en los tratamientos con BA/ANA 2/0, 0/0.1 y 0.5/0.1 mgL⁻¹.

Los brotes se formaron a partir de las aréolas vegetativas en todos los tratamientos con BA/ANA. Se observaron formas aparentemente crestadas con al menos cinco ápices en un explante de cada tratamiento BA/ANA 1/0.1, 2/0 y 2/0.1 mgL⁻¹ (Fig. 12a), los cuales se elongaron y continuaron su desarrollo normal después del subcultivo a medio MS con CA 1.5 gL⁻¹ (Fig. 12b), perdiendo su apariencia crestada. En *M. coahuilensis* también se reportó algo similar en los tratamientos control y en BA 1 mgL⁻¹ (Flores, 2007).

Se ha reportado que el uso de las citocininas zeatina y BA promueven la regeneración de formas crestadas, ya que tienen un efecto sobre la actividad meristemática al aplicarse en determinadas concentraciones a los medios de cultivo (Iliev y Kitin, 2011). Las formas crestadas en el cultivo *in vitro* se caracterizan por tener únicamente un meristemo apical con una variación en su estructura, a diferencia de las plantas silvestres crestadas, en las que distintos puntos de crecimiento se fusionan (Iliev y Kitin, 2011). Boke y Ross (1978) argumentaron que el origen de las formas crestadas dentro del cultivo *in vitro* se debe a “*un mecanismo genético que posiblemente opera a través de un desbalance hormonal, restringido al meristemo y a sus proximidades*”.

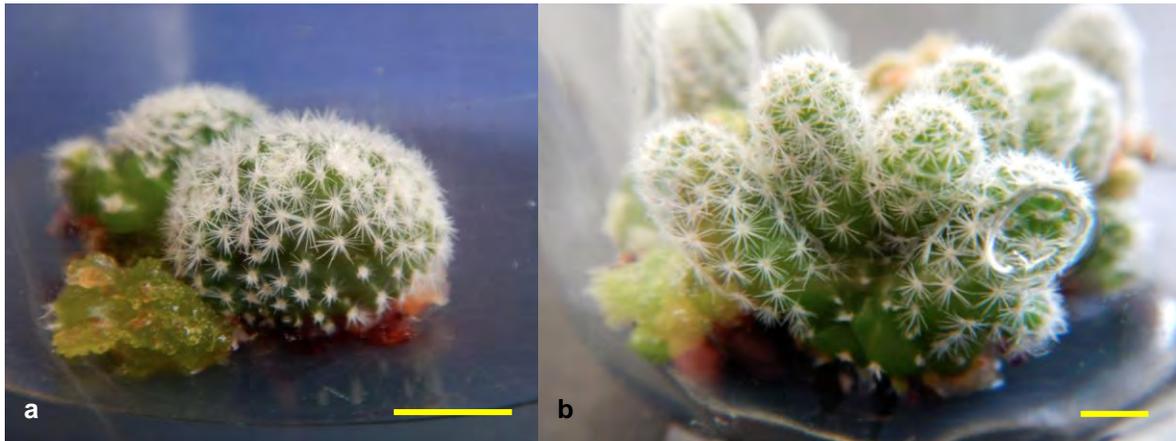


Figura 12. a) Forma de aspecto crestado de *M. humboldtii* originada a partir de un explante lateral en BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹; b) después de ocho meses en medio MS con CA 1.5 gL⁻¹ los brotes continuaron su desarrollo normal. Barra = 0.5 cm.

Después de ocho semanas en el medio de inducción los brotes fueron evidentes, estos se formaron por organogénesis directa a partir del desarrollo de yemas axilares (aréolas vegetativas). Al igual que en la prueba preliminar, los brotes regenerados en los explantes laterales, así como en los apicales, formaron brotes secundarios, aunque con una frecuencia mucho menor, siendo pocos los casos en los que se observaron.

El mayor número de brotes promedio por explante se presentó en el grupo control (4.79) y en las concentraciones de BA 2 y 1 mgL⁻¹ (4.37 y 3.62 respectivamente), seguido de la combinación BA/ANA 1/0.1 (3.33) (Tabla 4) (para ver el análisis de comparación de medias revisar la sección *Análisis estadístico*).

Tabla 4. Número promedio de brotes obtenidos a partir de explantes laterales de *M. humboldtii* después de dos meses de inducción.

| Concentración (mgL ⁻¹) | | Brotes por tratamiento | Brotes por explante (media ± ES)* |
|------------------------------------|-----|------------------------|-----------------------------------|
| BA | ANA | | |
| 0.0 | 0.0 | 115 | 4.79 ± 0.67 b |
| 0.5 | 0.0 | 62 | 2.58 ± 0.43 ab |
| 1.0 | 0.0 | 87 | 3.62 ± 0.80 ab |
| 2.0 | 0.0 | 105 | 4.37 ± 0.65 ab |
| 0.0 | 0.1 | 67 | 2.79 ± 0.42 ab |
| 0.5 | 0.1 | 65 | 2.70 ± 0.45 ab |
| 1.0 | 0.1 | 80 | 3.33 ± 1.25 ab |
| 2.0 | 0.1 | 47 | 1.95 ± 0.49 a |
| 0.0 | 0.5 | 78 | 3.25 ± 0.61 ab |
| 0.5 | 0.5 | 58 | 2.41 ± 0.45 ab |
| 1.0 | 0.5 | 62 | 2.58 ± 0.55 ab |
| 2.0 | 0.5 | 45 | 1.87 ± 0.40 a |

*Letras diferentes indican diferencias significativas

La ruptura de la dominancia apical fue evidente promoviendo la activación de las yemas axilares (Taiz y Zeiger, 2006), principalmente en presencia de la citocinina y una baja concentración de auxina. Se observó que las bajas concentraciones de citocinina/auxina promovieron la formación de brotes en un rango de 2.41 a 3.25 por explante, mientras que concentraciones más elevadas de la citocinina, específicamente con 2 mgL⁻¹, el número de brotes disminuyó (1.87 y 1.95). Pocos son los trabajos que reportan el papel de las auxinas como promotoras de la regeneración de brotes, por ejemplo, Rubluo *et al.* (2002) obtuvieron buenos resultados para *M. san-angelensis* al utilizar únicamente AIA 6 mgL⁻¹, con 26.77 brotes promedio por explante; mientras que para *Thelocactus bicolor* el mejor tratamiento fue ANA 0.5 mgL⁻¹ con 2.87 brotes promedio por explante (Zamora, 2007). De esta manera no se debe subestimar el papel de las auxinas en la formación de brotes.

El número de brotes obtenidos en el barrido hormonal para los tratamientos con BA 0.5 y 1 mgL⁻¹ fue de 2.5 a 6.3 después de dos meses en el medio de inducción. Comparando los resultados de las mismas concentraciones del ensayo preliminar, se observó que en éste, el

número promedio de brotes fue mayor (3.6 a 10.5 brotes promedio por explante). Es posible que los explantes hayan perdido su potencial regenerativo ya que en el segundo ensayo se formaron un menor número de brotes y no se presentó respuesta en las aréolas florales. Esto podría deberse a que los explantes del primer ensayo se obtuvieron de brotes que provenían de plantas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* y los explantes del segundo ensayo provenían de brotes regenerados previamente. Algo similar se reportó para *Pelecyphora strobiliformis*, donde la cantidad de brotes obtenidos al utilizar BA 0.5 mgL⁻¹ fue mayor en la prueba preliminar (3.8 brotes promedio por explante), mientras que en el ciclo posterior se obtuvieron 2.47 y 3.10 brotes promedio en los explantes apicales y laterales, respectivamente (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), en *Mammillaria hernandezii*, también de manera general hubo una mayor respuesta en el experimento preliminar que en la inducción posterior, atribuyéndolo en parte a la edad de los brotes de ambos ensayos, siendo más jóvenes los de la prueba preliminar (Pérez, 2015). Sin embargo, Soria-Campos *et al.* (2013) reportan lo contrario para *M. schiedeana* subsp. *schiedeana*, en donde obtuvieron una mayor respuesta en aquellos explantes provenientes de brotes regenerados a partir de un ciclo preliminar *in vitro*, en comparación con los explantes obtenidos a partir de plántulas de semillas germinadas *in vitro*.

Análisis estadístico

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que estadísticamente hubo diferencias entre tratamientos y el número de brotes promedio, tanto para los explantes apicales ($F= 7.005$, $P= 0.000$) como para los explantes laterales ($F= 2.220$, $P= 0.014$). En los apicales se conformaron cinco grupos, diferenciados por *a*, *ab*, *abc*, *bc* y *c*, los cuales reflejan un

gradiente respecto a las concentraciones de BA/ANA y las respuestas obtenidas (Tabla 3). Donde el grupo *a* contiene a los tratamientos que presentaron los resultados más bajos (1.58 a 1.83 brotes promedio por explante), en los que se utilizó ANA (0.1 y 0.5 mgL⁻¹) y en el tratamiento control; el segundo grupo (*ab*) únicamente incluyó a BA/ANA 0.5/0.1 mgL⁻¹ en donde se obtuvieron 1.83 brotes promedio por explante, mientras que el tercer grupo (*abc*) incluyó a los tratamientos BA/ANA 0.5/0.5 y 0.5/0 mgL⁻¹ (3.66 y 4.33 brotes promedio por explante respectivamente); el cuarto grupo (*bc*) se caracterizó por contener a aquellos tratamientos restantes donde la concentración de BA fue 1 y 2 mgL⁻¹ en combinación con las distintas concentraciones de ANA y en ausencia de la misma (1/0.5, 2/0.5, 2/0, 1/0 y 1/0.1 mgL⁻¹) que generaron mayor número de brotes (5.58 a 8.66 brotes promedio por explante) en comparación con los grupos anteriores. Finalmente, el grupo *c* incluyó al tratamiento BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹ que produjo el mayor número de brotes promedio por explante (8.75).

En distintos trabajos se ha reportado la importancia de la adición de alguna citocinina para la proliferación de brotes en especies del género *Mammillaria*. En el caso de *M. bocasana*, el mejor tratamiento fue BA/ATIB (ácido 2,3,5-triyodobenzoico) 2/2 mgL⁻¹ (4.8 brotes promedio), en contraste con BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹ que fue uno de los tratamientos con menor formación de brotes para la especie (1.3), sin embargo hay que especificar que el ATIB es un inhibidor del transporte de auxinas, lo cual se toma como una ventaja para el detenimiento de la acción de las auxinas endógenas y que hubiera una mayor producción de brotes. Para *M. oteroi* las respuestas más eficaces se obtuvieron en 2 y 4 mgL⁻¹ de BA y 2iP respectivamente (5.3 y 2.8 brotes promedio) (Castro-Gallo *et al.*, 2002) y en *M. schiedeana* subsp. *schiedeana*, a pesar de que la mejor respuesta se obtuvo en BA/ANA 1/0.1 mgL⁻¹ (22.4

brotos), el tratamiento BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹ (14.7 brotes) se encuentra entre los mejores para la especie (Soria-Campos *et al.*, 2013).

En cambio para los explantes laterales sólo se formaron tres grupos, diferenciados por *a*, *ab* y *b* (Tabla 4). El grupo *a* esta conformado por los tratamientos con altas concentraciones de citocinina en combinación con la auxina (2/0.1 y 2/0.5 mgL⁻¹), mostrando los resultados más bajos (1.87- 1.95 brotes promedio por explante); el segundo grupo (*ab*) está constituido por la mayoría de los tratamientos ensayados con las diferentes combinaciones de citocinina/auxina (0.5/0.5, 1/0.5, 0.5/0, 0.5/0.1, 0/0.1, 0/0.5, 1/0.1, 1/0 y 2/0 mgL⁻¹), los cuales reflejaron una respuesta homogénea en relación al número de brotes promedio por explante (2.41 a 4.37 brotes), aunque se aprecia ligeramente que aquellos tratamientos en donde está ausente la auxina y con la más alta concentración de la citocinina hubo un incremento en el número de brotes formados; el último grupo (*b*) que se distingue lo conforma el tratamiento sin reguladores de crecimiento, que fue el que produjo la mayor cantidad de brotes en promedio por explante (4.79).

Estos resultados contrastan con lo reportado por Ramirez-Malagon *et al.* (2007) y Retes-Pruneda *et al.* (2007) para *M. carmenae*, *M. densispina* y *M. hahniana*, en las que a mayor concentración de citocinina en combinación con auxina la respuesta se vio beneficiada. Lo contrario fue reportado para *M. herrerae*, en donde la respuesta obtenida en el tratamiento con una menor concentración de BA (0.5 mgL⁻¹) (8.1 brotes) fue mejor con una mayor concentración de BA (2 mgL⁻¹) (5.8 brotes) (Retes-Pruneda *et al.*, 2007), al igual que en explantes (apicales, laterales y basales) de *M. mathildae*, las mejores respuestas fueron obtenidas en el tratamiento control (García-Rubio y Malda-Barrera, 2010). Lo mismo ocurrió

en los explantes laterales de *M. humboldtii*, sugiriendo que las concentraciones de hormonas endógenas presentes en los explantes fueron las suficientes para producir brotes.

En la figura 13 se compara el número de brotes obtenidos de los dos tipos de explantes (apicales y laterales) en los diferentes tratamientos, observándose que en general hubo una mayor respuesta en los explantes apicales (al igual que en la prueba preliminar), en donde el número de brotes alcanzó cifras tres veces superiores a los laterales (BA/ANA 2/0.1, 1/0.5 y 2/0.5 mgL⁻¹). Esta condición posiblemente se puede extrapolar a este ensayo por motivos similares a los discutidos previamente para el ensayo preliminar (aréolas dimórficas, rompimiento de la dominancia apical, edad de los tubérculos).

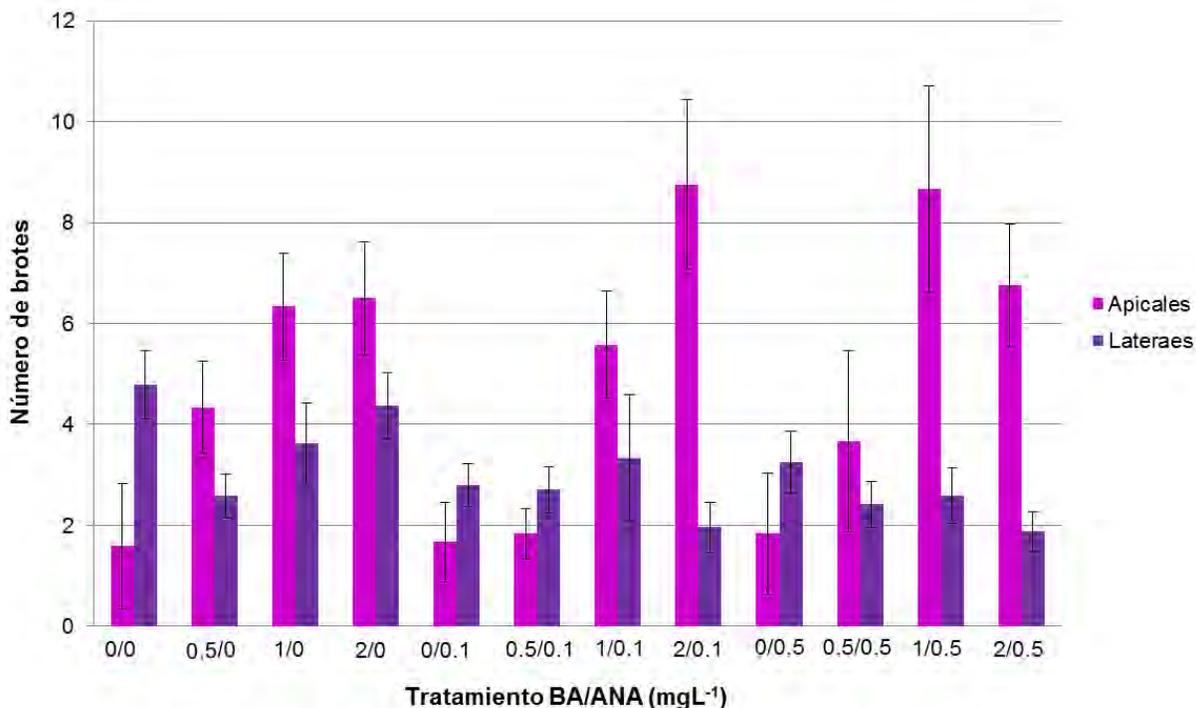


Figura 13. Número de brotes promedio por explante de *M. humboldtii* para cada tratamiento y tipo de explante después de dos meses de inducción. Se observa una mayor respuesta en los apicales.

Elongación y enraizamiento

Para promover su elongación, brotes con una longitud de al menos medio centímetro fueron individualizados y transferidos a medio MS con CA 1.5 mgL⁻¹ y aquellos brotes menores a medio centímetro que estaban agrupados, aún no totalmente diferenciados en su base y que no pudieron individualizarse, se transfirieron como tal al mismo medio para evitar dañarlos y que continuaran su desarrollo hasta poder separarlos del explantes que les dio origen. En todos los casos se retiró la mayor cantidad de callo para evitar que continuara su proliferación.

Se ha reportado que el uso de CA en el medio de cultivo absorbe los remanentes de los reguladores de crecimiento que aún se conserven en los brotes regenerados, siendo una ventaja ya que los primeros pueden inhibir tanto el crecimiento como el enraizamiento de los brotes, además de que provee condiciones de oscuridad que facilitan el desarrollo de raíces (Pan y van Staden, 1998).

En general todos los brotes procedentes de los diferentes tratamientos presentaron una apariencia homogénea, destacando así su forma cilíndrica y un arreglo distinto de sus espinas, perdiendo temporalmente la apariencia que presenta en su hábitat natural (la cual recuperaron posteriormente durante la aclimatización en el invernadero). Esto se atribuye a las condiciones *in vitro* que propician un crecimiento acelerado y variaciones anatómicas en los brotes (Malda *et al.*, 1999; Pospíšilová *et al.*, 1999), principalmente por efecto de las bajas intensidades luminosas en los cuartos de incubación.

Después de permanecer dos meses en el medio de elongación (MS + CA 1.5 gL⁻¹) el 30% de los brotes de *M. humboldtii* formó raíces de manera espontánea. Este porcentaje puede considerarse bajo comparado con el obtenido en *Acharagma aguirreana*, *Pachycereus schottii*, *Stenocereus stellatus* y *Mammillaria hernandezii* donde se logró el 100% de brotes

enraizados, utilizando medio MS adicionado con 3 gL^{-1} de CA para los tres primeros y medio MS con el 50% de sus sales adicionado con 0.5 gL^{-1} de CA para el último (Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez, 2015). Respuesta similar se obtuvo en *Echinocereus schmollii* y *Escontria chiotilla* con porcentajes del 72.2% y 100% de brotes enraizados respectivamente al utilizar 2 gL^{-1} de CA (Retes-Pruneda *et al.*, 2007), mientras que en *Mammillaria schiedeana* subsp. *schiedeana* se consiguió el 80% de brotes con raíces utilizando sólo 1 gL^{-1} de CA (Soria-Campos *et al.*, 2013).

Para incrementar el porcentaje de enraizamiento en los brotes de *M. humboldtii* se sugiere adicionar alguna auxina, como lo reportado en *M. bocasana* y *M. oteroi* donde el mayor porcentaje de brotes enraizados se obtuvo al utilizar AIB 1 mgL^{-1} (65%) y AIA 1 mgL^{-1} (75%) respectivamente para cada especie (Castro-Gallo *et al.*, 2002). En *M. carmenae* fo. *rubrisprina* se registró el 67.2% con AIA 0.5 mgL^{-1} , mientras que para *M. herrerae* y *M. theresae* se obtuvo el 59% y 54.8% de enraizamiento respectivamente con AIB 0.5 mgL^{-1} (Retes-Pruneda *et al.*, 2007). Se ha reportado también que en algunas especies de cactáceas no ha sido necesario adicionar auxinas ni CA para promover el enraizamiento, tal es el caso de *M. bocasana*, *M. carmenae*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. pectinifera*, *M. picta*, *M. rhodantha* y *M. zephyranthoides* que generaron raíces en el mismo medio de inducción (Ramirez-Malagon, 2007; Retes-Pruneda *et al.*, 2007). Se puede apreciar que la rizogénesis en el género *Mammillaria* es variable de acuerdo a la especie, generando raíces tanto con la adición de auxinas como de CA, incluso en ausencia de estos.

Aclimatización

Se seleccionaron 140 brotes de entre medio a dos centímetros para la aclimatización, de los cuales sólo 83 contaban con raíces. Después de tres días de cicatrización, los brotes presentaron una disminución de su volumen por deshidratación y en algunos la epidermis se observó con una apariencia rugosa. Después de una semana de su siembra en el sustrato, únicamente dos brotes murieron por deshidratación y con el transcurso de los días los tubérculos que presentaban un arreglo distinto de sus espinas dejaron de estar perpendiculares al ápice de los mismos, los brotes incrementaron su talla y adquirieron paulatinamente su forma globosa del ápice hacia la base. Estos cambios ocurren durante la aclimatización donde los brotes van normalizando sus características anatómicas, morfológicas y/o fisiológicas (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Al transcurrir tres meses en un cuarto de incubación, las charolas se llevaron a un invernadero (Fig. 14 a). El porcentaje de sobrevivencia se evaluó después de 10 meses en condiciones *ex vitro*, siendo de 98.5% (138 plantas vivas), con la generación de raíces en aquellos brotes que no contaban con ellas y aumento de las mismas en los brotes que sí las presentaban (14 d y e). Papafotiou *et al.* (2001) reportaron la aclimatización de *Mammillaria elongata* tanto en su forma normal como en su forma crestada, obteniendo una sobrevivencia en un rango del 90 al 100% cuando los brotes presentaban raíces y del 50 al 60% cuando carecían de ellas al momento de sembrarlos en el sustrato, siendo notoria la importancia de las raíces para lograr mayor sobrevivencia. En contraste con lo observado en *M. humboldtii*, donde uno de los dos brotes muertos ya presentaba raíces *in vitro* y el otro no. En otros trabajos también se han reportado altos porcentajes de sobrevivencia *ex vitro*, como en *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecocyphora aselliformis* con porcentajes de

sobrevivencia entre 76.3 y 92% (Giusti *et al.*, 2002), sin embargo en algunas otras especies la aclimatización ha representado un mayor reto debido a la pudrición de las raíces, ejemplo de esto ocurrió con *Mammillaria bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcuttii*, *M. pectinifera*, *M. picta*, *M. perbella*, *M. rhodantha* y *M. zephyranthoides*, a las cuales para superar esta etapa, se deshidrataron los brotes y posteriormente sumergieron la parte basal en una solución de AIB 100 mgL^{-1} , obteniendo así una sobrevivencia entre el 84.5 y 96.5% (Ramirez-Malagon *et al.*, 2007). En *Mammillaria coahuilensis*, Rodríguez (2014) reportó entre el 5 y 45% de sobrevivencia debido a los problemas de pudrición.

Después de 10 meses en condiciones *ex vitro*, las plantas aumentaron la longitud del tallo de 3 a 15 mm, mientras que el ensanchamiento del ápice también fue notorio en un rango de 3 a 16 mm, es importante resaltar estos datos, ya que como bien se mencionó, la especie es de muy lento crecimiento, pero gracias a una aclimatización exitosa el crecimiento de los individuos fue notablemente acelerado (Figs. 14 a, b y c). En *Nicotiana tabacum* y *Spathiphyllum floribundum* también se observó beneficiado el crecimiento de las plantas después de un periodo de adaptación a las condiciones *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Después de 11 meses a partir de que inició la aclimatización, tres plantas de las tallas más grandes presentaron botones florales (cuatro cada uno), los cuales se desarrollaron adecuadamente presentando antesis (Fig. 15). Se realizaron polinizaciones manuales entre las flores de estos individuos, esperando formen frutos en un futuro a pesar de que contienen la misma información genética, ya que se sabe que ésta especie presenta un sistema xenógamo facultativo, es decir, que aunque la mayor parte de la fertilización pueda ser producto de entrecruza, también se puede llegar a presentar autocruza (Martínez-Ramos *et al.*, 2015).

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada



Figura 14. Brotes de *M. humboldtii* a) durante la segunda semana de siembra en sustrato, b) después de 4 meses de haber iniciado la aclimatización, c) tras 10 meses en condiciones *ex vitro*; formación y desarrollo de raíces en d) brotes y e) en plantas, después de 10 meses de siembra en sustrato. Barra = 1 cm.



Figura 15. Floración de *Mammillaria humboldtii* después de 11 meses en condiciones *ex vitro*. Barra = 1 cm.

PERSPECTIVAS

Es importante destacar que el uso del Cultivo de Tejidos Vegetales resultó eficiente para la propagación de *Mammillaria humboldtii* a partir de brotes *in vitro*, además de que muestra que es posible generar una gran cantidad de individuos a partir de escaso material biológico.

Se observó que esta especie, como muchas otras de la familia Cactaceae, presenta individuos de muy lento crecimiento y bajos porcentajes en la germinación de sus semillas. Considerando que para el establecimiento de los cultivos *in vitro* se prefiere utilizar semillas germinadas, éste experimento comenzó con un escaso número de éstas, debido a los severos problemas de oxidación e hiperhidratación que presentaron las plántulas (Rodríguez, comunicación personal), por lo que resulta importante completar la primera parte de la metodología de propagación *in vitro* de *M. humboldtii*, mediante la repetición de los ensayos de germinación, principalmente para perfeccionar la técnica de desinfección superficial, la proporción de sales en el medio de cultivo y sobre todo la concentración de agar.

Asimismo, la posibilidad de contar con más semillas permitiría establecer finalmente los tiempos que se requieren en cada etapa de la micropropagación de esta especie, explorar explantes diferentes, su respuesta morfogénica en otros medios de cultivo y con otros reguladores de crecimiento, así como determinar el efecto de las auxinas en el enraizamiento *in vitro* de los brotes. Además de que los regenerantes obtenidos, al provenir de un pool genético más amplio, poseerían una mayor variabilidad con la posibilidad de entrecruzarse (o realizar polinizaciones manuales) para obtener más semillas sin necesidad de recurrir a colectas silvestres.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

Igualmente, en este trabajo se demostró que los brotes propagados *in vitro* alcanzaron una mayor longitud en menor tiempo comparadas con dos plántulas germinadas *ex vitro* (Fig. 16), y que una vez establecidos en invernadero fueron capaces de formar flores en corto tiempo. Lo anterior confirma al Cultivo de Tejidos Vegetales como una alternativa viable de propagación masiva permitiendo que, esta especie Amenazada, pueda ser comercializada abasteciendo el mercado sin afectar a las poblaciones evitando el saqueo ilegal de ejemplares silvestres, contribuyendo a la par a su conservación *ex situ*.



Figura 16. Tamaños comparativos entre a) una plántula germinada *ex vitro*, de tres años 10 meses con 1.2 cm de longitud y b) una planta obtenida del barrido hormonal, después de 10 meses de iniciada la aclimatización con 3 cm de longitud del tallo.

CONCLUSIONES

- La micropropagación de *Mammillaria humboldtii* se logró a partir de explantes obtenidos de escasos brotes previamente regenerados *in vitro*.
- La formación de brotes se obtuvo por organogénesis directa a partir de las aréolas vegetativas (ubicadas en el ápice de los tubérculos) y reproductivas (en las axilas de los tubérculos) de explantes apicales y laterales.
- Para los explantes apicales, el tratamiento que promovió la mayor formación de brotes (8.75 brotes en promedio por explante) fue BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹, seguido del tratamiento 1/0.5 mgL⁻¹ con 8.66 brotes en promedio.
- Los explantes laterales respondieron mejor en el tratamiento control, sin reguladores de crecimiento, formando 4.7 brotes en promedio por explante, seguido del tratamiento BA/ANA 2/0 mgL⁻¹ (4.37 brotes en promedio).
- Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos empleados.
- Los explantes apicales tuvieron una mayor respuesta morfogénica en comparación con los laterales.
- Las aréolas vegetativas de ambos tipos de explantes conservaron su potencial regenerativo en la segunda generación de brotes utilizados para el barrido hormonal, a diferencia de las aréolas reproductivas que sólo formaron brotes en el primer ensayo.
- El enraizamiento *in vitro* de los brotes generados sólo alcanzó el 30%, después de dos meses en el medio de elongación (MS + CA 1.5 gL⁻¹).
- Se obtuvo el 98.5% de sobrevivencia de 140 brotes aclimatizados, después de 10 meses en condiciones *ex vitro*.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

- Tres individuos de *M. humboldtii* formaron flores después de 11 meses de iniciada la aclimatización.
- Este es el primer reporte de la propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales de *Mammillaria humboldtii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel A. y J. Vincent. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. 1ª ed. Editorial CATIE. Cartago, Costa Rica. 38 pp.
- Álvarez R., H. Godínez-Álvarez, U. Guzmán y P. Dávila. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 7-16.
- Álvarez, P. 2013. Corredor Biológico Mesoamericano en México. CONABIO. *Biodiversitas* 110:1-5.
- Anderson E. 2001. The cactus family. Timber Press. Portland, Oregon, EU p. 423.
- Anicua J. y R. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 68 pp.
- Arias S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM.059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 50 (4): 100-125.
- Arias S., S. Gama-López, U. Guzmán-Cruz y B. Vázquez-Benítez. 2012. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95. *Cactaceae* Juss. Instituto de Biología, UNAM, 235 pp.
- Arias S. y J. Flores, 2013. La familia Cactaceae. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.) *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p. 492-503.
- Arredondo A. 2002. Propagación y mantenimiento de cactáceas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Palma de La Cruz. Folleto Técnico 21. San Luis Potosí.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20: 153-175.
- Baena M., S. Jaramillo y J. Montoya. 2003. Material de apoyo a la capacitación en conservación *in situ* de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

- Bárcenas R. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* 68:11-15.
- Becerra R. 2000 Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* 32:2-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. CONABIO. *Biodiversitas* 40: 8-11.
- Boke N. y R. Ross. 1978. Fasciation and dichotomous branching in *Echinocereus* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 65(5): 522-530.
- Brachet C., M. Lacoste y F. Otero. 1990. Mexican Field-Notes (1). *The Journal of Mammillaria Society* 30: 44-47.
- Bravo-Hollis H. 1997. Introducción. En: Valles S. y L. Rodríguez (Eds). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. pp. 10-12.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las Cactáceas de México (Volumen 3)*. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F p. 158.
- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. *El interesante mundo de las cactáceas*. Fondo de Cultura Económica. México D.F p. 225.
- Buchanan B., W. Gruissem y R. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 1ª ed. American Society of Plant Biologist. EU.
- Castro-Gallo I., E. Meza-Rangel, M. Evelia y E. Pérez. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4(2): 5-24.
- Cheema G. y P. Mehra. 1981. Anther culture of a cactus: *Mammillaria elongata* var. *Tenius* (DC) Schumann. *The National Cactus and Succulent Journal* 36(1): 8-11.
- CONANP. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Áreas Naturales Protegidas. Página en red: www.conanp.gob.mx/regionales/. Consultada 19 de junio de 2015.
- Dávila-Figueroa C., Ma. Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:540-545.
- Fay M. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Fitz B., W. Fitz, H. Hernández, M. Sotomayor and M. Smith. 2013. *Mammillaria humboldtii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T152892A691543.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T152892A691543.en>. Consultada 22 de febrero de 2016

- Flores D. Y. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 61 pp.
- Flores-León R. y G. Ortiz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Halsetonia* 7: 92-96.
- Flores A. y G. Manzanero. 2010. El género *Mammillaria* en Oaxaca: Relación entre filogenia y la distribución geográfica. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 55 (4): 100-111.
- García-Rubio O. y G. Malda-Barrera. 2010. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. *Scientia Horticulturae* 45(6): 934-938.
- George E., M. Hall y G. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1. The Background. Springer. EU. 501 pp.
- Giusti P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Godínez-Alvarez H. y P. Ortega-Baes. 2007. Mexican cactus diversity: environmental correlates and conservation priorities. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 81-87.
- Goettsch B., C. Hilton-Taylor, G. Cruz-Piñón, J. P. Duffy, A. Frances, H. M. Hernández, R. Inger, C. Pollock, J. Schipper, M. Superina, N.P. Taylor, M. Tognelli, A. M. Abba, S. Arias, H. J. Arreola-Nava, M. A. Baker, R. T. Bárcenas, D. Barrios, P. Braun, C. A. Butterworth, A. Búrquez, F. Caceres, M. Chazaro-Basañez, R. Corral-Díaz, M. V. Perea, P. H. Demaio, W. A. Duarte, R. Durán, L. Faúndez, R. S. Felger, B. Fits-Maurice, W. A. Fitz-Maurice, G. Gann, C. Gómez-Hinostrosa, L. R. Gonzales-Torres, M. P. Griffith P. C. Guerrero, B. Hammel, K. D. Heil, J. G. Hernández-Oria, M. Hoffmann, M. Ishiki, R. Kiesling, J. Larocca, J. L. León-de la Luz, C. R. Loaiza, M. Lowry, M. C. Machado, L. C. Majure, J. G. Martínez, C. Martorell, J. Maschinski, E. Méndez, R. A Mittermeier, J. M. Nassar, V. Negrón-Ortiz, L. J. Oakley, P. Ortega-Baes, A. B. Pin, D. J. Pinkava, J. M. Porter, R. Puente-Martinez, J. Roque, P. Saldivia, E. Sánchez, M. Smith, J. M. Sotomayor, S. N. Stuart, J. L. Tapia, T. Terrazas, M. Terry, M. Trevisson, T. Valverde, T. R. Van, M. E. Véliz-Pérez, H. E. Walter, S. A. Wyatt, D. Zappi, J. A. Zavala-Hurtado y K. J. Gaston. 2015. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature plants*. Artículo en línea doi:10.1038/nplants.2015.142.

- González C. O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología experimental), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 106 pp.
- Gratton J. y M. Fay. 1999. *In vitro* Propagation of Succulent Plants. En: Hall R. (Ed.). Plant Cell Culture Protocols. EU. P: 135-140.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y CONABIO, México, D.F 315 pp.
- Hernández H. y C. Gómez-Hinostrosa. 2005. Cactus diversity and endemism in the Chihuahuan Desert Region. En: Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico. Cartron J-L, G. Ceballos, Felger R. S. (eds.). Oxford University Press. 264-274 pp.
- Hernández H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica* 26: 33-52.
- Hernández J., G Ruiz y E. Sánchez. 1994. Apuntes sobre la propagación *in vitro* de *Melocactus bellavistensis* Pauth et Backeb. Del Perú. *Botanic Gardens Micropropagation News* 1(7): 85-86.
- Hunt D., N. Taylor y C. Graham. 2006. The new cactus lexicon. Milborne Port. England.
- Iliev I. y P. Kitin. 2011. Origin, morphology, and anatomy of fasciation in plants cultured *in vivo* and *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 63: 115-129.
- Infante R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 155-159.
- Iriondo J. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Investigación agraria. Producción y protección vegetal* 16(1): 5-22.
- IUCN 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015-4. Página en red: www.iucnredlist.org. Consultada 22 de noviembre de 2015
- Jiménez C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* 12(1): 1-23.
- Kolář Z., J. Bártek y B. Vyskot. 1976. Vegetative Propagation of the Cactus *Mammillaria woodsii* Craig Through tissue culture. *Experientia* 32: 668-669.

- Kumar P. y C. Shiong. 2012. Plant tissue culture for biotechnology. En: Altman A. y P. Hasegawa (Eds.). Plant Biotechnology and Agriculture Prospects for the 21st Century. Elsevier, EU p. 131-138.
- Lara M. L. 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem. (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 98 pp
- Lascuráin M., R. List, L. Barraza, E. Díaz, F. Gual, M. Maunder, J. Dorantes y V. Luna. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: Capital natural de México, volumen II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México p: 517-544.
- Lema-Ruminska J. y D. Kulus. 2012. Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentrations. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 11(4): 77-87.
- López H. A. 2009. Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 67 pp.
- López A. L. y L. P. Olguín. 2013. El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco y S. Vázquez (Eds.). Biología de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 521-527.
- Malda G., R. Backhaus y C. Martin. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 1-9.
- Mancilla V. P. L. 2014. Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. y *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 59 pp.
- Manzo R. S. M. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis de Maestría en Ciencias (Recursos Genéticos y Productividad). Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza en Investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillos, Texcoco, Edo. de México, 62 pp.
- Márquez V. A. 2001. Inducción y multiplicación *in vitro* de tejido calloso de *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria herrerae* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo),

Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada

- Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 68 pp.
- Martínez-Vázquez O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. *Journal of Horticultural Science*. 64(1): 99-105.
- Martínez L. L. 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem. (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 98 pp.
- Martínez-Ramos M., G. Arroyo-Cosultchi, J. Golubov y M. C. Mandujano. 2015. Fenología y sistema de apareamiento de *Mammillaria humboldtii*: una especie en peligro de extinction. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 60: 80-90.
- Martorell C. 2013. Ciencia Espinosa: Algunas reflexiones en torno a la investigación con plantas suculentas en México. En: Briones- Salas M., G. Manzanero y G. González (Eds.). Estudios en zonas áridas de Oaxaca: homenaje al Dr. Alejandro Flores Martínez. Instituto Politécnico Nacional- CIDIIR unidad Oaxaca, México p: 87-98.
- Minocha S. C. y P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany* 61(2): 168-173.
- Moebius-Goldammer K., M. Mata-Rosas y V. Chávez-Avila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 388-393.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- National Geographic En Español. 2015. Página en red: www.ngenespanol.com/naturaleza/ecosistemas/14/06/19/cactaceas-mexico-botin-extranjeros.html. Consultada 3 Junio 2015.
- Neyra L. y L. Durand. 1998. Capítulo 3: Biodiversidad. En CONABIO: La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 62-2 pp.
- Olguín S. L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 85 pp.

- Ortega-Baes P. y H. Godínez-Alvarez. 2006. Global Diversity and Conservation Priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15: 817–827.
- Ortiz-Montiel J. y R. Alcántara. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52: 3-5.
- Pan M. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture- A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Papafotiou M., G. Balotis, P. Louka y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.
- Pérez J., R. Flores y G. Ortiz. 1999. Reproducción *in vitro* del “Cactus de Navidad” *Schulumbergera truncata* (Haworth) Moran. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 54: 79-83.
- Pérez-Molphe-Balch E., Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 43:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E., R. Ramírez, H. Núñez, N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 179 p.
- Pérez-Molphe-Balch E. y C. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* Propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg y *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 38:73-78.
- Pérez H. F. 2015. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 68 pp.
- Poljuha D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubešić y M. Krsnik-Rasol. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 117-123.
- Pospíšilová J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzáková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(2): 481-497.
- Ramirez-Malagon R., I. Aguilar-Ramirez, A. Borodanenko, L. Perez-Moreno, J. Barrera-Herrera, H. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 43:660-665.

- Retes-Pruneda J., M. Valadez-Aguilar, M. Pérez-Reyes y E. Pérez. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 7-16.
- Reyes G. 2011. Expresión genética durante la inducción *in vitro* de brotes en *Mammillaria pectinifera*. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 61 pp.
- Robbins C. 2003. Los cactus del Desierto Chihuahuense en los Estados Unidos: Una evaluación del comercio, la administración y las prioridades de conservación. En: Robbins C. (Ed.). Comercio Espinoso. Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. Washington D.C.: Fondo Mundial para a Naturaleza. P: 1-52.
- Robles R. 2009. Las unidades de manejo para la conservación de vida silvestre y el Corredor Biológico Mesoamericano México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México.
- Rodríguez N. L. L. 2014. Micropropagación de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), a partir de semillas de plantas regeneradas *in vitro*. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 77 pp.
- Ronquillo V. N. 2009. Regeneración *in vitro* y Conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae* Cutak. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 126 pp.
- Rubluo A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). En Bajaj P. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation 40:193-205.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in-vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Rubluo A., T. Martín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultures *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95: 341-349.
- Santos-Díaz Ma. d. S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y Ma. d. L. Santos-Díaz. 2003. Clonal propagation of *Turbiniacarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction. *Bradleya* 21: 7-12.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categoría de

- riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* (30 de diciembre de 2010). México, D.F.
- Soria-Campos D., A. L. López-Escamilla y L. P. Olguín-Santos. 2013. Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. En: Pulido-Flores G. y S. Monks (Eds.). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y Zonas aledañas, Volumen II. Zea E- Books. University of Nebraska. 120-128 pp.
- Soto C. C. D. 2013. Evaluación de la regeneración *in vitro* de brotes de *Echinocactus grusonii* (Cactaceae) utilizando medio líquido. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 75 pp.
- Stuppy W. y W. Nagl. 1992. Regeneration of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. España.
- Thorpe T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.
- Trejo C., C. Ramírez y R. Soltero. 2005. Micropropagación de cactáceas. En: XVI Semana de la Investigación Científica. Avances en la investigación Científica en el CUCBA.
- Vázquez-Sánchez, T. Terrazas y S. Arias. 2012. El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteeae (Cactaceae, Cactoideae). *Botanical Sciences* 90 (2): 97-108.
- Villaseñor J. 2004. Los géneros de las plantas vasculares de la flora mexicana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 105-135.
- Villavivencia E., A. Villegas, G. Arellano y J. Vargas. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44(2): 49-57.
- Vyskot B. y Z. Jára. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 59(3): 449-452.
- Wyka T., M. Hamerska y M. Wróblewska. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 27-32.
- Zamora M. H. C. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotii ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae) Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 45 pp.

ANEXO 1. Descripción botánica del género *Mammillaria* (Arias *et al.*, 2012)

Arbustivas. Raíces fibrosas o tuberosas. Tallos simples o ramificados. Tallos simples o ramificados en la base, en la parte media o en el ápice, ascendentes, procumbentes o péndulos, monomorfos, globosos, deprimido globosos o cilíndricos, no articulados, tuberculados, tubérculos en series espiraladas, cilíndricos, cónicos, piramidales o gibosos, sin surco longitudinal, en ocasiones con laticíferos, aréolas bipartidas, las apicales producen espinas, las axilares producen flores y frutos, espinas frecuentemente diferenciadas en radiales y centrales, escasas a numerosas, espinas radiales delgadas, centrales en menor número y más gruesas. Flores blancas, amarillas, rosadas o púrpura, solitarias, emergen alrededor de un círculo apical, campanuladas a infundibuliformes, diurnas; pericarpelo y tubo receptacular regularmente desnudos, tubo receptacular menor o de igual tamaño que el perianto, perianto actinomorfo, con tépalos escasos, angostos, extendidos, blancos, amarillos, rojos, rosados o púrpura, anillo nectarial pequeño, no limitado por la base de la primera serie de estambres; estambres escasos, cortos, insertos en a mitad o tercio superior del tubo, estilo delgado, estigma con lóbulos lineares. Frutos claviformes a globosos, rojos o verdes, carnosos a semisecos, desnudos, generalmente indehiscentes; semillas orbiculares, ovadas o ampliamente ovadas, testa negra a parda, microrrelieve presente o ausente.

ANEXO 2. Descripción botánica y clasificación taxonómica de *Mammillaria humboldtii* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Guzmán *et al.*, 2007)

Planta de tallo simple o cespitoso en la base, globoso-aplanado hasta algo columnar, de color verde claro, alcanzan 7 cm de altura y diámetro. Tubérculos dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, cilíndricos, con el ápice redondeado, de 12 mm de longitud y 2 a 3 mm de anchura en la base, de color verde claro, con jugo acuoso. Axilas con lana blanca y con 7 u 8 cerdas blancas, de diferentes tamaños. Aréolas circulares o ligeramente ovales, al principio con lana. Espinas radiales 80 o más, dispuestas en varias series de diferentes longitudes, de unos 2 a 8 mm, muy delgadamente aciculares, rectas, horizontales, semiflexibles, níveas, con la extremidad basal ligeramente amarillenta. Espinas centrales ausentes. Flores de 25 mm de largo y 15 mm de diámetro; segmentos interiores del perianto lineares, obtusos, de color rojo brillante, con el margen de color rosa claro; filamentos rojos, anteras anaranjadas; estilo amarillo, lóbulos del estigma 3, verdes. Fruto claviforme, rojizo; perianto seco no persiste. Semillas obovadas, con hilo basal; testa foveolada, negra y brillante.

| | |
|--------------------|---|
| Clase | Equisetopsida C. Agardh |
| Subclase | Magnoliidae Novák ex Takht. |
| Super orden | Caryophyllanae Takht. |
| Orden | Caryophyllales Juss. ex Bercht. & J. Presl |
| Familia | Cactaceae Juss |
| Género | <i>Mammillaria</i> Haw. |
| Especie | <i>Mammillaria humboldtii</i> Ehrenb., 1842 |
| Sinónimos | <i>Cactus humboldtii</i> (C. Ehrenb.) Kuntze, 1891; <i>Ebnerella humboldtii</i> (Ehr.) Buxbaum, 1951; <i>Chilita humboldtii</i> (Ehr.) Buxb., 1959 y <i>Escobariopsis humboldtii</i> (C. Ehrenb.) Doweld, 2000 |