



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CULTIVO *IN VITRO*, COMO ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE
ASTROPHYTUM CAPUT-MEDUSAE Y DE *MAMMILLARIA LUETHYI*
(CACTACEAE), ESPECIES AMENAZADAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALEJANDRO ADONIS CAMARGO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx.

MAYO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CULTIVO *IN VITRO*, COMO ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN DE
ASTROPHYTUM CAPUT-MEDUSAE Y DE *MAMMILLARIA LUETHYI*
(CACTACEAE), ESPECIES AMENAZADAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALEJANDRO ADONIS CAMARGO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx.

MAYO, 2017

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de febrero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CAMARGO SÁNCHEZ ALEJANDRO ADONIS** con número de cuenta **306155303** con la tesis titulada "**Cultivo in vitro, como estrategia de conservación de *Astrophytum caput-medusae* y de *Mammillaria luethyi* (Cactaceae), especies amenazadas**", realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA**:

Presidente: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER
Vocal: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Secretario: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
Suplente: M. EN C. OCTAVIO GONZÁLEZ CABALLERO
Suplente: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de abril de 2017.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo y oportunidad de convertirme en un mejor profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada, que me permitió continuar mi formación académica, impulsar mi desarrollo profesional y embarcarme en esta investigación.

Al Dr. Victor Manuel Chávez Ávila por su comprensión, apoyo, guía y por impulsar mi desarrollo profesional y académico.

A mi comité tutor: Dra. María del Pilar Ortega Larrocea y al Dr. Ángel Salvador Arias Montes por su infinita paciencia, atinadas correcciones, por su guía y consejos para mejorar este proyecto y mejorar mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme las puertas y permitirme desarrollarme con un ambiente profesional y con valores.

Al jurado asignado para el exámen de grado, Dr. Robert Arthur Bye Boettler, Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dra. María del Pilar Ortega Larrocea, Dr. Ángel Salvador Arias Montes y M. en C. Octavio González Caballero por brindarme su apoyo en la revisión de este manuscrito, por sus valiosas aportaciones y observaciones certeras.

A la coordinadora del Posgrado en Ciencias Biológicas, Dra. María del Coro Arizmendi y el Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes por las atenciones prestadas y apoyo durante los trámites en este Posgrado.

A la oficina de Posgrado de Ciencias Biológicas del Instituto de Biología, Dr. José Martín García Varela y Rocío González Acosta por su sencillez, amabilidad, disposición y apoyo a lo largo de mi estancia.

Al Jardín Botánico IB-UNAM, por ofrecerme todas las facilidades para desarrollar este proyecto.

Al Dr. Victor Manuel Chávez Ávila, por tener una gran disposición, por su sencillez, apoyo, por su amistad, por todos esos valores que siempre demuestra, por su

honestidad y paciencia, pero sobretodo por siempre impulsar mí desarrollo profesional y formarme académicamente. Simplemente por todo, gracias.

A mi comité tutor, Dra. María del Pilar Ortega Larrocea y Dr. Ángel Salvador Arias Montes, por su calidez, disposición, por ser siempre certeros en sus comentarios y enriquecerme académica y profesionalmente.

A mis Padres, pilar de todo lo que soy, lo que conozco. A mi madre por siempre estar cuando la necesito, por su gran amor y la pasión con la que se desenvuelve. A mi Padre por su infinita paciencia, por su guía y por siempre estar a mi lado. Los amo.

A mi hermano, compañero ideal en este viaje que es la vida. Gracias por tu apoyo y las sonrisas de cada día. Eres invaluable.

A Abigail Martínez, que llego a mi vida cuando no lo esperaba, por tenerme infinita paciencia, demostrarme su amor, por estar a mi lado hoy y siempre. Te Amo.

A mis grandes amigos, Raul, Ángeles, Aldo, Oscar, Sarahí, Sandy, Laura, Armando, Mari. No concibo mi vida sin ustedes y lo daría todo también por apoyarlos, agradezco a la vida por ponerlos en mi camino. Larga vida.

A mis amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Pau, Hector, Fatima, Silvia, Wendy, Ale, Fer y Oscar, por su apoyo, por su entrega y sus valores.

A Octavio González, por su amistad, por su apoyo, su guía y por siempre estar dispuesto a ayudarme.

A Ángel por su amistad, por lo que hemos pasado y por su apoyo para terminar este proyecto.

*A mis padres y maestros, que confiaron en
mi, me apoyaron y formaron con todo su
corazón. Mil gracias.*

*Y una vez que la tormenta termine, no recordarás
como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás
seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero
una cosa es segura, cuando salgas de esa tormenta no
serás la misma persona que entró en ella. De eso se
trata esta tormenta.*

Haruki Murakami

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Tabla..... | 1 |
| Figura | 2 |
| Gráficas..... | 5 |
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| ANTECEDENTES | 13 |
| Biodiversidad..... | 13 |
| Biodiversidad en México..... | 14 |
| Familia Cactaceae..... | 15 |
| Estrategias de conservación | 18 |
| Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 20 |
| Etapas de la micropropagación | 22 |
| Cultivo de Tejidos en Cactáceas..... | 23 |
| <i>Mammillaria luethyi</i> G.S. Hinton..... | 31 |
| <i>Astrophytum caput-medusae</i> D.R. Hunt | 33 |
| JUSTIFICACIÓN | 35 |
| OBJETIVOS | 36 |
| OBJETIVO GENERAL: | 36 |
| OBJETIVOS PARTICULARES: | 36 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| Material biológico | 37 |
| <i>In vitro</i> | 37 |
| Condiciones de cultivo | 39 |
| <i>Ex vitro</i> | 40 |
| Desinfección de plantas..... | 40 |
| Condiciones de incubación..... | 42 |
| Evaluación del material vegetal..... | 42 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 45 |
| <i>Mammillaria luethyi</i>..... | 45 |
| Plántulas de origen <i>in vitro</i> | 45 |
| Formación de callo | 48 |
| Respuestas morfogénicas..... | 51 |
| Supervivencia y oxidación | 56 |

| | |
|---|------------|
| Plantas <i>ex vitro</i> | 60 |
| Establecimiento aséptico | 60 |
| Ensayos a baja concentración de RCV | 64 |
| Formación de callo..... | 64 |
| Respuestas morfogénicas | 65 |
| Oxidación y supervivencia..... | 69 |
| Ensayos a alta concentración de RCV | 69 |
| Formación de callo..... | 69 |
| Respuestas morfogénicas | 73 |
| Oxidación y supervivencia..... | 79 |
| Otros ensayos..... | 81 |
| <i>Astrophytum caput-medusae</i> | 85 |
| Cultivos de origen <i>in vitro</i> | 85 |
| Supervivencia y oxidación | 86 |
| Plantas <i>ex vitro</i> | 86 |
| Establecimiento aséptico | 86 |
| Ensayos a baja concentración de RCV | 89 |
| Formación de callo..... | 89 |
| Oxidación y supervivencia..... | 92 |
| Ensayos a alta concentración de RCV | 96 |
| Formación de callo..... | 96 |
| Respuestas morfogénicas | 100 |
| Oxidación y supervivencia..... | 104 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 107 |
| PERSPECTIVAS | 110 |
| CONCLUSIONES | 111 |
| <i>Mammillaria luethyi</i> | 111 |
| <i>Astrophytum caput-medusae</i> | 112 |
| LITERATURA CITADA | 115 |

| Tabla | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Situación de México respecto a otros países megadiversos (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008)..... | 12 |
| Tabla 2. Diversidad de cactáceas en 34 países de América (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006..... | 15 |
| Tabla 3. Propagación de diversas especies vegetales por Cultivo de Tejidos..... | 19 |
| Tabla 4. Efecto de los agentes esterilizantes en la desinfección y oxidación de los tejidos..... | 22 |
| Tabla 5. Cultivo de Tejidos Vegetales en la familia Cactaceae..... | 23 |
| Tabla 6. Efecto de Reguladores de Crecimiento Vegetal en cactáceas..... | 27 |
| Tabla 7. Concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal para plántulas <i>in vitro</i> | 35 |
| Tabla 8. Ensayos para la desinfección de plantas ex vitro..... | 39 |
| Tabla 9. Reguladores de crecimiento vegetal durante la reducción del volumen de la atmósfera..... | 41 |
| Tabla 10. Condición de oxidación en los diferentes tipos de explante..... | 57 |
| Tabla 11. Grado de oxidación en los explantes durante la reducción del volumen de la atmósfera..... | 77 |
| Tabla 12. Grado de oxidación en explantes de <i>A. caput-medusae</i> al reducir el volumen de la atmósfera..... | 103 |

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| Figura 1. | Mammillaria luethyi. A) Floración. B) Ejemplar en injerto. C) Fruto y semillas.D) Ejemplar en su hábitat..... | 30 |
| Figura 2. | Astrophytum caput-medusae. A-B) Flor. C) Ejemplar en injerto. D) Individuo en su hábitat. | 32 |
| Figura 3. | Plántulas in vitro de Mammillaria luethyi A, B, C, D: (Gracidias et al. 2010) y de Astrophytum caput-medusae E, F (Hernández 2012)..... | 36 |
| Figura 4. | Tipos de explantes generados a partir de plántulas in vitro de Mammillaria luethyi..... | 37 |
| Figura 5. | Organismos adultos en injerto de M. luethyi (izquierda) y de A. caput-medusae (derecha)..... | 38 |
| Figura 6. | Disección de las plantas madre, A) M. luethyi, con cortes en forma de disco B) A. caput-medusae con disección del tallo y de distintas fracciones de tubérculos..... | 39 |
| Figura 7. | Diagrama de los principales procedimientos para el cultivo in vitro de Mammillaria luethyi y Astrophytum caput-medusae..... | 42 |
| Figura 8. | Explantos seleccionados de M. luethyi con características de tamaño similares. A) Plántula con ausencia de tubérculos en la base del tallo; B) Pigmentación rojiza en el tallo y extendiéndose a tubérculos..... | 44 |
| Figura 9. | Plantulas in vitro de Mammillaria luethyi después de un mes de inducción A-B) los explantes laterales se curvaron de manera concava. C-D) cambio de coloración de las raíces en explantes de raíz..... | 45 |
| Figura 10. | Presencia de callo en explantes de M. luethyi a un mes de inducción. A) explante apical, B, C) explantes de raíz; D) explante lateral..... | 47 |
| Figura 11. | Morfogénesis de raíz después de 6 meses de cultivo para explantes apicales de M. luethyi..... | 50 |
| Figura 12. | Desarrollo de raíces durante el ensayo en puentes de papel después de un mes de la inducción. A) Explante lateral que continuó con el desarrollo de la raíz, B) Organogénesis de raíz en tubérculo aislado..... | 50 |
| Figura 13. | Brotos vía directa en explantes de M. luethyi a los 3 meses de la inducción. A, B) en explantes apicales; C, D) en explantes laterales..... | 52 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 14. | Condición de oxidación letal para explantes de <i>M. luethyi</i> . La oxidación se presentó: como un cambio de coloración del explante (A), exudación de compuestos fenólicos..... | 56 |
| Figura 15. | Proceso de establecimiento aséptico. A) Planta madre en una solución de cloro. B-C) Contaminación de explantes por hongos. D) Nuevos eventos de desinfección de plantas contaminadas..... | 60 |
| Figura 16. | Coloración y tipo de callo generado a partir de plantas de invernadero de <i>Mammillaria luethyi</i> establecidas in vitro..... | 63 |
| Figura 17. | Secuencia en la morfogénesis indirecta en <i>M. luethyi</i> . A-B) Formación de nódulos o meristemoides, con una coloración más intensa. C-D) Brote incipiente. | 66 |
| Figura 18. | Respuestas in vitro durante el cultivo de <i>M. luethyi</i> . A-B) Hidratación de las células del parénquima (5 días de inducción). C-F) Ruptura de los tubérculos previo a la formación de callo (8 días de inducción)..... | 68 |
| Figura 19. | Formación de callo friable, con coloración intensa en explantes de <i>M. luethyi</i> cultivados en tubos de ensayo..... | 71 |
| Figura 20. | Formación de brotes en <i>M. luethyi</i> ; de manera directa (D) y de manera indirecta (I)..... | 74 |
| Figura 21. | Formación de raíces en medio con 1.0 mg/L de ANA y 5.0 mg/L de Kin en <i>M. luethyi</i> durante su cultivo en tubos de ensayo. A) Después de 7 meses de cultivo, B) después de 9 meses de cultivo..... | 75 |
| Figura 22. | Desarrollo de botones florares a partir de explantes de tallo en <i>M. luethyi</i> | 76 |
| Figura 23. | Oxidación en explantes de <i>M. luethyi</i> durante su cultivo en tubos de ensayo. A-B) Oxidación al inicio del cultivo, con un cambio de coloración en la base del explante en contacto con el medio..... | 79 |
| Figura 24. | Planta madre injertada con eventos de floración..... | 80 |
| Figura 25. | Explantes de flor de <i>M. luethyi</i> cultivados en medio Litz. A-B) Secciones de tubérculos con proliferación de callo. A) Al inicio del cultivo, B) A dos meses de cultivo. C-D) Ovario aislado, con presencia de óvulos..... | 81 |
| Figura 26. | Mejora de la condición del explante de <i>Astrophytum caput-medusae</i> después del subcultivo a medio fresco. Izquierda: condición inicial; derecha: condición al primer subcultivo..... | 83 |
| Figura 27. | Ausencia de la respuesta regenerativa o de proliferación de uno de los frascos de <i>A. caput-medusae</i> derivado de la investigación de Hernández (2012). Izquierda: condición inicial; derecha: condición al primer subcultivo..... | 84 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Figura 28. | Establecimiento de explantes de <i>Astrophytum caput-medusae</i> . A) Comparación de una planta normal (izquierda) con una con signos de enfermedad (derecha)..... | 86 |
| Figura 29. | Principales respuestas obtenidas en <i>A. caput-medusae</i> cultivado a baja concentración de RCV. A-C) Curvatura de explantes en los primeros días de cultivo. D-I) Hinchamiento y ruptura de la epidermis por la hidratación de los tejidos. | 88 |
| Figura 30. | Explantes después de un mes de realizar un baño con antioxidantes (ácido cítrico/ácido ascórbico), en donde se observó que persistió la condición de oxidación..... | 92 |
| Figura 31. | Oxidación en explantes de <i>A. caput-medusae</i> cultivados en puentes de papel. A-C) Oscurecimiento de la parte apical de un tubérculo. C) Pérdida de coloración en parte apical de tubérculo..... | 93 |
| Figura 32. | Primeras respuestas en <i>A. caput-medusae</i> durante su cultivo en tubos de ensayo. A-D) Formación de estructuras circulares, de color café y apariencia de callo, no proliferativo..... | 94 |
| Figura 33. | Explante de tallo cultivado con 0.5mg/L de ANA y 3.5 mg/L de Kin en tubos de ensayo. Se observó que después de 6 meses de cultivo no se presentó crecimiento, formación de callo u organogénesis..... | 96 |
| Figura 34. | Formación de callo en explantes de tubérculos en <i>A. caput-medusae</i> . El tipo de callo observado es del tipo compacto, de coloración variable..... | 97 |
| Figura 35. | Formación de callo friable en tubérculos de <i>A. caput-medusae</i> . Se observa hidratado, de coloración variable, abundante, con origen de la zona de corte..... | 98 |
| Figura 36. | Formación de brotes de manera directa en explantes de tubérculo en <i>A. caput-medusae</i> . A-B) Tubérculos de aspecto globular, de baja proliferación y aspecto hidratado..... | 100 |
| Figura 37. | Formación de raíz a partir de tubérculos en <i>A. caput-medusae</i> . A-C) Proceso oxidativo y formación de raíz, con seguimiento cada 60 días. D) Formación derivado de ruptura de la epidermis después de cuatro meses de cultivo..... | 101 |
| Figura 38. | Etapas de oxidación en explantes de <i>A. caput-medusae</i> . A-B) Oxidación al inicio del cultivo, el explante inicial se oscurece totalmente, pero hay proliferación celular..... | 102 |

| Gráficas | Página |
|---|---------------|
| Gráfica 1. Proporción de explantes con respuesta a callo en los diferentes tratamientos..... | 46 |
| Gráfica 2. Tipos de explante y su respuesta a la formación de brotes..... | 51 |
| Gráfica 3. Proporción de explantes con respuesta a formación y tipo de callo formado en cada tratamiento..... | 69 |
| Gráfica 4. Número de brotes formados por activación de yemas o vía indirecta en cada tratamiento..... | 72 |
| Gráfica 5. Cantidad de explantes de <i>A. caput-medusae</i> que respondieron a la formación de callo durante la reducción del volumen de la atmósfera.... | 95 |

RESUMEN

Mammillaria luethyi y *Astrophytum caput-medusae* son dos cactáceas endémicas de nuestro país, de reciente descubrimiento, con escasas poblaciones, crecimiento lento, de distribución restringida y poca información sobre su biología. Su peculiar morfología ha provocado que sean demandadas por coleccionistas y aficionados como plantas ornamentales, por lo que no es raro que se comercien ilegalmente; esto aunado a la degradación de su hábitat las ha colocado en situación de riesgo de extinción. *M. luethyi* se localiza al norte del estado de Coahuila, se considera como vulnerable de acuerdo a las listas del 2013 de la UICN y se encuentra en el apéndice II de la CITES. *A. caput-medusae* crece en el estado de Nuevo León, se encuentra en peligro de acuerdo a las listas de la NOM-059 y en peligro crítico de acuerdo a las listas del 2013 de la UICN. El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una herramienta útil para propagar especies con alguna situación de riesgo, ha sido reportada para diversas especies de la familia Cactaceae. Existen antecedentes de la propagación a través del cultivo de tejidos para *M. luethyi* y *A. caput-medusae*; sin embargo, se han encontrado barreras que impiden una propagación eficiente, por lo que en el presente estudio se planteó trabajar con las limitantes que hay en la propagación *in vitro* de ambas especies. Se exploraron cuatro diferentes métodos de desinfección a partir de plantas adultas procedentes de invernadero, se incorporó al protocolo de desinfección para evaluar la eficiencia del agente desinfectante Soluvet®, utilizado en procedimientos quirúrgicos con alto nivel de desinfección y poco daño a los tejidos. La etapa de multiplicación se realizó con plántulas *in vitro* de investigaciones previas para ambas especies, así como de los explantes establecidos a partir de plantas adultas. Los explantes se cultivaron en medio MS al 50% de sus componentes inorgánicos con combinaciones de ANA (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), 2,4-D (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), BAP (0.0, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 5 mg/L) y Kin (0.0, 3.0, 3.5 y 5.0 mg/L). Para superar las diferentes etapas de oxidación se aplicaron diferentes estrategias, que incluyeron la adición de antioxidantes, adsorbentes, la aplicación de pulsos hormonales, cultivo en medio líquido con puentes de papel y la reducción del volumen de la atmósfera. En *M. luethyi* se presentaron respuestas de

organogénesis vía activación areolar y organogénesis indirecta, la combinación que presentó mejor respuesta fue de 0.5 mg/L de auxinas con 3.5 mg/L de citocininas y se generaron al final del estudio 168 brotes. Así también se observó la formación de botones florales a partir de la zona axilar de tubérculos, lo cual no ha sido reportado para la familia. En el caso de *A. caput-medusae* se presentó la formación de tres brotes, todos bajo distintos medios de inducción y de estos, dos mostraron un aspecto hidratado. Para ambas especies la mejor condición para reducir la oxidación fue la reducción del volumen de la atmósfera en un 75%, mientras que la incorporación de Soluvet demostró ser un agente desinfectante con potencial para reducir el daño a los tejidos durante el establecimiento *in vitro*.

ABSTRACT

Mammillaria luethyi and *Astrophytum caput-medusae* are two endemic cacti of Mexico that have only recently been discovered. Both are slow-growing species with few populations and restricted distribution. Availability of relevant biological data is scarce. Their peculiar morphology has caused them to be sought after by amateur and professional cactus collectors as ornamental plants and illegal trade is not uncommon; this coupled with the degradation of their habitat has placed them at risk of extinction. *M. luethyi* occurs in northern Coahuila, is classified as vulnerable by the 2013 IUCN Red List and included in Appendix II of CITES. *A. caput-medusae* grows in the state of Nuevo León, is listed as endangered according to NOM-059-2010-SEMARNAT and as critically endangered by the 2013 IUCN Red List. Plant tissue culture has proven to be a powerful tool for effective propagation of endangered species and has been successfully applied to the Cactaceae family in several occasions. Although there are studies that address the *in vitro* culture of *M. luethyi* and *A. caput-medusae*, an efficient propagation protocol does not exist. Thus, the objective of the present study was to elucidate the limiting factors of the *in vitro* culture of these species. Four different surface disinfection methods were tried on explants taken from adult greenhouse-grown plants, including the new sterilizing agent Soluvet® which is used in surgical procedures in order to guarantee high-level disinfection while avoiding tissue damage. Plantlets obtained from previous experiments, as well as explants derived from adult plants were used in the multiplication stage. Explants were placed in MS medium containing 50% of inorganic salts and combinations of NAA (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), 2,4-D (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), BA (0.0, 0.1, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5 y 5 mg/L) and Kin (0.0, 3.0, 3.5 y 5.0 mg/L). In order to reduce oxidative stress, different strategies were applied, including the addition of antioxidants, and adsorbents, the application of hormonal pulses, the use of liquid media culture with paper bridges and the reduction of the atmosphere volume. Morphogenetic responses caused by areole activation and *de novo* were observed in *M. luethyi*, showing the highest shoot formation at 0.5 mg/L of auxins and 3.5 mg/L of cytokinins. At the end of the study, 168 new shoots had been obtained. Notably, flower buds developed on the axillary area of tubers of this

species, an observation which had not been reported previously for the family. *A. caput-medusae* presented the formation of three shoots – two of which showed a hydrated aspect – in different induction media. In the case of both species, oxidative stress was most efficiently controlled through the reduction of the atmosphere volume by 75%. Furthermore, Soluvet® proved to be a suitable disinfectant for avoiding tissue damage during surface sterilization at the beginning of the establishment stage.

INTRODUCCIÓN

Es paradójico que mientras la población de la especie humana se ha multiplicado en más del 500% en el último siglo y se prevé un aumento en el futuro, el resto de las especies en el planeta se extinguen a una velocidad nunca antes vista (Alanís *et al.*, 2004). En los últimos 100 años, el número de especies en riesgo de extinción ha incrementado en más de 1000 veces más rápido que en otras extinciones en la historia de la Tierra (Collen *et al.*, 2013).

La conservación de nuestro planeta y su menguante biodiversidad es de central importancia para el bienestar humano (Heydinger, 2012). La actual preocupación por la conservación de las especies se basa en la comprensión de la singularidad de cada una, la imposibilidad de remplazarlas, las funciones ecológicas que desempeñan, los usos económicos actuales de muchas de éstas y además los usos potenciales de especies poco conocidas (Alanís *et al.*, 2004).

No obstante, durante el XVI Congreso Internacional de Botánica en St. Luis, Missouri, USA., más de 5000 botánicos de todas partes del mundo reconocieron que hasta dos tercios de las especies de plantas se encuentran ya amenazadas en su ambiente (Vovides *et al.*, 2010). Uno de los grupos que se encuentra gravemente amenazado es la familia Cactaceae, que comprende más de 1 900 especies, la mayoría nativas de regiones áridas o semiáridas. Se distribuyen casi exclusivamente en el continente americano desde el sur de Canadá hasta la Patagonia en Argentina (Arias *et al.*, 2012). Presentan múltiples cualidades de adaptación, variados medios de propagación e importancia ecológica como fuente de alimento para diversas especies y retenedoras de suelo (Uhlrig, 2008).

Si bien las cactáceas se distribuyen en todo el continente, México en particular representa el mayor centro de diversidad para la familia con 660 especies (Ortega-Baés y Godínez-Álvarez, 2006). A su vez también posee un alto grado de endemismo tanto genérico (73%) como específico (78%) (Hernández y Godínez, 1994). A pesar del gran potencial de México por la cantidad de especies de cactáceas que se pueden aprovechar, muchas de ellas están severamente amenazadas (NOM-059-ECOL-2010); asimismo es el país con más especies en peligro de esta familia (197), que representa el 35% del total de especies para el país (Anderson *et al.*, 1994; Gómez y Sánchez, 2007).

El hecho de que la familia Cactaceae se encuentre amenazada en nuestro país no es una casualidad, ya que México es uno de los países más transformados del mundo; su tasa de deforestación es una de las cinco más grandes mundialmente, lo cual lo coloca en una situación crítica y en la necesidad urgente de buscar medidas para proteger el patrimonio biótico de los mexicanos (Vovides *et al.*, 2010).

Por otra parte, el número de especies en riesgo de esta familia es debido a la combinación de características biológicas y ecológicas que las hacen vulnerables a eventos de perturbación, además de que existen grandes lagunas en el conocimiento, como ciclos de vida, interacciones bióticas y abióticas, así como la

capacidad de regeneración natural entre otros factores (Hernández y Godínez, 1994; Alanís *et al.*, 2004).

Hay que agregar que las características morfológicas que poseen las cactáceas como la succulencia de los tejidos, reducción de la superficie transpiratoria, variadas formas de vida, entre otras les han permitido adaptarse a condiciones extremas, aunado a su belleza ornamental, son razones por las que son altamente codiciadas. No es raro ver que la afición de muchos coleccionistas por adquirir plantas exóticas represente una presión para las poblaciones silvestres (Becerra, 2000). La problemática se agudiza cuando se descubre una nueva especie, pues los coleccionistas sin escrúpulos llegan a pagar grandes sumas de dinero por plantas procedentes de mercados ilegales (Hernández, 2007; Martorell, 2013). Esta situación se representa en *Mammillaria luethyi*, redescubierta en 1996 y de *Astrophytum caput-medusae*, descrita en el 2002.

Mammillaria luethyi se considera una ornamental por su belleza y ampliamente cotizada por su inusual morfología. En el año en que fue descubierta alcanzó la exorbitante cantidad de 1000 dólares por organismo. Actualmente la normatividad mexicana no la considera en ninguna categoría de riesgo; sin embargo, el libro rojo de la IUCN la cita como vulnerable. Su restringida distribución aunada a su biología compromete la supervivencia de esta especie (Gómez, 2010). Por otra parte, *Astrophytum caput-medusae* es una especie de reciente descubrimiento y una de las especies más raras encontradas hasta ahora en México. Es víctima de saqueo de sus poblaciones, no hay información suficiente sobre su biología, por lo que esta especie está en severo riesgo de desaparecer (Gómez, 2010). Se considera en peligro de acuerdo a la NOM-059-2010-SEMARNAT y en peligro crítico por el libro rojo de la IUCN.

Una acción deseable para salvaguardar las especies mexicanas de cactáceas es mejorar o desarrollar nuevos y eficientes métodos de propagación, por lo que en años recientes el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) ha sido una útil herramienta biotecnológica en el estudio, la propagación, conservación y planteamiento de alternativas para el aprovechamiento sostenible de especies amenazadas (Fay, 1994; Pérez *et al.*, 1998). Además, el cultivo *in vitro* permite la obtención de material vegetal para otras áreas de investigación, además de la conservación. Los protocolos eficientes para la propagación de especies amenazadas pueden suplir la cantidad de material necesaria para especies con un valor medicinal, ornamental o alimenticio (Sarasan *et al.*, 2006).

Sin embargo, para especies de reciente descubrimiento o poco estudiadas existen contratiempos durante su propagación por cultivo de tejidos, como el establecimiento aséptico, altos porcentajes de oxidación o falta de respuestas morfogenéticas; por lo que es importante llevar a cabo estudios que permitan determinar las condiciones para el buen crecimiento, desarrollo y regeneración. En *Mammillaria luethyi* se han hecho estudios por Escobedo *et al.* (2004) y Gracidas *et al.* (2010), y para *A. caput-medusae* se encuentra la investigación de Hernández (2012). Estos estudios encontraron problemáticas en el establecimiento aséptico y control de la oxidación durante su cultivo *in vitro*, por lo que la presente

investigación se enfocó en buscar alternativas para superar las barreras que impiden una propagación eficiente para ambas especies, así como contrastar la respuesta de los anteriores estudios en una fuente distinta de explantes.

ANTECEDENTES

Biodiversidad

En la actualidad se define a la biodiversidad como toda variación que hay en los distintos niveles de organización: desde los genes de una población local o especie, después las especies que componen toda o una parte de una comunidad local y finalmente en las comunidades que comprenden los ecosistemas, denominados biomas; sin embargo, la terminología también hace referencia a la abundancia relativa de estos parámetros (Núñez *et al.*, 2003; Nelson y Carter, 2012; Kareiva *et al.*, 2011).

La biodiversidad comprende una gama de características que son importantes para un correcto funcionamiento de los ecosistemas y con ello permitir que evolucionen; estas incluyen la riqueza de especies, diversidad ecológica, diversidad genética, diversidad filogenética y la diversidad funcional. Sin embargo, la unidad natural en la conservación de la biodiversidad es a nivel de especie (Collen *et al.*, 2013).

En los últimos 3.7 billones de años, billones de poblaciones y millones de especies han evolucionado en un mundo dinámico, generando un sinnúmero de formas de vida. Se cree que en la época actual la cantidad de especies que conviven espacio-temporalmente es la más grande en la historia de la Tierra (Ceballos *et al.*, 2010).

Esto provoca que, a pesar de los más de 300 años de trabajo sistemático para conocer la biodiversidad en el planeta, los científicos hayan descubierto tan solo una fracción de las especies existentes. Se han descrito alrededor de 1 740 000 especies en el mundo (Martínez-Meyer *et al.*, 2014), y cada año se agregan a la lista entre 10 000 a 15 000 más de las cuales la mayoría son plantas e insectos (SEMARNAT, 2011; May, 2011). Del total de especies conocidas aproximadamente la mitad corresponde a insectos y cerca de un 16% a plantas (SEMARNAT, 2011).

Desafortunadamente el limitado muestreo que tenemos sobre la biodiversidad mundial nos impide saber con certeza el número de especies con las que convivimos (Mora *et al.*, 2011). Algunas estimaciones de la riqueza total refieren desde 7 hasta los 100 millones (Martínez-Meyer *et al.*, 2014), otros autores sugieren una cifra más conservadora que oscila entre 5 y 30 millones de especies (SEMARNAT, 2011). Mora *et al.*, 2011 analizaron el número de especies actualmente descritas y realizaron un consenso de las homonimias para diversos taxones, con lo que se estimó, mediante un modelo matemático que el total de especies terrestres por descubrir es de aproximadamente 8.5 millones.

Esta variedad de organismos está distribuida heterogéneamente a lo largo de la Tierra; sin embargo, podemos encontrar patrones de riqueza y diversidad, que están determinados por diversos factores geográfico-ambientales como: la altitud, latitud, precipitación, temperatura, entre otros (Gaston, 2000; SEMARNAT, 2011).

Entre las casi 200 naciones del mundo, existe un grupo de países que poseen una biodiversidad excepcional, por lo que se les denomina megadiversos. En este grupo se encuentran Brasil, Estados Unidos, China, Indonesia México, India, Malasia, Papúa Nueva Guinea, Sudáfrica, Filipinas, Venezuela Australia, Madagascar, Congo entre otros (SEMARNAT, 2011).

Biodiversidad en México

En virtud de su ubicación geográfica y heterogénea topografía, el territorio de la República Mexicana ofrece una inusitada variedad de ambientes naturales. Su accidentado relieve determina que más de la mitad de su superficie se ubique en áreas superiores a los 1000 msnm, con climas diversos y variables (Vovides *et al.*, 2010). Aunado a esto, la convergencia de la región Neártica y Neotropical tiene como resultado una alta riqueza de especies (Ramamoorthy *et al.*, 1993).

De las 1 740 000 especies descritas en el mundo (Martínez-Meyer *et al.*, 2014), se estima que México posee alrededor de 94 412 especies (Tabla 1) (Martínez-Meyer *et al.*, 2014). México con una extensión de 1 972 544 km² (1.5% del total de la superficie terrestre) ocupa el lugar catorce en los países con mayor extensión, pero se encuentra en la tercera posición de los países con mayor diversidad (Ramamoorthy *et al.*, 1993; SEMARNAT, 2011). Del total de especies que se conocen en México, alrededor de 23 314 especies corresponden a plantas vasculares, y de estas el 50% son endémicas del país (Villaseñor, 2016).

Tabla 1. Situación de México respecto a otros países megadiversos (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008).

| Continente | País | Superficie (Km ²) | Plantas vasculares (N ^o especies) | Mamíferos (N ^o especies) | Aves (N ^o especies) | Reptiles (N ^o especies) | Anfibios (N ^o especies) |
|------------|------------|-------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| América | México | 1 972 544 | 23 424 | 535 | 1 107 | 804 | 361 |
| | Perú | 1 285 210 | 17 144 | 441 | 1 781 | 298 | 420 |
| | Brasil | 8 511 965 | 56 215 | 578 | 1 712 | 630 | 779 |
| | Colombia | 1 141 748 | 48 000 | 456 | 1 815 | 520 | 634 |
| | Ecuador | 283 561 | 21 000 | 271 | 1 559 | 374 | 462 |
| | Venezuela | 912 050 | 21 073 | 353 | 1 392 | 293 | 315 |
| África | Congo | 2 344 000 | 6 000 | 166 | 597 | 268 | 216 |
| | Madagascar | 587 045 | 9 505 | 165 | 262 | 300 | 234 |
| Asia | Indonesia | 1 916 600 | 29 375 | 667 | 1 604 | 511 | 300 |
| | China | 9 561 000 | 32 200 | 502 | 1 221 | 387 | 334 |
| Oceanía | Australia | 7 686 810 | 15 638 | 376 | 851 | 880 | 224 |

Particularmente en el grupo vegetal, México ocupa el cuarto lugar mundial en riqueza de especies (Villaseñor, 2016), de las cuales alrededor de 20 841 son angiospermas, repartidas en 2 826 géneros y 303 familias (Villaseñor y Ortiz, 2014). Nuestro país es centro de origen de especies cultivadas como los amarantos y

quelites, los chiles, las calabazas, los chayotes, los algodones, xoconostles, aguacate, tomate, cempasúchil, vainilla, maíz y frijol (CONABIO, 2012).

Las familias Asteraceae, Leguminosae, Orchidaceae, Gramineae y Cactaceae resaltan por su alta diversidad en nuestro país (Randell, 2008). De éstas, la familia Cactaceae posee una importancia biológica, ecológica, cultural y económica destacable para nuestro país.

Familia Cactaceae

La familia Cactaceae comprende alrededor de 1800 especies, que se distribuyen en el continente americano desde el sur de Canadá hasta la Patagonia en Argentina (Boyle, 2007; Uhlig, 2008).

La característica distintiva de la familia es la presencia de aréolas, que son zonas meristemáticas que dan origen a tallos, flores, espinas o tricomas. Por otra parte, poseen la capacidad de almacenar y conservar el agua en sus tejidos gracias al gran desarrollo del parénquima (responsables de la succulencia); presentan reducción de la superficie transpiratoria debido a la atrofia del limbo de las hojas o su transformación en escamas, espinas y glóquidas; engrosamiento de la cutícula; pruinosis o excrecencias cerosas de las células epidérmicas y disminución o disposición hundida de los estomas (Bravo-Hollis, 1978; Arakaki *et al.*, 2011).

Tanto las espinas como los tricomas cumplen con la función de protección contra la radiación solar, además de que en periodos de alta humedad relativa estas estructuras pueden condensar el agua para ser arrastrada hacia las raíces (León de la luz y Valiente-Banuet, 1994).

Las cactáceas presentan adaptaciones fisiológicas, como el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés). El metabolismo CAM implica que los estomas se abran durante la noche, cuando la humedad relativa es mayor y la transpiración es menor. Así, el dióxido de carbono es asimilado por la noche y almacenado en forma de ácidos orgánicos, los cuales son descarboxilados durante el día, cuando se incorpora a la fotosíntesis (Rivas-Rossi, 1996).

Las cactáceas se consideran al mismo tiempo como elementos importantes en la estructura y dinámica de las comunidades de las zonas áridas y semiáridas, particularmente en procesos para mitigar la erosión y desertificación; así también forman parte de las llamadas "islas de fertilidad" en donde cactáceas columnares brindan refugio y alimento a diversas especies de mamíferos y reptiles. En consecuencia, su desaparición conlleva a un proceso de empobrecimiento biológico y a la pérdida de recursos útiles para las poblaciones donde se encuentran, tanto del punto de vista ecológico como antropológico (Jiménez, 2011; Lebgue-Keleng *et al.*, 2014).

Actualmente, gracias al avance realizado en las técnicas moleculares y con la ayuda de modelos matemáticos se sugiere que las cactáceas se originaron hace

aproximadamente 35 millones de años (Arakaki *et al.*, 2011) y se estima que México es uno de los centros de diversidad dado su alto número de endemismos (Hernández *et al.*, 2004; Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006).

De 34 países analizados con presencia de cactáceas, México y Canadá poseen la mayor y menor riqueza, respectivamente (Tabla 2). A nivel de endemismos, México lidera la lista con 576 especies de las 660 (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006), distribuidos en las zonas áridas y semiáridas del país. El Desierto Chihuahuense es la zona que alberga una mayor diversidad de cactáceas en el mundo con 329 especies (Villavicencio *et al.*, 2010).

Desafortunadamente México figura a la vez como uno de los países con el mayor número de especies en peligro para esta familia (197), las cuales representan el 35% del total de especies amenazadas para el país (Anderson *et al.*, 1994; Gómez, 2007).

La problemática de la protección y conservación de las cactáceas es muy compleja. La mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida o son especies de reciente descubrimiento, por lo que se conoce muy poco acerca de su biología (Hernández-Oria *et al.*, 2007). A esto se agrega el hecho de que la mayoría presenta un lento crecimiento y tiene ciclos de vida muy largos. Vemos pues que sus características tanto biológicas como ecológicas hacen de las cactáceas un grupo altamente vulnerable (Becerra, 2000).

Además, México es uno de los países más transformados, hasta el año 2007, alrededor del 29% de la cubierta de vegetación natural original en México se había transformado (CONABIO, 2012). Por si fuera poco, México se enfrenta al subaprovechamiento y limitado desarrollo de los sectores productivos, lo cual ha implicado que se dé un manejo no sustentable de los recursos vegetales (CONABIO, 2012).

Un claro ejemplo se observa en la década de 1970, cuando el gobierno tuvo como objetivo realizar el desmonte de más de 400 000 hectáreas, para dar lugar al sector agrícola y ganadero en los estados de Jalisco, Veracruz, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Sinaloa, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Chiapas (Martínez-Meyer *et al.*, 2014). Esto implica que los ecosistemas mexicanos no han sido valorados por las políticas institucionales y gubernamentales para asegurar su mantenimiento a mediano y largo plazo (Balvanera y Cotler, 2009; Vovides *et al.*, 2010).

En cuanto al aprovechamiento de la familia Cactaceae, históricamente han sido objeto de diversos usos, entre los que se encuentran el consumo de los tallos y los frutos como alimento (*Cephalocereus columna-trajani*, *Pachycereus marginatus*), como medicina tradicional (*Pachycereus marginatus*), como forraje (*Escontria chiotilla*), para construcción, como herramientas para la caza y la pesca o cercas vivas (*Myrtillocactus geometrizans*), están asociadas directamente a la cultura de diversas poblaciones y además se prestan a una importante demanda comercial

como plantas ornamentales (Becerra, 2000; Casas, 2002; Castillo-Campohermoso, *et al.*, 2010).

| Tabla 2. Diversidad de cactáceas en 34 países de América (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006. | | | | |
|---|--------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Número de géneros | Géneros endémicos (%) | Número de especies | Especies endémicas (%) |
| Antillas menores | 9 | 0 | 18 | 1 (6) |
| Antillas Neerlandesas | 10 | 0 | 15 | 1 (7) |
| Argentina | 26 | 3 (12) | 258 | 158 (61) |
| Bahamas | 5 | 0 | 9 | 2 (22) |
| Belice | 6 | 0 | 10 | 0 |
| Bolivia | 30 | 4 (13) | 240 | 153 (64) |
| Brasil | 35 | 14 (40) | 237 | 176 (74) |
| Canadá | 2 | 0 | 3 | 0 |
| Chile | 13 | 1 (8) | 104 | 83 (80) |
| Colombia | 17 | 0 | 35 | 6 (17) |
| Costa Rica | 13 | 0 | 40 | 12 (30) |
| Cuba | 15 | 0 | 48 | 25 (25) |
| Ecuador | 18 | 2 (11) | 43 | 15 (35) |
| El Salvador | 9 | 0 | 11 | 1 (9) |
| Estados Unidos | 26 | 1 (4) | 202 | 86 (43) |
| Guatemala | 18 | 0 | 42 | 4 (10) |
| Guayana Francesa | 6 | 0 | 6 | 0 |
| Guyana | 8 | 0 | 9 | 0 |
| Haití | 12 | 0 | 23 | 5 (22) |
| Honduras | 16 | 0 | 30 | 2 (7) |
| Islas Caimán | 5 | 0 | 7 | 0 |
| Islas Vírgenes | 7 | 0 | 10 | 0 |
| Jamaica | 10 | 0 | 15 | 4 (27) |
| México | 46 | 14 (30) | 660 | 517 (78) |
| Nicaragua | 13 | 0 | 20 | 0 |
| Panamá | 10 | 0 | 22 | 1 (5) |
| Paraguay | 19 | 0 | 81 | 25 (31) |
| Perú | 33 | 6 (18) | 223 | 170 (76) |
| Puerto Rico | 10 | 0 | 18 | 5 (28) |
| República Dominicana | 11 | 0 | 27 | 3 (11) |
| Surinam | 7 | 0 | 9 | 0 |
| Trinidad & Tobago | 11 | 0 | 13 | 0 |
| Uruguay | 11 | 0 | 51 | 14 (27) |
| Venezuela | 16 | 0 | 39 | 6 (15) |

El caso de las cactáceas es además ilustrativo del tráfico ilegal en plantas. En el ámbito global, se ha documentado que este grupo de organismos representa un comercio de unos 7 a 8 millones de especímenes por año (Naranjo y Dirzo, 2009). El grado de amenaza en las diferentes especies es una situación particular, ya que a diferencia de otros organismos que se encuentran amenazados por la pérdida de hábitat, algunos miembros de la familia Cactaceae el tráfico de los organismos es la principal causa de extinción, como en *Ariocarpus bravoanus*, *Aztekium hintonii*, *Echinocereus ferrerianus*, *Geohintonia mexicana*, *Leuchtenbergia principis*, *Turbincarpus pseudopectinatus*. A principios de siglo XX comenzó a incrementar el comercio de cactáceas principalmente a Japón. La magnitud de la extracción de los organismos fue tan alarmante que México se vio en la necesidad de crear leyes que protegieran la exportación de los individuos silvestres (Sánchez y Cantú, 1999).

Sin embargo, la codicia y corrupción desafiaron a la normatividad mexicana y en repetidas ocasiones se registraron saqueos y decomisos en las zonas fronterizas. Por ejemplo, en 1978 se obtuvo un permiso ilegal para exportar un millón de plantas y en 1979 se exportaron de México a Estados Unidos 1 200 000 cactus. Años después en 1990 la Policía Judicial Federal decomisó un cargamento de más de 10 toneladas de cactáceas. Entre 1990 y 1991 la entonces SEDUE decomisó 700,000 ejemplares de cactáceas y expulsó del país a personas de distintas nacionalidades que fueron sorprendidas con grandes cargamentos de plantas (Sánchez y Cantú, 1999). En el periodo de los años 1996 al 2000, las autoridades mexicanas incautaron más de 8000 individuos. Para el 2004 tan sólo en el Aeropuerto de la Ciudad de México se aseguraron 240 cactáceas (Naranjo y Dirzo, 2009).

En el ámbito internacional, los líderes del comercio de cactáceas en orden de importancia son Estados Unidos, Reino Unido, Alemania y Suecia; México se localiza en la quinta posición, seguido por España, Italia y Canadá (Bárcenas, 2006). Sin embargo, para México la comercialización de cactáceas en el ámbito legal no ha sido un negocio rentable a causa de diversas situaciones como: desconocimiento de la riqueza vegetal que hay, falta de información sobre los métodos de propagación, inmensos trámites burocráticos, corrupción en los mismos y la competencia desleal por parte de comercializadores de plantas adquiridas ilegalmente (Bárcenas, 2006; Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010).

Estrategias de conservación

Se han desarrollado distintas estrategias para poder llevar a cabo la conservación de la biodiversidad, al respecto Shaid (2013) enmarca cuatro: conservación *in situ*, *ex situ*, reducción de la presión antropogénica y rehabilitación de las especies amenazadas. No obstante, son reconocidas como principales para conservar la biodiversidad vegetal la conservación *in situ*, como reservas de la naturaleza, Parques Nacionales, Reservas de la Biosfera y la conservación *ex situ* a través de colecciones como jardines botánicos, bancos de semillas o cultivos de tejidos.

En México existen 181 Áreas Naturales Protegidas (ANP), que cubren alrededor de 10% de la superficie terrestre del país; sin embargo, muchas de estas fueron elegidas por su belleza escénica o de forma oportunista, sin evaluación que dirigiera las prioridades (Larrain, 2011; Koleff y Urquiza-Haas, 2011; CONANP, 2013). Aunado a lo anterior, desde el momento en que se decretaron las ANP, se han enfrentado a diversas amenazas como procesos de deforestación, fragmentación, contaminación, invasión de especies exóticas, incendios, extracción ilegal de individuos, entre otros. La evaluación de la efectividad de las Áreas Protegidas refleja que entre 1993 y 2002, se perdió parte de la vegetación primaria y se incrementaron las superficies con pérdida de la riqueza biológica (Koleff y Urquiza-Haas, 2011).

Aunque lo más recomendable sería elaborar programas de conservación *in situ*, los planes de manejo para hacerlas sustentables distan de ser aplicados, por lo que para algunas especies la conservación *ex situ* es la única alternativa. Es por esto que los jardines botánicos y unidades de investigación complementan en gran medida las actividades de conservación (Fay, 1992; Sarasan *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2012). Los jardines botánicos de México mantienen aproximadamente 5 425 especies en sus colecciones vivas de la flora del país y en ellos se conserva alrededor del 53% del total de taxones endémicos o que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo (CONABIO, 2012).

Asimismo, México ha generado una Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal (CONABIO, 2012), en donde se busca solucionar de manera integral los problemas de la degradación de los ecosistemas, la pérdida de especies y la concientización de la sociedad para asegurar la conservación de los ambientes naturales.

Para abordar la conservación de la biodiversidad es necesario actuar desde diferentes enfoques (Nuñez *et al.*, 2003). En los planes de conservación de especies vegetales es importante considerar factores limitantes del desarrollo, como son: disponibilidad de polinizadores, sistemas reproductivos, producción de semillas, tasas de germinación, humedad, temperatura, depredación, nutrientes del suelo y fenología entre otros (Alanís *et al.*, 2004); por lo que la conservación integral y efectiva del germoplasma de plantas, requiere de diversas tecnologías.

En años recientes el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) ha sido una útil herramienta en el estudio, la propagación, conservación y planteamiento de alternativas para el aprovechamiento sostenible no solo de especies amenazadas, sino también aplicados a sectores industriales (Fay, 1994; Pérez *et al.*, 1998); por esto mismo las técnicas *in vitro* proveen una herramienta para cubrir la Estrategia Mexicana de Conservación Vegetal (Pence *et al.*, 2007).

Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos es una rama de la biotecnología que tiene sus bases en la totipotencialidad celular, propuesta por Gottlieb Haberlandt la cual refiere que cualquier célula es capaz de regenerar un organismo completo a partir del control de distintos factores. Implica el crecimiento de células vegetales, de tejidos u órganos aislados de la planta madre en un medio artificial, lo cual permite obtener nuevos individuos a partir de estructuras somáticas de la planta, pequeños fragmentos (llamados explantes) que pueden ser removidos de la planta madre sin comprometer su integridad (Mauseth, 1977; Thorpe, 2007; George *et al.*, 2008). Lo anterior supone una ventaja ya que no todas las especies son capaces de multiplicarse vegetativamente o por métodos convencionales (Arreola, 1997).

Trabajar con un sistema de cultivo de tejidos confiere diversas ventajas como lo enmarca George *et al.* 2008: posibilidad de iniciar el cultivo a partir de un fragmento del individuo; demanda poco espacio para el almacenamiento y multiplicación de los cultivos; capacidad de propagación de las plantas en grandes cantidades y en menor tiempo; se pueden producir clones de plantas que resultan difíciles de propagar vegetativamente o que cuentan con una característica que se quiera conservar; la producción es independiente de factores ambientales, ya que se realiza en condiciones controladas. A pesar de estas ventajas, el cultivo *in vitro* posee limitantes como las listadas a continuación:

- a) Se requiere experimentar y probar una metodología para cada especie y variedad que se desee propagar.
- b) El establecimiento aséptico de los organismos suele ser un proceso complicado.
- c) Requiere de una inversión inicial elevada, con procedimientos costosos y de un personal altamente calificado.

Inicialmente las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales se desarrollaron como un medio rápido y exitoso para propagar asexualmente especies de interés hortícola, agrícola o forestal; sin embargo, en la actualidad las aplicaciones de la técnica de cultivo de células son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (López, 2006; Calva y Pérez, 2005).

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento, lo que desemboca en una propagación más eficiente de las plantas. Con ello el cultivo *in vitro* se postula como una herramienta biotecnológica que representa una alternativa para propagar especies amenazadas, en peligro de extinción o con potencial económico de manera sustentable, ya que permite incrementar la cantidad de plantas para especies con demanda comercial y así satisfacer tanto el mercado nacional como el internacional, sin alterar los recursos a nivel natural (Tabla 3).

Tabla 3. Propagación de diversas especies vegetales por Cultivo de Tejidos.

| Especie | Nombre común | Familia | Respuesta | Usos | Estatus de conservación | Referencia |
|-------------------------------|---------------------|----------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Psychotria ipecacuanha</i> | Ipecacuana | Rubiaceae | Embriogénesis somática | Medicinal | En peligro crítico | Naranjo <i>et al.</i> (2014) |
| <i>Arnica montana</i> | Árnica | Asteraceae | Organogénesis directa (raíces) | Medicinal | Preocupación menor | Butiuc-Keul y Deliu (2001) |
| <i>Asplenium spp.</i> | Helecho | Aspleniaceae | Germinación, calo y organogénesis | Importancia ecológica | En peligro | Marszal-Jagacka y Kromer (2011) |
| <i>Musa spp.</i> | Platano | Musaceae | Organogénesis directa (brotes) | Alimenticio | Sin peligro | Kodim <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Quercus euboica</i> | Encino | Fagaceae | Organogénesis directa | Ornamental | En peligro | Kartsonas y Papafotiu (2007) |
| <i>Syzygium travancoricum</i> | | Myrtaceae | Organogénesis indirecta | Alimenticio y medicinal | En peligro | Anand <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Hylocereus purpusii</i> | Pitahaya | Cactaceae | Germinación y organogénesis | Alimenticio | En peligro | Feria <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Annona cherimola</i> | Chirimoya | Annonaceae | Organogénesis directa (brotes) | Alimenticio | Sin peligro | Padilla y Encina (2004) |
| <i>Salix tarraconensis</i> | Sauce | Salicaceae | Organogénesis directa | De importancia ecológica | En peligro | Amo-Marco y Lledo (1996) |
| <i>Eclipta alba</i> | | Asteraceae | Organogénesis directa (brotes) | Medicinal | Datos Insuficientes | Dhaka y Kothari (2005) |
| <i>Picea chihuahuana</i> | Pino | Pinaceae | Organogénesis directa | De importancia ecológica | En peligro | Mata <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Picconia azorica</i> | | Oleaceae | Organogénesis directa | Ceremonial | En peligro | Medonça <i>et al.</i> (2015) |
| <i>Olea europaea</i> | Olivo | Oleaceae | Organogénesis directa (brotes) | Alimenticio | Sin peligro | Binet <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Calanthe sieboldii</i> | Orquídea | Orchidaceae | Germinación | Ornamental | En peligro | Park <i>et al.</i> (2000) |

Con las actuales presiones medioambientales, en el que la producción intensiva tiene que jugar un papel fundamental, se hace necesario el conocimiento y la conservación de los recursos. La regeneración de plantas se está utilizando como un medio para lograr la multiplicación rápida de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación *ex situ* (Toribio y Celestino, 2008).

Hasta la fecha, la micropropagación es la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica, considerándose como el ejemplo más exitoso de la aplicación biotecnológica en plantas (Villalobos y Thorpe, 1991; Sangwan *et al.*, 1997). Existen tres principales vías de regeneración en el cultivo *in vitro*: la embriogénesis, la organogénesis y la activación de yemas preformadas (Calva y Pérez, 2005). Las dos primeras pueden efectuarse de manera directa o indirecta. La regeneración directa se produce sin que el explante pierda su identidad como tejido, mientras que en la segunda se da un crecimiento desmedido formando masas amorfas (denominada callo) de células de las cuales después de diversos estímulos se reorganizan formando estructuras consolidadas, ya sea por formación de embriones o de órganos.

Etapas de la micropropagación

En la micropropagación hay una serie de pasos ya establecidos que permiten obtener nuevos individuos. Este proceso se divide en 5 etapas, cada una de las cuales cuenta con requerimientos específicos y problemas asociados a cada paso en particular (George *et al.*, 2008; Saran y Kumar 2013):

Etapas 0 (Elección del explante): Se evalúa la condición de la planta madre, que se encuentre en crecimiento activo, libre de plagas o enfermedades, en buen estado fisiológico, etc. En general las plantas que se desarrollan en invernaderos son una mejor fuente que aquellas que provienen de campo. Durante la Etapa 0 también son importantes los regímenes de luz y temperatura, además de que se pueden adicionar RCV para influenciar la respuesta en etapas posteriores.

Etapas I (Establecimiento aséptico): el objetivo de esta etapa es establecer asépticamente los cultivos a partir de las plantas seleccionadas; a pesar de que es inusual obtener una desinfección al 100%, es deseable buscar el protocolo que provea los mejores resultados. El éxito en esta etapa depende en gran medida de la elección correcta de la planta madre, tipo de explante, una adecuada desinfección y prevenir o remediar cualquier reacción adversa (oxidación, necrosis) en los explantes.

Etapas II (multiplicación): La multiplicación puede ser lograda por morfogénesis directa (brotes adventicios o bien embriones somáticos); o con la mediación de una fase intermedia de callo (regenerantes *de novo*) o bien a por la activación de yemas axilares. Cada una de las formas de multiplicación tiene ventajas y desventajas y la elección depende del propósito de la investigación.

Etapa III (elongación y enraizamiento de brotes): Ya sea por embriones somáticos los cuales se deben germinar para continuar el desarrollo o bien a través de brotes donde se debe lograr el enraizamiento, en esta etapa se busca obtener individuos completos y aislados. En general los nuevos regenerantes deben ser transferidos a un medio con composición distinta al medio de inducción o multiplicación. Este medio nuevo busca que los regenerantes o individuos terminen su desarrollo germinando, elongándose o enraizando.

Etapa IV (trasplante y aclimatización): En esta etapa las plantas se transfieren a suelo o a una mezcla de sustrato con la finalidad de revertir los cambios sufridos en el ambiente *in vitro* (anatómicos, citológicos, fisiológicos, etc.). El periodo de aclimatización es esencial ya que las plantas cultivadas *in vitro* se nutren de manera heterotrófica y tienen un pobre control sobre la pérdida de agua. Durante la aclimatización primero se deben lavar perfectamente las raíces para eliminar el agar, posteriormente son colocadas individualmente en el sustrato más adecuado para su crecimiento y luego se protegen para evitar la pérdida de agua. Las plantas deben mantenerse en baja intensidad de luz e incrementar gradualmente.

Una etapa crítica en la micropropagación es el establecimiento aséptico del material vegetal, dado que la contaminación tanto endógena como exógena es la mayor limitante en la propagación de plantas en peligro de extinción o con material disponible limitado (Sarasan *et al.*, 2006; Pence, 2010; Pence, 2011).

Los protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* son variados (Tabla 4) (Sarasan *et al.*, 2006). En toda la metodología ensayada no se encuentra alguna que sea aplicable a todas las especies, por lo que para cada una debe definirse experimentalmente una metodología que se acople al tipo de explante (semillas o plantas adultas), la morfología de la planta (vellosidades, tricomas, espinas, espesor de cutícula, entre otros) y la procedencia del material vegetal (de bancos de semillas, estado silvestre, plantas de invernadero).

Cultivo de Tejidos en Cactáceas

A pesar de que en años recientes el Cultivo de Tejidos Vegetales se ha utilizado como una alternativa para la propagación masiva de una gran cantidad de especies de la familia Cactaceae (Tabla 5) (Rodríguez, 2014; Lara, 2010; Garza-Padrón *et al.*, 2010; Álvarez y Montaña, 1997; Balen *et al.*, 2009; Gratton y Fay, 1990; Feria *et al.*, 2012; Rubluo *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011), el éxito depende de diversos factores que requieren ser ensayados para cada especie en particular, como pueden ser: agentes desinfectantes, tipo de medio de cultivo, reguladores de crecimiento, procesos de aclimatización, etc. (Pérez-Molphe-Bach y Dávila-Figueroa, 2002; Medel-Narváez *et al.*, 2001).

Tabla 4. Efecto de los agentes esterilizantes en la desinfección y oxidación de los tejidos.

| Especie | Agente desinfectante | Explante | Contaminación | Oxidación | Referencia |
|-----------------------------------|--|-----------------------------|----------------------------|--------------|--------------------------------------|
| <i>Mammillaria hernandezii</i> | Solución jabonosa (15min) Etanol 70% (1min) Cuprimicin+Benomil (40min) Cloro 30% (30 min) | Plantas adultas | 90% | 100% | Pérez (2015) |
| <i>Pelecyphora aselliformis</i> | Solución jabonosa (1h) Etanol 70% (2min) Peróxido de Hidrógeno 20% (20min) Cloro20%+Tween0.2% (20min) | Semillas | 100% | 80% | Santos-Díaz <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Mammillaria plumosa</i> | Solución jabonosa (25min) Captan+Benlate Microdyn+Cloro Etanol 70% | Plantas adultas | 5-40% | 5-43% | Téllez (2012) |
| <i>Mammillaria bombycina</i> | Solución jabonosa (15min) Etanol 70% (30seg) Cloro 30%+Tween80 2gotas (20min) | Semillas | 2.6% | 30.55% | Yañez (2011) |
| <i>Pelecyphora strobiliformis</i> | Solución jabonosa (15min) Etanol 70% (1min) Cuprimicin+Benomil (40min) Cloro 30% (30 min) | Semillas | 6.6% | 50% | Flores (2004) |
| <i>Mammillaria bocasana</i> | Previcur; Derosal; Buzan 500 Etanol 70% (1min) Microdyn 20%+ Cloro 20% (20min) | Plantas adultas | 80% | 80% | Ramírez-Malagon <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Echinocactus grusonii</i> | Tween80 3 gotas (30min) Microdyn 3 gotas (15min) Etanol 70% (2min) Cloro 20% (15min) | Semillas | 0% | S.D. | Rodríguez (2006) |
| <i>Astrophytum myriostigma</i> | Extran+Benlate (6h) Etanol 70% (1min) Cloro 2% (25min) | Plantas adultas | 60% | S.D. | Pérez <i>et al.</i> (1998) |
| <i>Opuntia ficus-indica</i> | Fungicida 10g/L (30min) Cloro (5, 10 y 15min) | Plantas adultas | 100% (5min) 10% (10min) | 100% (15min) | Ojeda-Zacarías <i>et al.</i> (2010) |
| <i>Backebergia militaris</i> | Solución jabonosa (10min) Etanol(1min) Cloro30% (20min) Ciprofloxacino+Benomilo (30min) | Semillas Plantas adultas | 85.18% 98.75% | 100% | Fernández (2014) |

Tabla 5. Cultivo de Tejidos Vegetales en la familia Cactaceae.

| Especie | Explante | RCV | Referencia |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| <i>Carnegia gigantea</i> | Plantulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (2mg/L) 2iP (1,2 y 3mg/L) ANA (0.5mg/L) | Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Ariocarous bravoanus</i> | Plantulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (0,0.5mg/L) ANA (0,5mg/L) | Gómez (2008) |
| <i>Cephalocereus senilis</i> | Plantas adultas | BA (0,0.3,1 y 3mg/L) Kin (0,0.3,1 y 3mg/L) ANA (0,0.3,1 y 3mg/L) | Pérez <i>et al.</i> (1998) |
| <i>Coryphantha minima</i> | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (0.5mg/L) ANA (0.1mg/L) | Malda <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Pachycereus pringlei</i> | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (1,2 y 3mg/L) 2iP (1,2 y 3mg/L) ANA (0.5mg/l) | Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Mammillaria bocasana</i> | Brotes <i>in vitro</i> | Kin (10mg/L) | Ramírez-Malagón <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Polaskia chichipe</i> | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (1mg/L) | Retes-Pruneda <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Backebergia militaris</i> | Plántulas germinadas <i>in vitro</i> | BA (1,2 y 3mg/L) Kin (1,2 y 3mg/L) ANA (0.1,0.5 y 1mg/L) | Fernández (2014) |

Las cactáceas son particularmente complicadas de micropropagar, probablemente debido a su morfología en la cual las zonas meristemáticas están inmersas en el tejido de la aréola (Gratton y Fay, 1990). Durante el proceso de desinfección estas zonas pueden no ser alcanzadas por el desinfectante, por lo que

en ocasiones se llegan a remover las espinas para permitir que el agente desinfectante penetre; sin embargo, este procedimiento puede dañar las zonas meristemáticas. En otros ensayos se ha probado usar agentes desinfectantes más agresivos que logran desinfectar la zona de las aréolas, aunque se corre el riesgo de necrosar los tejidos.

Al respecto Pérez *et al.* (1998), reportaron que la contaminación de explantes provenientes de invernadero puede tener porcentajes de hasta 60%. A su vez Ramírez-Malagon *et al.* (2007), mediante la aplicación de fungicidas, cloro y Microdyn® reportaron el establecimiento de solo 20% del total de explantes en diez diferentes especies de *Mammillaria*, lo cual confirma lo crítico de esta etapa en la micropropagación en especies en peligro de extinción.

En diversas situaciones se ha optado por cambiar los tiempos de exposición al agente desinfectante o bien cambiando el tipo de agentes desinfectantes, con lo que se han obtenido resultados como el de Lara (2010), quien añadió el fungicida Captan® a su protocolo de desinfección y obtuvo 87% de explantes asépticos. Garza-Padrón *et al.* (2010) modificaron los tiempos de exposición a los agentes desinfectante propuestos por Morales (2006) (citado por Garza-Padrón *et al.*, 2010) y obtuvieron un establecimiento aséptico de 100%.

Feria *et al.* (2012) examinaron distintas concentraciones de cloro comercial (1, 1.5 y 2%) en semillas de *Hylocereus purpusii* y derivado de estos ensayos probaron tiempos variables en la mejor concentración de cloro. En otros casos se ha optado por tener una desinfección con agentes desinfectantes muy lesivos como el caso de Medel-Narváez *et al.* (2001), quienes usaron cloro comercial al 100% v/v de concentración por 20 minutos con lo cual lograron una completa desinfección; sin embargo, puede llevar a la oxidación de los explantes.

Fernández (2014) realizó una remoción de las espinas con la finalidad de reducir la superficie; practicó dos formas de retirar las espinas: la primera contando con ayuda de unas tijeras llegando al borde de la aréola y la segunda arrancando las espinas desde la base; aunado a esto realizó diversos ensayos de desinfección que incluyeron fungicidas, antibióticos y los agentes desinfectantes convencionales como cloro y etanol; sin embargo, se presentaron porcentajes de contaminación (entre 15%-50%) y alto porcentaje de oxidación (90%).

Además de la contaminación, el oscurecimiento y oxidación de los tejidos generan una problemática persistente durante la micropropagación (Tabla 4) (Laukkanen *et al.*, 1999). En el ambiente *in vitro* la inducción de estrés oxidativo es un evento casi inevitable debido a que las plantas están sujetas a agentes desinfectantes, a cortes o heridas, cambio del potencial osmótico, alteración del pH, composición gaseosa, al medio de cultivo, la adición exógena de RCV, la humedad en los contenedores, entre otros (Cassels y Curry, 2001; Us-Camus *et al.*, 2014). Lo anterior puede desembocar en una alteración del estado redox en los tejidos afectando directamente cuestiones fisiológicas (hiperhidratación, habituación) y en los casos más extremos provoca la muerte celular (Balén *et al.*, 2009; Gaspar *et al.*, 2002).

Cuando un tejido es disectado para su siembra *in vitro* se facilita la reacción entre las enzimas oxidativas, como la polifenoloxidasas, peroxidasa y tirosinas, que a su vez generan compuestos fenólicos y quinonas que son altamente reactivas, lo cual promueve procesos de oxidación y necrosamiento de los explantes (George y Sherrington, 1984; Zaid, 1987; Azofeita, 2009). La forma más evidente del daño oxidativo es la liberación de sustancias que se acumulan en el medio oscureciéndolo y que potencialmente pueden afectar la propagación (Zaid, 1987, Fernández, 2014). La presencia de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales está condicionada a diversos factores, como la edad fisiológica del explante, heridas, o estrés biótico (Collín y Edwards, 1998).

Por lo tanto, se ha observado que hay una relación entre la oxidación y el tipo de explante utilizado, dado que los cultivos realizados a partir de plántulas germinadas *in vitro* presentan menor oxidación comparados con aquellos iniciados a partir de plantas adultas (Pérez *et al.*, 1998). Además, todas las especies tienen diferente potencial de regeneración, incluso entre la misma especie. Por lo mismo es necesario realizar ensayos con el fin de establecer protocolos que permitan evadir los problemas que se presentan en la micropropagación a fin de incrementar la disponibilidad del material vegetal para posteriores análisis (Belokurova, 2009; Ojeda-Zacarías, 2010; Padrón, 2012).

Se han reconocido diversas estrategias para evitar o mitigar los procesos de oxidación como lo enmarca Azofeita (2009):

- Reducción de tiempo y agentes desinfectantes durante la esterilización superficial
- Remoción de los exudados por lavado, subcultivos frecuentes o poda del material necrosado
- Cambio del pH
- Cambio del estado físico del medio
- Uso de adsorbentes
- Cambio en la composición del medio
- Cambio de condiciones ambientales (Temperatura, fotoperíodo)
- Uso de antioxidantes

La aplicación de cada uno depende de la decisión del investigador, por ejemplo, Saucedo (2006) debido a la oxidación severa de plántulas de semillas, colocó los explantes en una solución de antioxidantes compuesta por ácido ascórbico (150mg/L) y ácido cítrico (100mg/L) durante 30 minutos. Debido a que la oxidación no disminuyó, procedió a transferir los explantes a medio MS 50% y en estado líquido con puentes de papel filtro, lo que redujo en mayor porcentaje los niveles de oxidación.

El uso de medio líquido con puentes de papel ha sido reportado en diversas ocasiones en el cultivo de cactáceas (Flores, 2004; Fernández, 2014; Pérez, 2015); sin embargo, los resultados no siempre son satisfactorios. Con respecto a los antioxidantes, la concentración a la cual se manejan puede provocar un efecto

sustancial en los procesos oxidativos, tal es el caso de Esparza (2004) quien al incrementar al doble la concentración de ácido cítrico y ácido ascórbico logró controlar la oxidación de callos en *Lophophora williamsii*.

Ángeles (2008), utilizó concentraciones elevadas de antioxidantes (1g/L) en *Mammillaria pectinifera* y en *Coryphantha greenwoodii* contrario a lo reportado por la literatura; sin embargo, se presentó oxidación. Otra manera de mitigar el oscurecimiento de los explantes en el cultivo de especies de Cactaceae es el carbón activado. Santos-Díaz (2003) utilizó carbón activado para reducir la oxidación en *Pelecocyphora aselliformis*. Por su parte Acosta (2013), utilizó altas concentraciones de carbón activado durante la germinación y propagación de *Echinocactus grusonii* y *Mammillaria mathildae*.

Además del carbón activado, el PVP o polivinilpirrolidona desempeña un papel en la inmovilización de compuestos no deseados en el cultivo *in vitro*, por lo que está ampliamente reportado en el control de la oxidación; las concentraciones de éste son diversas en la literatura. En este sentido Azcona *et al.* (2009), usaron 3g/L de PVP para *Melocactus dawsonii*. Fernández (2014) utilizó concentraciones de 1-4g/L en el control de la oxidación en *Backebergia militaris*, mientras que Pérez *et al.* (1998) usaron 2g/L de este adsorbente en 21 especies de cactáceas de distintos géneros, sin poder reducir en su totalidad el oscurecimiento de los explantes. Por otra parte, Saucedo (2006) logró el control de la oxidación con la adición de 1g/L de PVP en *Cephalocereus apicicephalium*.

La elección del tipo de explante es también una decisión que influye en la respuesta obtenida por cultivo de tejidos. Para Cactaceae se han utilizado diversas fuentes de explantes (Tabla 6), como epicotilos, meristemos apicales, aréolas, tubérculos, porciones de callo, semillas, etc. (Malda y Martín, 1999). Tal es el caso de García y Malda (2009), quienes micropropagaron *Mammillaria mathildae* a partir de secciones apicales y laterales del tallo de la planta madre y obtuvieron brotes como respuesta, encontrando diferencia entre la parte apical y la lateral con un promedio de 1.14 y 4.09 respectivamente.

Torres (2011), evaluó para *M. huitzilopochtli* el potencial de regeneración tomando plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explante y observó la regeneración a través de morfogénesis indirecta, con lo que generó un protocolo para potenciar la obtención de organismos de esta especie. De manera similar Cuellar *et al.* (2006), exploraron el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal partiendo de plántulas germinadas *in vitro* de las especies *Hylocereus undatus*, *Stenocereus griseus*, *S. queretaroensis* y *S. gummosus*.

Tabla 6. Efecto de Reguladores de Crecimiento Vegetal en cactáceas.

| Especie | Reguladores de Crecimiento Vegetal | Explante | Respuesta | Autor(es) |
|-----------------------------------|---|-----------------------|-------------------|---|
| <i>Selenicereus megalanthus</i> | Picloram (2-10mg/L) BA (0.4mg/L) 2,4-D (2-10mg/L) | Anteras | Callo y embriones | Benega <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Mammillaria albicoma</i> | ANA (0.1mg/L) BAP (5mg/L) | Botones florales | Callo y Brotes | Wyka <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Coryphanta elephantidens</i> | 2,4-D (9µM) Kin (4.6µM) | Raíz | Callo y brotes | Singh, 1999 |
| <i>Cephalocereus senilis</i> | ANA (0,0.3,1,3mg/L) Kin (0,0.3,1,3mg/L) BAP (0,0.3,1,3mg/L) | Aréolas | Brotes Callo | Choreño-Tapia <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Echinocereus cinerascens</i> | ANA (0.5-2.0mg/L) BAP (0.5-2.0mg/L) | Plántulas de semillas | Callo y Brotes | Elias <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Astrophytum myriostigma</i> | Kin (2mg/L) | Tallos | Brotes | Santos <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Cereus peruvianus</i> | AIA (0.01,0.1,1.0mg/L) BA (0.01,0.1,1.0mg/L) Kin (0.01,0.1,1.0mg/L) | Tallos | Callo y Brotes | Machado y Prioli, 1996 |
| <i>Pelecyphora aselliformis</i> | BAP (2.22µM) | Ápice y Laterales | Brotes | Pérez-Molphe-Bach y Dávila-Figueroa, 2002 |
| <i>Escontria chiotilla</i> | BAP (0.5,1.0,2.0 mg/L) 2iP (1.0,3.0,5.0 mg/L) | Tallos | Brotes | Retes-Pruneda <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Turbincarpus laui</i> | BAP (0-13.22µM) ANA (0-2.68µM) | Plántulas de semillas | Callo y brotes | Mata <i>et al.</i> ,2001 |
| <i>Coryphanta retusa</i> | BAP (0-3.0mg/L) ANA (0-1.0mg/L) | Plántulas de semillas | Brotes | Ruvalcaba-Ruiz <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | ANA (0.2mg/L) 2iP (3mg/L) | Callo | Brotes | Manzo, 2010 |

Junto con el tipo de explante, la respuesta generada *in vitro* está en función del genotipo, la edad fisiológica y las condiciones de cultivo. Dentro de la última, los reguladores de crecimiento vegetal desempeñan un papel preponderante, ya que influyen directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pierik, 1990).

Los RCV son compuestos orgánicos, sintéticos, con acción semejante a las fitohormonas que actúan en pequeñas cantidades en diferentes tipos celulares tejidos u órganos modificando diversos procesos fisiológicos de las plantas mediante la estimulación o inhibición de los mismos (George y Sherrington, 1984; Gaspar *et al.*, 1996; Garay-Arrollo *et al.*, 2014).

Existen diez fitohormonas caracterizadas hasta el momento: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, ácido jasmónico, brasinoesteroides, etileno y estrigolactonas (Garay-Arrollo *et al.*, 2014). El crecimiento normal y la morfogénesis es el resultado de una precisa modulación que responde a estímulos endógenos y ambientales, entre ellos las fitohormonas son clave en la proliferación (Garay-Arrollo *et al.*, 2012).

De manera general las auxinas, citocininas, giberelinas y etileno, así como la relación entre estas son consideradas como las más importantes en la regulación del crecimiento y organización de los tejidos en el cultivo *in vitro* (Gaspar *et al.*, 1996; Garay-Arrollo *et al.*, 2014). De estas, las auxinas y citocininas han sido utilizadas en diversos ensayos durante la micropropagación de cactáceas.

Las auxinas ejercen una fuerte influencia sobre el proceso de enraizamiento y expansión celular, acidificación de la pared celular y organización de los meristemas que dan lugar a tejidos organizados, además de promover la diferenciación vascular (Gaspar *et al.*, 1996). El compuesto más abundante y fisiológicamente más importante es el ácido indol-3-acético (AIA), el cual es sintetizado en los tejidos más jóvenes de la planta (Garay-Arrollo *et al.*, 2014). En el cultivo *in vitro* se han ocupado frecuentemente el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenociacético (2,4-D) y el ácido indol-3-butírico (AIB).

Por otro lado, las citocininas tienen efecto sobre el ciclo celular, activación de las yemas laterales, formación de brotes, promueven la expansión de las hojas, formación de brotes, retardan la senescencia, promueven la síntesis de clorofila y mejoran el desarrollo del cloroplasto (Jordán y Casaretto, 2006). De manera natural la citocinina presente en las plantas es la zeatina. Las citocininas en combinación con las auxinas determinan la cantidad de brotes laterales, la dominancia apical, el crecimiento de las raíces y el inicio de las raíces laterales (Srivastava, 2002). Para el cultivo de tejidos se han ocupado son la Benciladenina (BA), Kinetina (Kin), el N-6 dimetilalilaminopurina (2iP).

Un gran número de especies del género *Mammillaria* han sido cultivadas *in vitro*, donde cada una de ellas han requerido una combinación única de auxinas y citocininas para regenerar (Papafotiu *et al.*, 2001).

Ramírez-Malagon *et al.* (2007) utilizaron una combinación de Kinetina (0,4.6, 13.9, 27.9 y 46.5µM) con AIA (0,5.7, 11.4, 22.8 µM) para diez especies del género *Mammillaria*, con lo que encontraron respuestas regenerativas en la mayoría de los tratamientos con excepción de aquellos con baja concentración de ambos RCV. En todas las especies se observó tanto la organogénesis directa como indirecta.

Mata *et al.* (2001) evaluaron combinaciones de ANA con BAP para *Turbinicarpus laui* y señalan que tanto la morfogénesis como la producción de callo se ve limitada cuando la concentración de auxinas y citocinias es baja o nula. Además, observaron que las citocininas tienen un papel fundamental en la formación de brotes pues altas concentraciones de esta fitohormona generan una gran cantidad de brotes aún en ausencia de auxinas.

Diversos investigadores han explorado el efecto de una sola fitohormona. Por ejemplo, Santos *et al.* (2001) exploraron el efecto de la Kinetina en concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/L durante el cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma*, una especie en peligro crítico de extinción y encontraron una relación entre la concentración de la Kinetina y la respuesta de regeneración, siendo que a concentraciones altas del regulador se presenta una mejor respuesta morfogenética.

De igual forma Pérez Molphe-Bach y Davila-Figueroa (2002) probaron tres citocininas (BAP, 2iP y TDZ) para evaluar cuál de éstas tiene una mejor respuesta en el cultivo *in vitro* de *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis*, con lo que observaron que para ambas especies la citocinina BAP generó mayor cantidad de brotes.

A pesar de que hay numerosos trabajos de micropropagación que contemplan el uso de RCV, también se han reportado ensayos donde se puede eliminar la presencia de estos morfógenos. En este sentido Machado y Prioli (1996) mencionan que la proliferación de brotes en *Cereus peruvianus* continúa después de varios ciclos aún sin RCV y tras haber pasado un primer periodo de inducción con auxinas y citocininas.

***Mammillaria luethyi* G.S. Hinton**

Es una planta pequeña, de tallo primero solitario y más tarde cespitoso, de 1.5 cm de diámetro y hasta 4 cm en injerto, subglobosa, de color verde fuerte. Tubérculos ascendentes, densos, erectos y cilíndricos de hasta 0.5 cm de altura. Las espinas cortas, diminutas, hasta 80 por areola, blanquecinas, cubriendo el ápice del tubérculo. La raíz larga, carnosa y tuberosa, más grande que la parte aérea. Flores largas de 1.5 a 2.5 cm, de color magenta. El fruto de 4 a 5 mm de diámetro,

permanece en el tallo, las semillas color negro (Fig. 1). Considerada ornamental y descubierta en 1996 (Gómez, 2010).

Lüthy (2007), hizo un recuento del grado de perturbación de la población conocida de *M. luethyi* y encontró además una nueva población con algunos miles de individuos. Esta nueva población la reportó como intacta por perturbación antropogénica; además mencionó que la población original se mantuvo igualmente sin perturbar, por lo que los organismos que ahora se encuentran representados en colecciones (científicas y particulares) son el resultado de los primeros ocho organismos colectados por Hinton en 1996. Sin embargo, se hace mención de la distribución restringida de esta especie, donde en la búsqueda de nuevas poblaciones en hábitats similares al de las poblaciones núcleo, no se observan individuos en los alrededores del desierto.



Figura 1. *Mammillaria luethyi*. A) Floración. B) Ejemplar en injerto. C) Fruto y semillas. D) Ejemplar en su hábitat. (A-C: fotografías Alejandro Camargo; D: fotografía Turner, 2007).

El precio máximo alcanzado por individuo, en el mercado negro de cactáceas mexicanas fue de 1000 dólares y el precio por individuo en viveros comerciales de Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, Italia y Tailandia anunciados en sitios de internet en el año de 2005, fue de 8-25 euros. Su hábitat es en el norte de Coahuila (México), en una región montañosa con suelos calcáreos. Se considera vulnerable

de acuerdo a las listas del 2013 del libro rojo de la UICN, y se encuentra en el Apéndice II del CITES, debido a su hábitat altamente específico, ocupa solo dos localidades que abarcan menos de 20km² que de darse a conocer pondrían en grave riesgo a la especie (IUCN, 2015; Gómez, 2010). Está sujeta al saqueo de sus poblaciones.

Su cultivo está reportado por Escobedo *et al.* (2004) quienes promovieron la formación de callo a partir de tubérculos, con el empleo de RCV como 2,4-D, Kinetina y BAP; con sus diferentes tratamientos regeneraron de manera indirecta 2.18 brotes en el mejor resultado.

Gracidas *et al.* (2010), reportaron el desarrollo de 745 brotes por morfogénesis indirecta a partir de secciones de tallos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con BAP (1.0-2.5mg/L) y ANA (0.5mg/L).

Astrophytum caput-medusae D.R. Hunt

Planta simple, rara vez cespitosa, considerada ornamental (Fig. 2). En su hábitat, los ejemplares crecen en suelos planos, asociados con otras especies arbustivas del matorral espinoso. Tallo cortamente cilíndrico, sin costillas, con cerdas papiráceas cubriendo el cuello del tallo y su ápice. Los tubérculos son largos (de hasta 19cm) y delgados, nacen del ápice del tallo y la epidermis está cubierta de estigmas. Las aréolas son dimórficas, la espinífera se encuentra ubicada en la parte apical del tubérculo, con lana blanca; la areola florífera adaxial en la porción subterminal del tubérculo, sin que se una con la areola espinífera. Raíz fusiforme, de tamaño similar a la parte aérea. Las flores son diurnas, amarillas, con la base de los segmentos interiores del perianto de color naranja. El fruto es verde y carnoso cuando joven, con escamas lanceoladas y algo de lana que nace de las axilas de las escamas, con dehiscencia longitudinal irregular. Las semillas son grandes de hasta 3 mm de largo, en forma de gorro, testa tuberculada, de color negro a café oscuro (Velazco y Nevarez, 2002; Gómez, 2010).

Inicialmente descrita como *Digitostigma* se hace notar su similitud a otros géneros de la familia. Las partes vegetativas de la planta asemejan a especies de los géneros *Ariocarpus*, *Obregonia* o *Leuchtenbergia*, por otro lado, las estructuras reproductivas tienen mayor similitud con el género *Astrophytum*. Con la integración de análisis moleculares en cloroplasto, en exones e intrones y espacios intergénicos se reconoció que esta especie pertenece a *Astrophytum* (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013).

El precio máximo alcanzado por semilla, tanto en el mercado negro de cactáceas como en viveros comerciales de Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, Italia y Tailandia anunciados en sitios de internet en 2005, fue de 100 dólares. Crece en suelos planos entre 100 y 200 msnm, en Nuevo León (México) entre matorrales espinosos, donde solo es posible observar los tubérculos que salen cuando está en floración. Se considera en peligro de acuerdo a la NOM-059, y de acuerdo al libro rojo de la UICN se encuentra en peligro crítico por tener una distribución muy

limitada, además de que hay pastoreo por cabras en su localidad (IUCN, 2015; SEMARNAT, 2010; Gómez, 2010). Al ser una especie de reciente descubrimiento, además de tratarse de una de las especies más raras encontradas hasta ahora en México es víctima de saqueo de sus poblaciones, aunado a ello ya presenta un estado crítico en la única población existente descrita hasta la fecha, con pocos individuos en colecciones biológicas y falta de información sobre su biología.

Existe un reporte de su cultivo *in vitro* por Hernández (2013), quien sembró secciones de tubérculos, tallos y semillas en medio MS con BAP (0.1, 1.0 y 2.0mg/L) y ANA (0.0, 0.1mg/L), de los que obtuvo algunos brotes sin precisar su origen ni tiempos de inducción. Tanto el callo como los brotes generados tuvieron alta incidencia de oxidación, así como una marcada hiperhidratación.

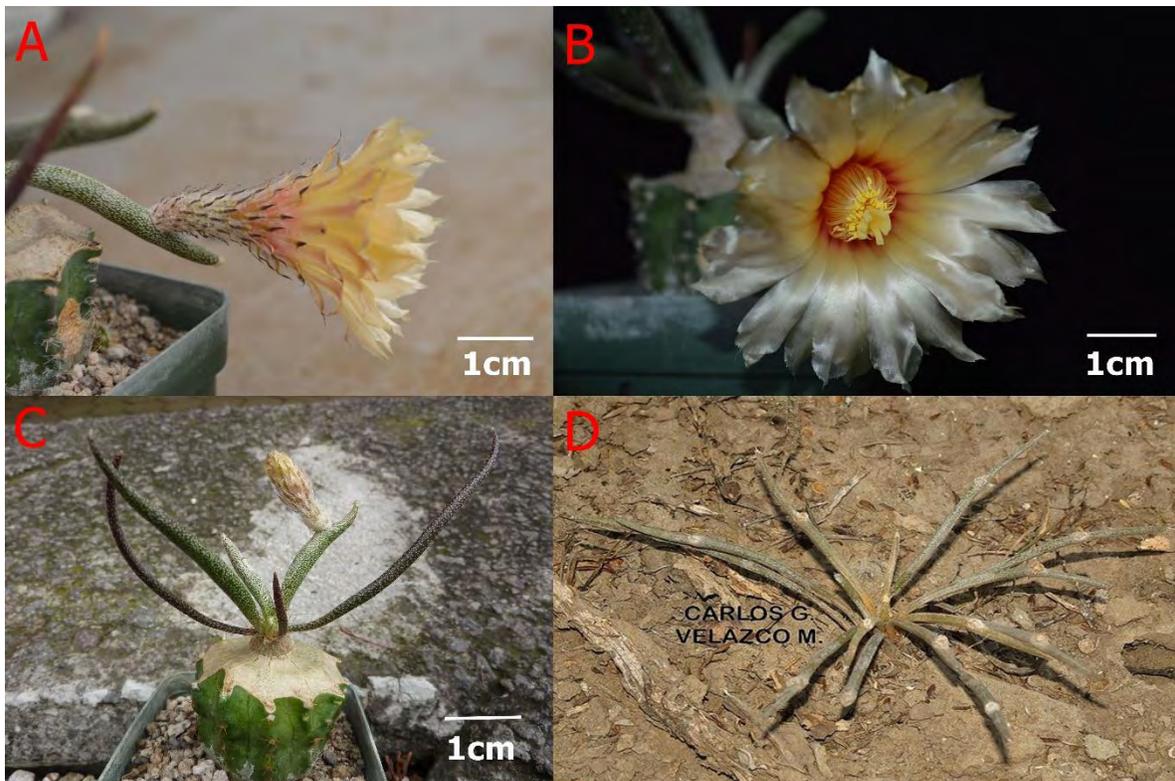


Figura 2. *Astrophytum caput-medusae*. A-B) Flor. C) Ejemplar en injerto. D) Individuo en su hábitat. (A-C: fotografías Alejandro Camargo; D: fotografía de Velazco, 2009.

JUSTIFICACIÓN

Mammillaria luethyi y *Astrophytum caput-medusae* son dos cactáceas endémicas de México, de reciente descubrimiento, con escasa o nula información de su biología; sin embargo, su existencia ya está amenazada debido a distintos factores como su restringida distribución, alteración de su hábitat y extracción ilegal de individuos de las poblaciones silvestres. Su crítica situación se hace más aguda por su pequeño tamaño poblacional, baja tasa de germinación, aunado a su lento crecimiento.

Durante el redescubrimiento de *M. luethyi* sus poblaciones se mantuvieron en secreto; sin embargo, en la actualidad las localidades ya no son de entero desconocimiento y por lo mismo están vulnerables a eventos de extracción ilegal (Janeba, 2013). Su reproducción incluye semillas e hijuelos (Gómez, 2010); sin embargo, la tasa de germinación es cercana a 0% (Gracidas *et al.*, 2010; Turner, 2007) y el crecimiento en su raíz es lento. Recientemente también se ha propagado por injertos, donde el crecimiento se ve acelerado y la floración es más abundante (Lüthy, 2007), no obstante, la producción bajo este esquema podría no ser suficiente para satisfacer la demanda como planta ornamental o con fines de investigación.

Por otra parte, el reciente descubrimiento de *A. caput-medusae* la coloca en una severa condición de riesgo debido a su peculiar morfología, que la hace blanco de coleccionistas, además cuenta con escasas poblaciones y falta de información sobre su biología. Pasados 7 años de su descripción la localidad tipo descrita pasó de 129 individuos a un solo individuo para el 2009, lo cual corrobora la intensa extracción ilegal y el saqueo que ha sufrido la especie. Actualmente se propaga en varios países y en México se han multiplicado en viveros, siendo el más importante el "Proyecto Digitostigma", creado por uno de los descubridores (Velazco y Nevárez, 2002; CONABIO, 2010).

Ambas especies se encuentran en el libro rojo de la IUCN (2015), por lo que se deben redoblar los esfuerzos que permitan disminuir su estatus de riesgo. El CTV es una alternativa para su estudio, propagación, conservación y para establecer bases para su aprovechamiento sostenible. Trabajos como el de Gracidas *et al.* (2010), Escobedo *et al.* (2004) y Hernández (2012) han establecido un primer acercamiento para su cultivo *in vitro*; no obstante, las limitantes que exhibieron, representan una barrera en que ambas especies puedan ser propagadas masivamente, para que se logre reducir su estatus de riesgo, incrementar la información biológica disponible y desarrollar un uso sustentable de estos valiosos recursos naturales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Regener plántulas *in vitro* y describir la morfogénesis a partir de distintos explantes (raíz, tallo, tubérculos) de *Astrophytum caput-medusae* y *Mammillaria luethyi*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar la eficiencia de la incorporación de fungicidas y del químico Soluvel® en la etapa de establecimiento para *M. luethyi* y *A. caput-medusae*.

Describir las respuestas morfogénicas a partir del cultivo *in vitro* de distintos explantes de raíz, tubérculos y tallo de plántulas *in vitro* de *A. caput-medusae* y *M. luethyi*.

Explorar y describir el efecto de distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento en la regeneración de órganos (brotes, raíces) y plántulas de ambas especies.

Analizar la eficiencia de distintas estrategias para dar solución a los problemas de oxidación generados en el ambiente *in vitro* para ambas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los distintos ensayos se realizaron a partir de dos orígenes de explantes: plántulas establecidas *in vitro* y plantas adultas procedentes de invernadero, los cuales se describen a continuación.

In vitro

Para *M. luethyi* los organismos fueron donados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico, IB-UNAM. (Fig. 3), resultado de la investigación de Gracidas *et al.* (2010). Estas plantas se obtuvieron por organogénesis indirecta. Se realizó una selección de 32 plántulas para obtener un lote con características de tamaño similar (1.5-2.5 cm de altura y 0.5 cm de ancho aproximadamente). Cada individuo se disectó en tres tipos de explantes (Fig. 4), los cuales se destinaron aleatoriamente a diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento vegetal (Tabla 7), tomando como base los trabajos de Gracidas *et al.* (2010) y Escobedo *et al.* (2004). Durante la disección algunos tubérculos se desprendieron, los cuales se sembraron en medio en el tratamiento 6 para aprovechar el material biológico.

Para *A. caput-medusae* los organismos fueron donados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (Fig. 3), resultado de la investigación de Hernández (2012). Dada la severa oxidación en la que se encontraron los cultivos, sólo fue posible dar seguimiento a dos frascos, los cuales fueron subcultivados para reactivar el crecimiento y proliferación, para ser sometidos aleatoriamente a reguladores de crecimiento vegetal (Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal para plántulas *in vitro*.

| ANA/BAP mg/L | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 |
|---------------------|------|------|------|-------|
| 0.0 | Tx.1 | Tx.2 | Tx.3 | Tx.4 |
| 0.1 | | Tx.5 | Tx.6 | Tx.9 |
| 0.5 | | | Tx.7 | Tx.10 |
| 1.0 | | | Tx.8 | Tx.11 |

Tx= tratamiento

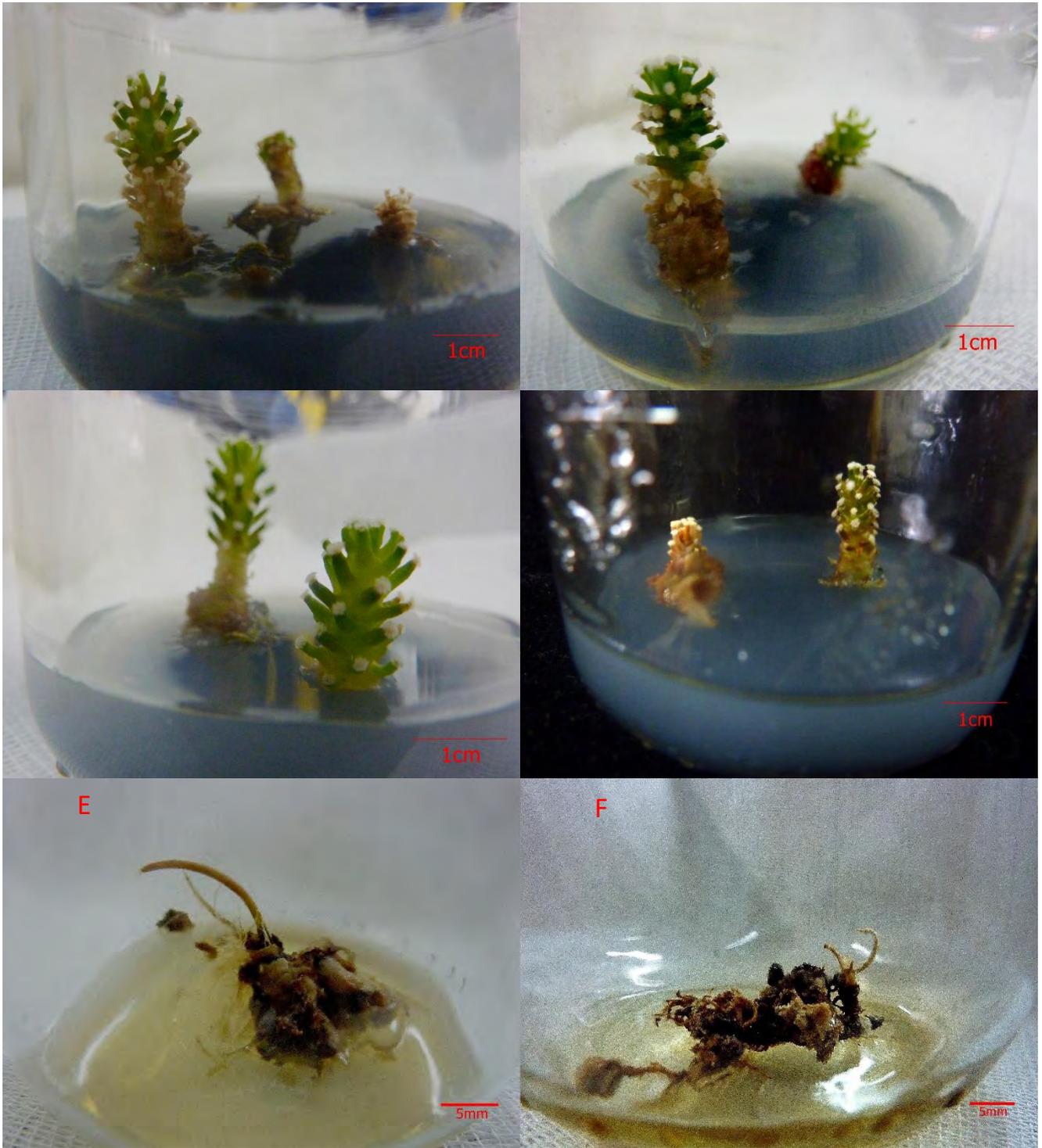


Figura 3. Plántulas *in vitro* de *Mammillaria luethyi* A, B, C, D: (Gracias *et al.* 2010), y de *Astrophytum caput-medusae* E, F (Hernández 2012). Fotografías de Alejandro Camargo.

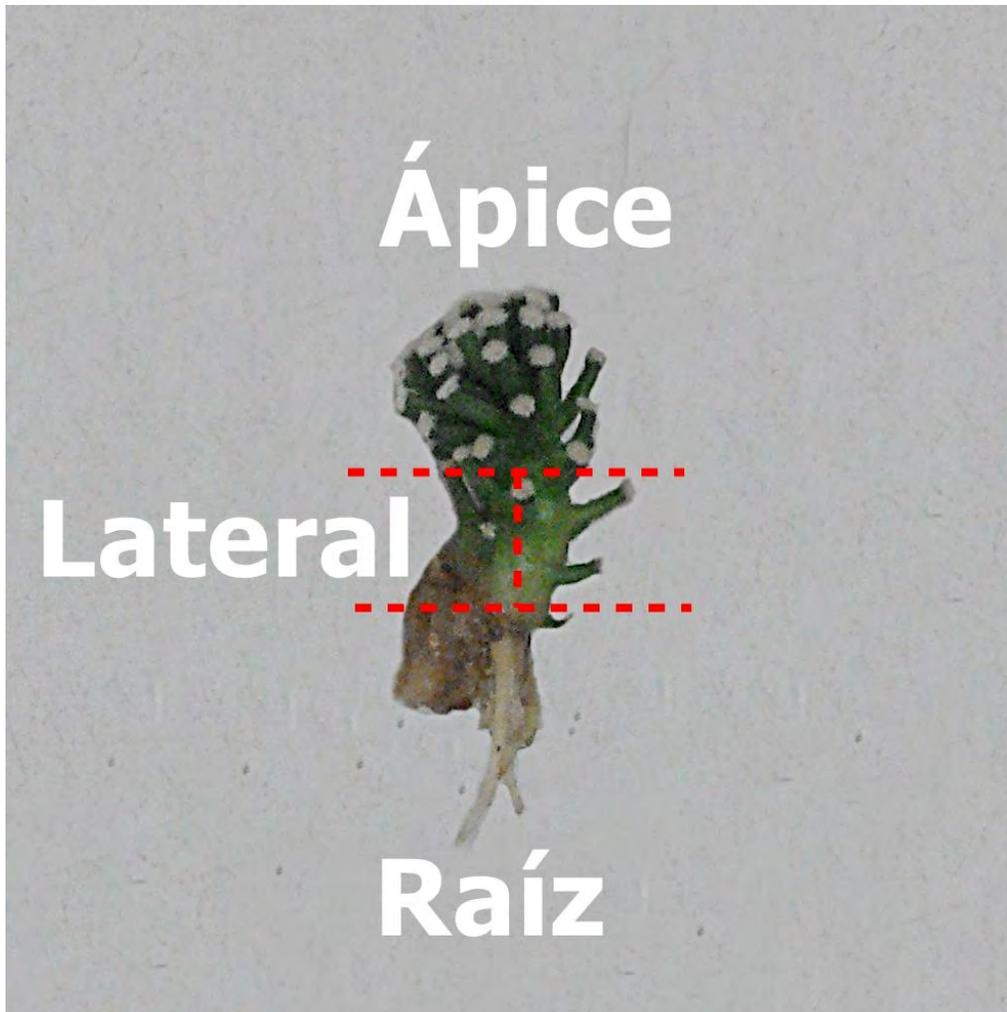


Figura 4. Tipos de explantes generados a partir de plántulas *in vitro* de *Mammillaria luethyi*. Fotografías de Alejandro Camargo.

Condiciones de cultivo

Se ensayaron dos variables en el medio de cultivo para evaluar la mejor respuesta morfogénica y prevenir los procesos oxidativos, teniendo como base el medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico. Los medios evaluados fueron: 1) MS 50-100% (componentes inorgánicos-orgánicos) adicionado con carbón activado 1 g/L y 8.5 g/L de agar bacteriológico, 2) medio MS 50-100% líquido en puentes de papel filtro más 0.1mg/L de ANA y 1.0mg/L BAP. Se sembraron en frascos Gerber® con un volumen de 171.44 cm³ y 25mL de medio de cultivo. El pH se ajustó a 5.7 adicionando NaOH o HCl (0.1-1.0M). El medio se esterilizó por autoclave a 1.5kg/cm³ de presión. Se sembró un explante por frasco y se mantuvieron en una cámara de incubación bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16h luz 8h oscuridad y una intensidad de 50µMol/m²s, a temperatura de 25±2°C.

Ex vitro

Se adquirieron organismos adultos en injerto del vivero comercial “El secreto de la montaña”, con registro ante SEMARNAT SGPA/DGVS/07800/12. En total se compraron 10 plantas de *M. luethyi* y 10 de *A. caput-medusae* (Fig. 5). Alrededor del 30% de las plantas presentaron floración durante todo el estudio; sin embargo, no se contó con el dato de la edad. Las plantas de *M. luethyi* presentaron un ancho promedio de 6cm por 3.5cm de alto; en un organismo se encontró un fruto, con 5 semillas. Para *A. caput-medusae* las tallas promedio de fueron de 11cm de ancho. Se mantuvieron en condiciones de invernadero con riego cada 8 días, hasta el momento de ser establecidas *in vitro* de acuerdo a los métodos de desinfección propuestos.

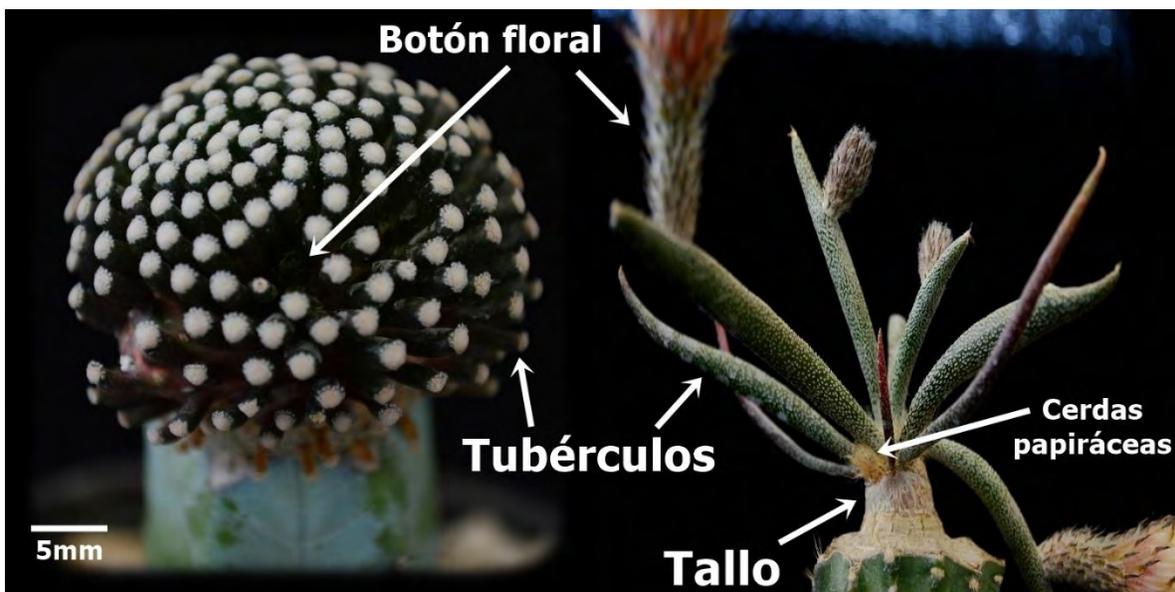


Figura 5. Organismos adultos en injerto de *M. luethyi* (izquierda) y de *A. caput-medusae* (derecha). Fotografías de Alejandro Camargo.

Desinfección de plantas

Para el establecimiento de explantes a partir de plantas de invernadero se ensayaron cuatro distintos métodos de desinfección (Tabla 8). El procedimiento se realizó en todos los casos un día posterior al riego; antes de someterlas a la desinfección se enjuagaron con agua corriente y en el caso de *A. caput-medusae* se retiraron con unas tijeras las cerdas papiráceas que surgen del ápice del tallo y en la base de los tubérculos, con la finalidad de permitir que los agentes desinfectantes penetraran en esta intersección además de reducir la carga de microorganismos. En el caso de *M. luethyi* la disección se realizó después de la exposición a los agentes químicos, además para esta especie se realizó la desinfección de un botón floral y las semillas encontradas en el fruto. Cuando los explantes no quedaron asépticos se volvieron a desinfectar variando tiempos de exposición o agentes desinfectantes. Los protocolos de desinfección se realizaron

en una campana de flujo laminar. Después de los enjuagues con agua destilada esterilizada se diseccionaron con base en la morfología de la especie (Fig. 6).

| Tabla 8. Ensayos para la desinfección de plantas ex vitro | | | |
|--|---|--|---|
| Método 1 | Método 2 | Método 3 | Método 4 |
| Captan 2mg/L (Por aspersión, 2 veces por semana/1 mes previo) | Benomil (1g/L) + Terbinafina (250mg/L) (24 horas) | | |
| Jabón antibacterial 10% ^{v/v} (5 minutos) | Jabón antibacterial 10% ^{v/v} (5 minutos) | Jabón antibacterial 10% ^{v/v} (5 minutos) | Jabón antibacterial 10% ^{v/v} (5 minutos) |
| Etanol 70% ^{v/v} (1 minuto) | Etanol 70% ^{v/v} (1 minuto) | Etanol 70% ^{v/v} (1 minuto) | Etanol 70% ^{v/v} (1 minuto) |
| Soluvet 2% ^{v/v} (15 minutos) | Soluvet 2% ^{v/v} (15 minutos) | Soluvet 2% ^{v/v} (15 minutos) | Soluvet 10% ^{v/v} (15 minutos) |
| Cloro 20% ^{v/v} (20 minutos) | Cloro 20% ^{v/v} (20 minutos) | Cloro 20% ^{v/v} + Tween 80 (2 gotas) (20 minutos) | Cloro 2% ^{v/v} + Tween 80 (2 gotas) (25 minutos) |
| ADE 3 enjuagues | ADE 3 enjuagues | ADE 3 enjuagues | ADE 3 enjuagues |
| ADE: agua destilada esterilizada | | | |

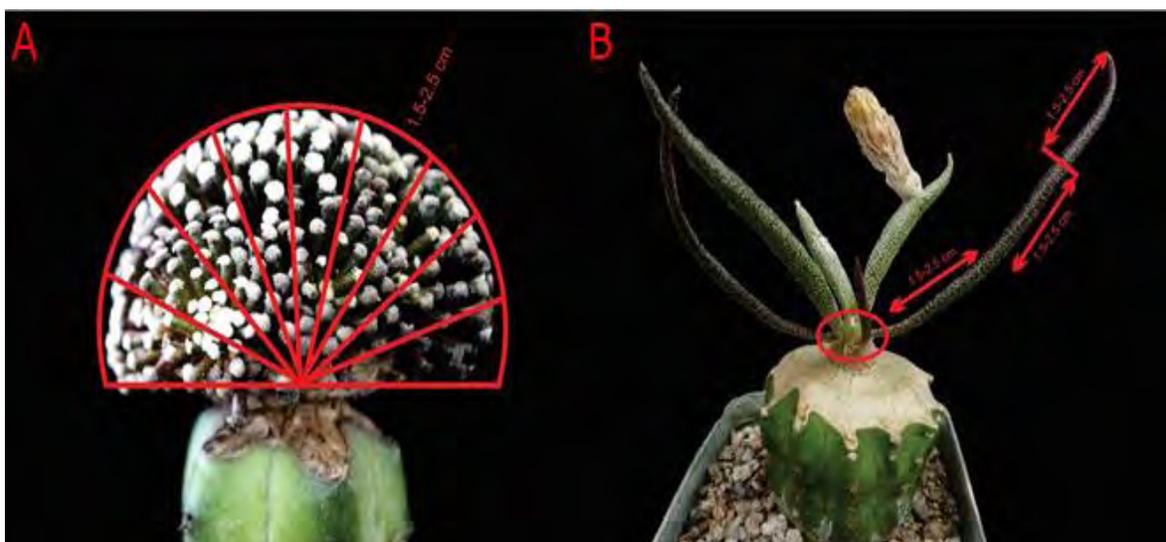


Figura 6. Disección de las plantas madre, A) *M. luethyi*, con cortes en forma de disco; B) *A. caput-medusae* con disección del tallo y de distintas fracciones de tubérculos. Fotografías de Alejandro Camargo.

Condiciones de incubación

De la respuesta observada con el ensayo previo con plántulas de procedencia *in vitro*, se modificaron las concentraciones y tipo de RCV, así como el volumen del contenedor. Se realizaron dos ensayos:

1) Baja concentración de RCV: *Mammillaria luethyi* se cultivó con 1.0mg/L de BAP en ausencia de auxinas; para *Astrophytum caput-medusae* se adicionaron 1.0mg/L de BAP con 0.1mg/L de ANA.

2) Cambio de RCV más reducción del volumen de la atmósfera: para ambas especies se probaron dos diferentes tipos de citocininas (BAP y Kin) y dos tipos de auxinas (ANA y 2,4-D), con un total de doce tratamientos (Tabla 9). Además, se cambió el tipo de contenedor de frascos Gerber® a tubos de ensayo con volumen de 60.2 cm³ y 10mL de medio de cultivo.

3) Inmersión temporal en alta concentración de reguladores: para *A. caputmedusae* se pusieron en inmersión por 2 horas tuberculos de la especie en una concentración de 30mg/L de BAP, más una solución antioxidante de 500mg/L de ácido ascórbico y 500mg/L de ácido cítrico.

Fue necesario modificar el procedimiento para combatir la oxidación y oscurecimiento de los explantes incluyendo el incremento en la concentración de los antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico), adición de PVP al medio, medio líquido con puentes de papel o inmersión temporal en una solución concentrada de antioxidantes. En todas las pruebas se tuvo como base el medio Murashige & Skoog (1962), modificando la concentración de componentes inorgánicos al 50%, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 150 mg/L de ácido ascórbico y 150 mg/L de ácido cítrico y 3.9 g/L de Gellan Gum (cuando se trató de medio semisólido). El pH se ajustó a 5.7 unidades adicionando NaOH o HCl (0.1-1.0M). El medio se esterilizó por autoclave a 1.5kg/cm³ de presión. Se sembró un explante por frasco y se mantuvieron en una cámara de incubación bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 16h luz 8h oscuridad y una intensidad de 50µMol/m²s, a temperatura de 25±2°C.

Evaluación del material vegetal

La contaminación y oxidación de los explantes se evaluaron mediante la observación directa. Para distinguir el grado de oxidación se tomó en cuenta el siguiente criterio: 1) oxidación ligera: cuando el explante presentó menos de 25% de su superficie oxidada, 2) oxidación moderada: cuando el explante presentó hasta 50% de su superficie oxidada y 3) oxidación severa: cuando más del 50% de la superficie se encontró oxidada. La sobrevivencia también se evaluó en función de aquellos explantes que no presentaron regeneración o completamente oxidados en un periodo de tres meses.

Tabla 9. Reguladores de crecimiento vegetal durante la reducción del volumen de la atmósfera

| | | | Citocininas | | | | | |
|---------|-------|-----|-------------|------|-------|------|------|-------|
| | | | Kin | | | BAP | | |
| | | | 3 | 3.5 | 5 | 3 | 3.5 | 5 |
| Auxinas | ANA | 0.1 | Tx.1 | | | Tx.2 | | |
| | | 0.5 | | Tx.5 | | | Tx.6 | |
| | | 1 | | | Tx.9 | | | Tx.10 |
| | 2,4-D | 0.1 | Tx.3 | | | Tx.4 | | |
| | | 0.5 | | Tx.7 | | | Tx.8 | |
| | | 1 | | | Tx.11 | | | Tx.12 |

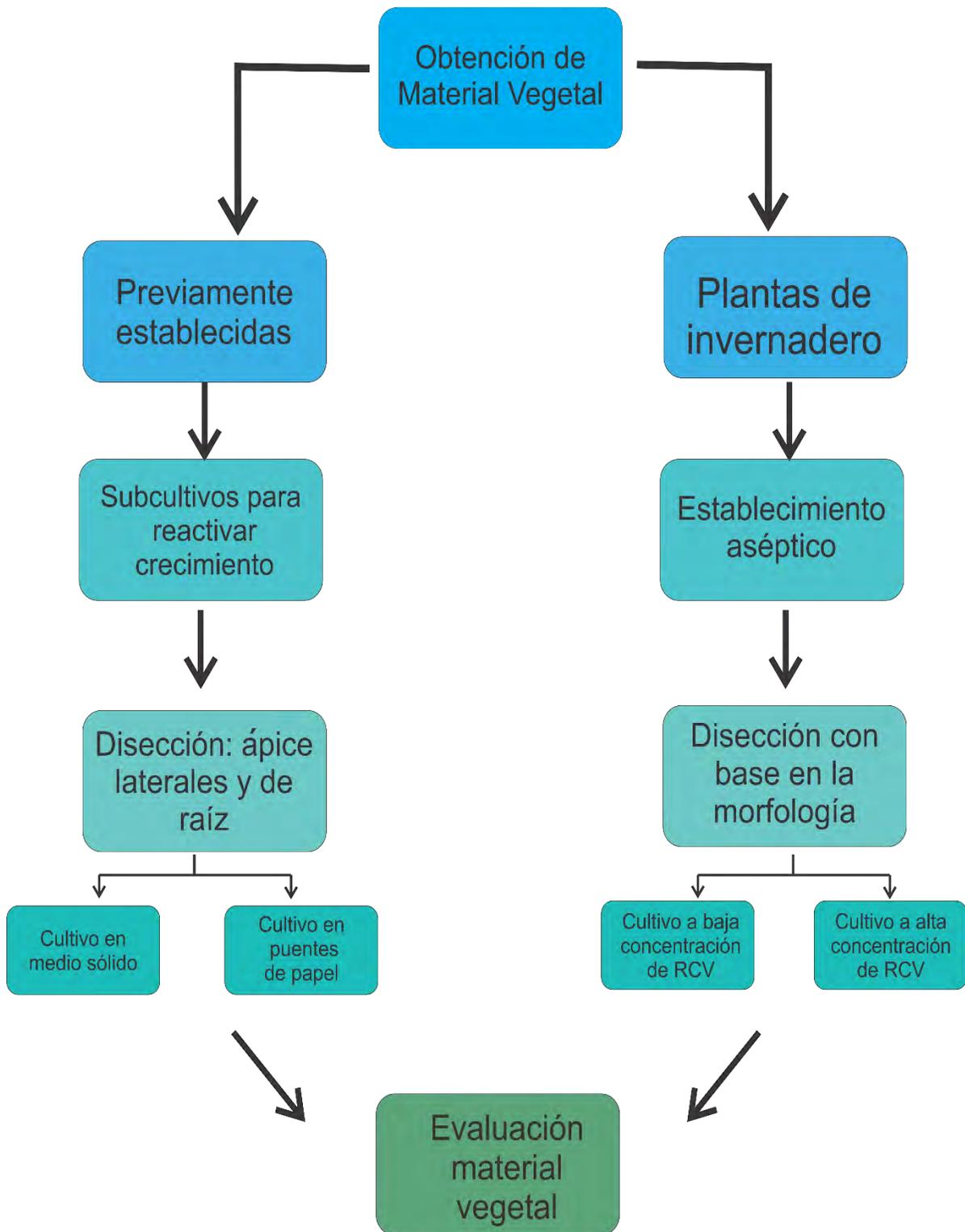


Figura 7. Diagrama de los principales procedimientos para el cultivo *in vitro* de *Mammillaria luethyi* y *Astrophytum caput-medusae*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mammillaria luethyi

Plántulas de origen *in vitro*

Las plántulas *in vitro* procedentes de la investigación realizada por Gracidas *et al.* (2010), fueron disímiles, por lo que del lote de 32 plántulas seleccionadas algunas no tenían la raíz, la morfología y la coloración de las plántulas fueron distintas algunas tenían la base de color café, con tubérculos de aspecto marchito o incluso se adelgazaban hacia esta zona, mientras que otras tenían un color verde intenso y una mayor densidad de tubérculos; también se observó que el tallo presentó una coloración rojiza, extendiéndose en algunos casos hasta los tubérculos (Fig. 8). Dado que esta condición no mejoró en los subcultivos realizados por tres meses, se procedió a realizar los cortes para iniciar el periodo de inducción y observar el efecto de los reguladores sobre la proliferación y diferenciación de nuevas estructuras. Se obtuvieron

Después de un mes en el medio de inducción se registró en los explantes laterales una curvatura en la parte media y de forma cóncava con respecto al medio (Fig. 9), además las zonas que permanecieron en contacto con el medio se tornaron rojizas o color marrón. Esta respuesta se observó en el 11.2% de los explantes laterales.

La curvatura de los explantes se ha registrado para otras especies. Esta respuesta es un evento que sólo se observa cuando se expone una gran parte de la zona medular al medio de cultivo. En *Thelocactus rinconensis* se observó en explantes laterales (Díaz, 2007), en *Echinocactus grusonii* cuando se realizó un corte longitudinal (Rodríguez, 2006) y Rodríguez (2014) lo registró para *Mammillaria coahuilensis*.

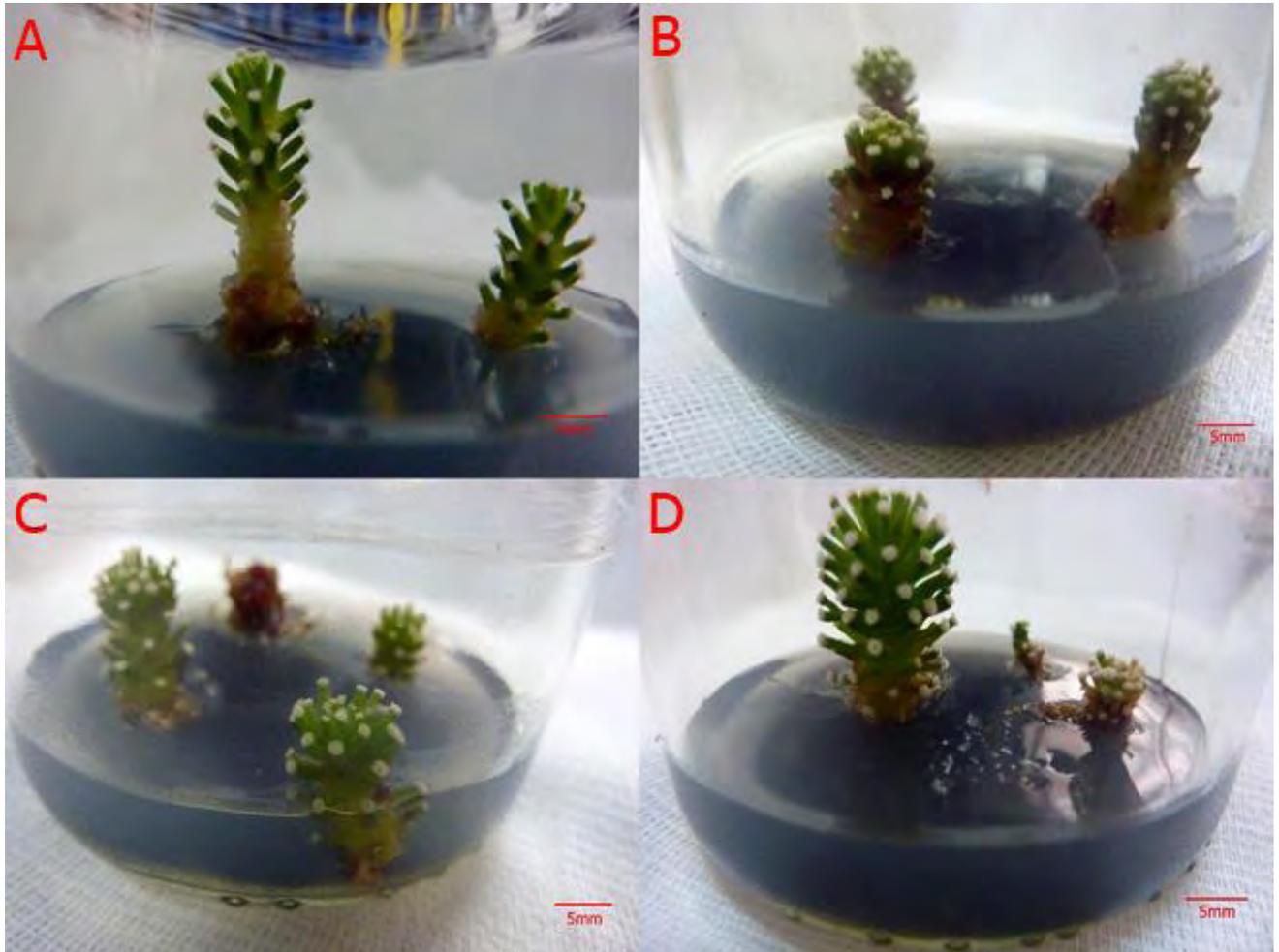


Figura 8. Explantes seleccionados de *M. luethyi* con características de tamaño similares. A) Plántula con ausencia de tubérculos en la base del tallo; B) Pigmentación rojiza en el tallo y extendiéndose a tubérculos; C) Plántulas con ausencia de raíz; D) Plántula con alta densidad de tubérculos. Fotografías de Alejandro Camargo.

Por otra parte, el 25% de los explantes apicales comenzaron a elongarse en los primeros 15 días, con una mayor separación entre los tubérculos y muchos de ellos tomaron una coloración rojiza, mientras que los explantes de raíz mantuvieron su coloración marrón o café y en muy pocos explantes las raíces presentaron una pigmentación ligeramente verde (42%) (Fig. 9). Así también, aparecieron puntos naranjas en la parte del meristemo florífero, en la axila del tubérculo. La respuesta se observó en el 8% de los explantes (Fig. 9).

El cambio de coloración en la zona de las areolas a un halo naranja fue un indicio de la activación areolar en *Pelecyphora strobiliformis* (Flores, 2004). No obstante, a diferencia de este estudio en *P. strobiliformis* esta respuesta siempre dio lugar a un brote.

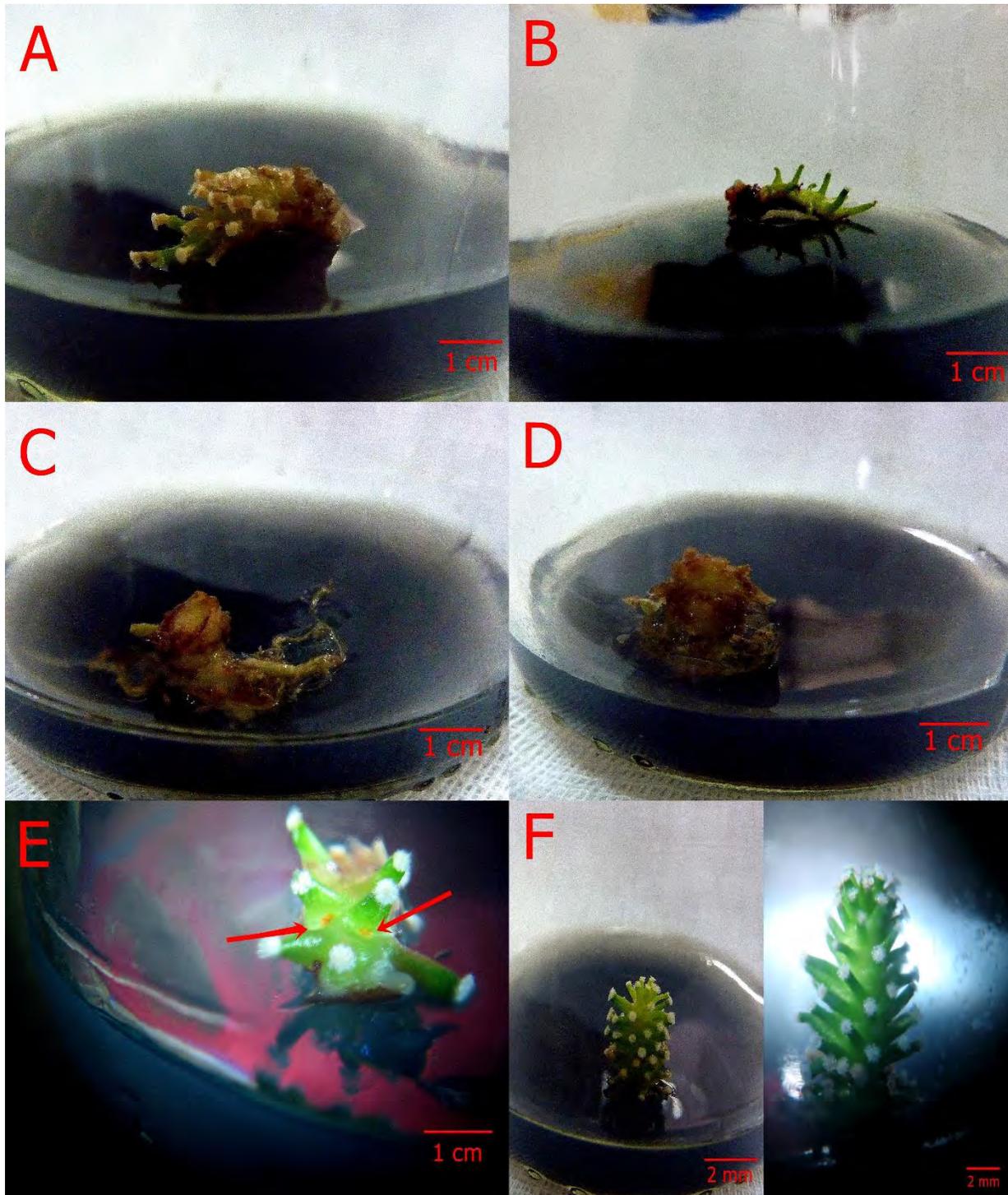
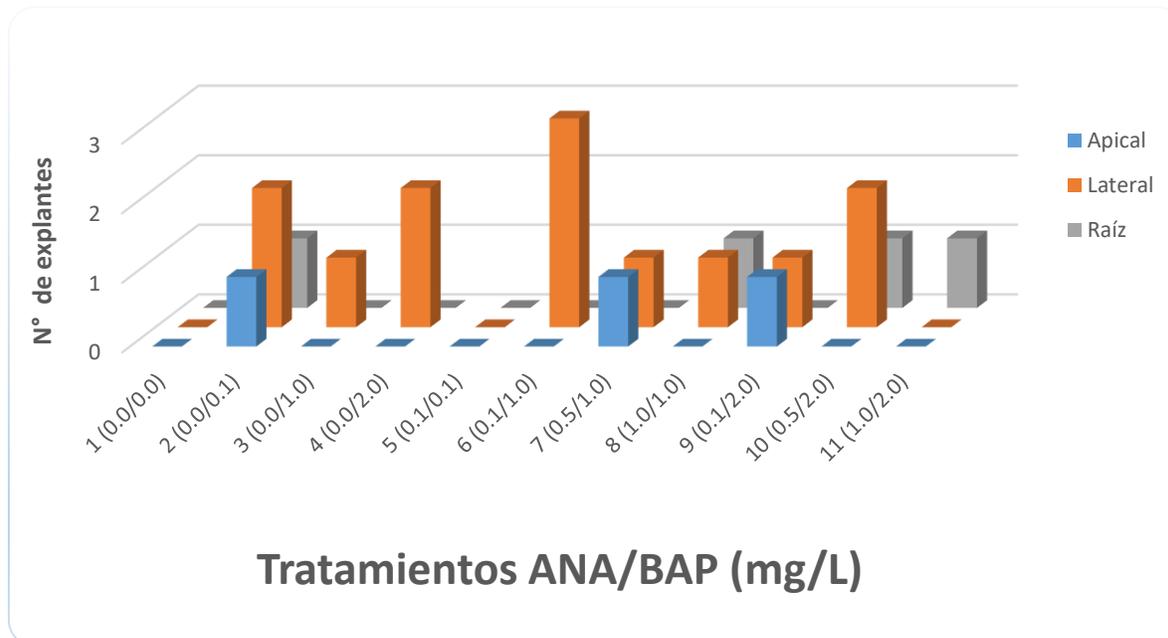


Figura 9. Plantulas *in vitro* de *Mammillaria luethyi* después de un mes de inducción. A-B) los explantes laterales se curvaron de manera concava. C-D) cambio de coloración de las raíces en explantes de raíz. E) aparición de puntos naranjas en la axila del tubérculo. F) elongación de los explantes apicales (Izq: 1 día; Der: día 30). Fotografías de Alejandro Camargo.

Formación de callo

En muy pocos explantes (18.5% del total) se observó la formación de callo (Gráfica. 1), que se manifestó principalmente en las células alrededor de las zonas de corte. El callo tuvo un crecimiento lento, fue poco proliferativo, de aspecto compacto y con coloración verde a hialina.



Gráfica 1. Proporción de explantes con respuesta a callo en los diferentes tratamientos.

Diversos trabajos han señalado las zonas del parénquima expuesto por la disección como el origen de formación de callo (Elías *et al.*, 2015; Díaz, 2007; Singh, 1999; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010; Mendoza, 2007); sin embargo, también se ha observado la desdiferenciación de los tejidos a partir de los brotes ya generados (Gómez, 2008; Choreño-Tapia *et al.*, 2002; Flores, 2004; Yáñez, 2011; Rodríguez, 2014). La poca proliferación observada en el callo generado se pudo deber a que este fue del tipo compacto, el cual por lo general tiene una menor tasa de proliferación que el callo friable. Esto lo ha constatado Oliveira *et al.* (1995) en *Cereus peruvianus*.

El callo compacto no se reportó por Gracidias *et al.* (2010) y Escobedo *et al.* (2004), quienes obtuvieron un callo friable, abundante y altamente proliferativo para esta especie. Esto resulta interesante ya que las condiciones de cultivo fueron similares, lo que indica que las plántulas con las que se trabajó en el presente estudio podrían tener un proceso de pérdida de la capacidad regenerativa.

El tipo de explante que presentó una mayor formación de callo fueron los cortes laterales, con 65% de los casos, seguido de los explantes de raíz con 20% y finalmente los cortes apicales con 15% (Fig. 10).

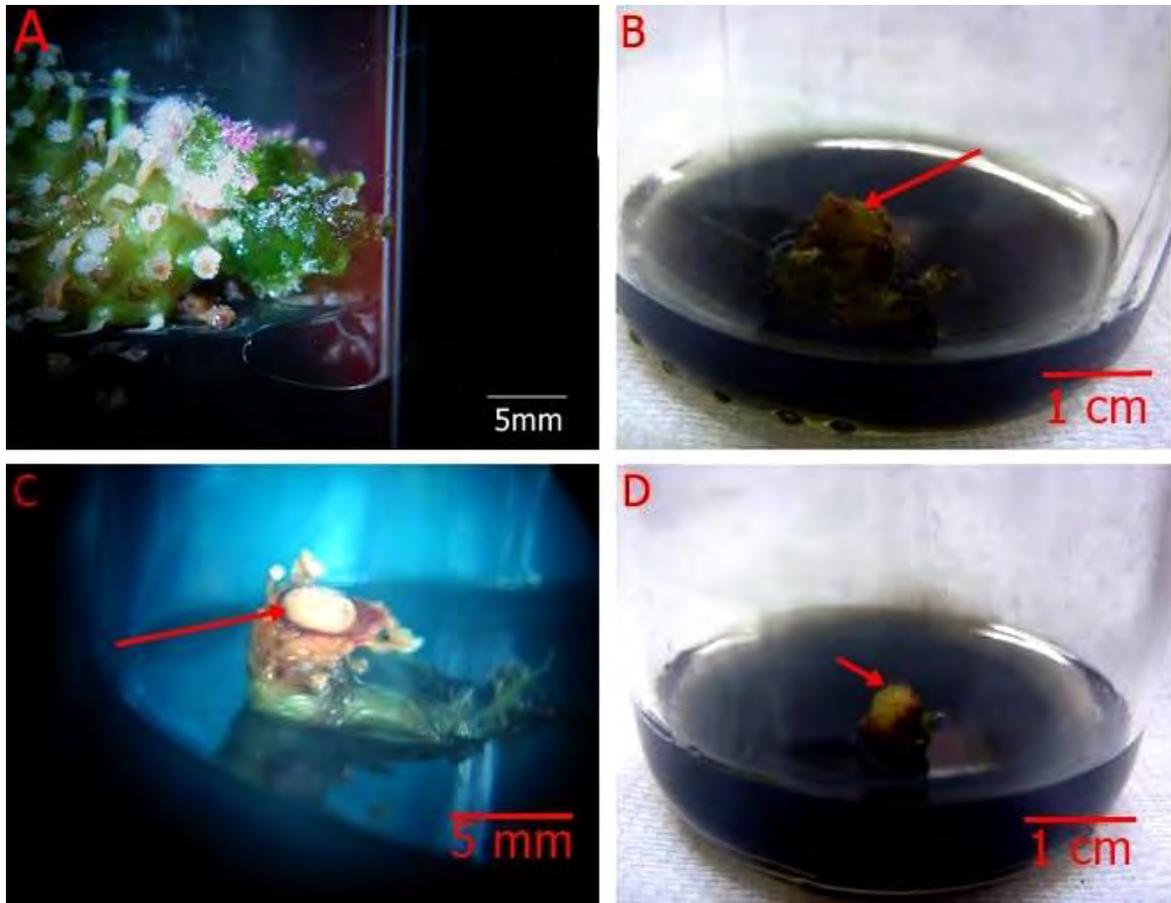


Figura 10. Presencia de callo en explantes de *M. luethyi* a un mes de inducción. A) explante apical, B, C) explantes de raíz; D) explante lateral. Fotografías de Alejandro Camargo.

Para otras especies de la Familia el tipo de explante ha sido determinante en la respuesta observada durante su cultivo. Por ejemplo, en *Mammillaria san-angelensis* la formación de callo solamente se observó en explantes laterales (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), en *M. elongata* se registraron diferentes tipos de callo dependiendo el tipo de explante (apical y lateral), destacando que los explantes laterales formaron un callo no regenerativo, contrario a los explantes apicales (Papafotiu *et al.*, 2001).

La mayor proliferación de callo en explantes laterales, puede ser una respuesta a la pérdida de la dominancia apical. Krulik (1980) menciona que cuando la sección apical es retirada cambia el balance hormonal, lo que ha sido aprovechado para producir la activación de los meristemas laterales. Este desbalance puede

provocar que los explantes laterales se vean sujetos a los reguladores adicionados exógenamente, mientras que la sección apical puede continuar generando fitohormonas de manera natural, manteniendo su equilibrio y grado de diferenciación. Este resultado se obtuvo en *Mammillaria san-angelensis*, donde Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) reportaron la formación de callo únicamente cuando la sección apical se encontró ausente. Además, en los explantes laterales, por su morfología, el área del parénquima expuesta debido al corte es mayor, lo que provoca que esta zona de corte este en contacto con el medio y sea la que exprese la proliferación celular.

Por otra parte, el callo generado se observó en prácticamente todas las combinaciones de reguladores, no así en todos los explantes. Únicamente el tratamiento 5 (0.1/0.1mg/L de ANA/BAP) y el grupo control, fueron los que presentaron pobre o nula respuesta a la formación de callo.

Este resultado es similar al reportado en otras especies donde la ausencia de RCV limita el crecimiento y proliferación celular. Por ejemplo, para *Thelocactus rinconensis* la formación de callo fue abundante, hialino y esponjoso, sin embargo, no se observó callo en el grupo control (Díaz, 2007). En el caso de *Mammillaria bombycina* Yáñez (2011) reportó la formación de callo en medio suplementado con ANA, sin embargo, esta respuesta no se presentó en el medio sin reguladores. De igual forma en *Coryphantha retusa* la formación de callo no se observó en los tratamientos ausentes de auxinas (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

Un cambio en el balance hormonal puede provocar respuestas distintas, por ejemplo, Elías *et al.* (2015) reportaron una respuesta única en la formación de callo para *Echinocereus cinerascens* en función de la concentración de los reguladores de crecimiento vegetal. Cuando el BAP o ANA se agregaron solos la coloración del callo fue verde, mientras que cuando se combinaron la pigmentación fue amarilla. Estas coloraciones están dadas por la presencia de clorofila, carotenos y flavonoides, lo que sugiere que además de las condiciones de luz y temperatura, los RCV juegan un papel importante en la síntesis, interacción y descomposición de estos pigmentos.

Es en este sentido que las auxinas y citocininas, así como la relación entre éstas se ha considerado como uno de los factores más importantes en la regulación del crecimiento y organización de los tejidos en el ambiente *in vitro* (Gaspar *et al.*, 1996).

La combinación de auxinas y citocininas más reportada para el cultivo en cactáceas es la de ANA/BAP (Houllou-Kido *et al.*, 2009; Arellano-Perusquía *et al.*, 2013; Ojeda-Zacarías *et al.*, 2010; Elías-Rocha *et al.*, 1998; Wika *et al.*, 2006). No obstante, otros reguladores han sido igualmente eficientes en la obtención de regenerantes. En el género *Mammillaria* (*M. bocasana*, *M. densispina*, *M. pectinifera*, *M. hutchisoniana*, *M. picta*) se han probado combinaciones 0-4.0mg/L de AIA con 0-10mg/L de Kin para obtener organogénesis indirecta (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007).

En la presente investigación el barrido hormonal tuvo producción de callo en todos los tratamientos, por lo que la ausencia de respuesta pudo estar más en función del explante utilizado o una pérdida de la capacidad de proliferación.

Para el segundo ensayo, en donde los explantes fueron sembrados directamente en medio líquido con puentes de papel, no se observó la formación de callo. Esto debido principalmente al agresivo proceso oxidativo registrado bajo esta condición, donde los explantes después de 15 días de la siembra se encontraron severamente oxidados.

Respuestas morfogénicas

Las respuestas regenerativas, pueden manifestarse mediante la formación de raíces o de brotes. En cuanto a la regeneración de la raíz sólo 4 explantes mostraron esta respuesta, siendo todos de origen apical (Fig. 11). La regeneración de la raíz se presentó en las combinaciones ANA/BAP (0/0, 0.1/1.0, 0.5/2.0 y 1.0/2.0mg/L) con número de tratamiento 1, 6, 10 y 11 respectivamente.

En cuanto al segundo ensayo se presentó en 2 ocasiones la formación de raíces. La primera a partir de un explante lateral y la segunda a partir de tubérculos separados al momento de hacer la disección (Fig. 12).

La regeneración de raíces ha sido reportada principalmente cuando se agregan auxinas en ausencia de citocininas (Machado y Prioli, 1996; Pérez Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Villavicencio *et al.*, 2009). En esta investigación la respuesta se observó en condiciones contrarias.

Sin embargo, para los explantes apicales es común observar la regeneración de la raíz como una respuesta primaria a la escisión de la planta madre, en donde es primordial restaurar cada órgano para tener un metabolismo funcional.

Raíces espontaneas se han observado de igual manera en *Notocactus magnificus* (De Medeiros *et al.*, 2006), *Mammillaria carmenae*, *M. herrerae*, *M. theresae*, *Echinocereus knippelianus*, *E. schmollii* (Retes-Pruneda *et al.*, 2007), *Hylocereus costaricensis* (Viñas *et al.*, 2012) y *Aporocactus flagelliformis* (Lara, 2010).

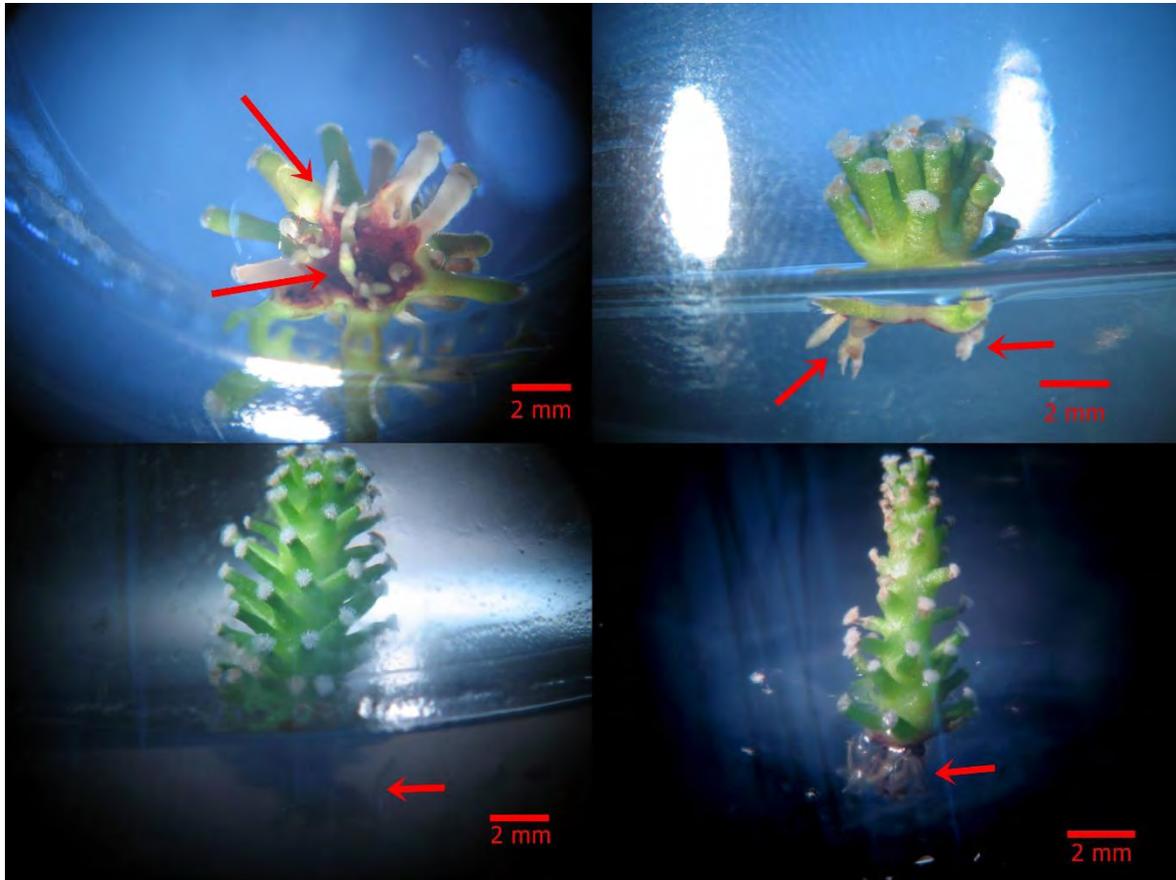


Figura 11. Morfogénesis de raíz después de 6 meses de cultivo para explantes apicales de *M. luethyi*. Fotografías de Alejandro Camargo.

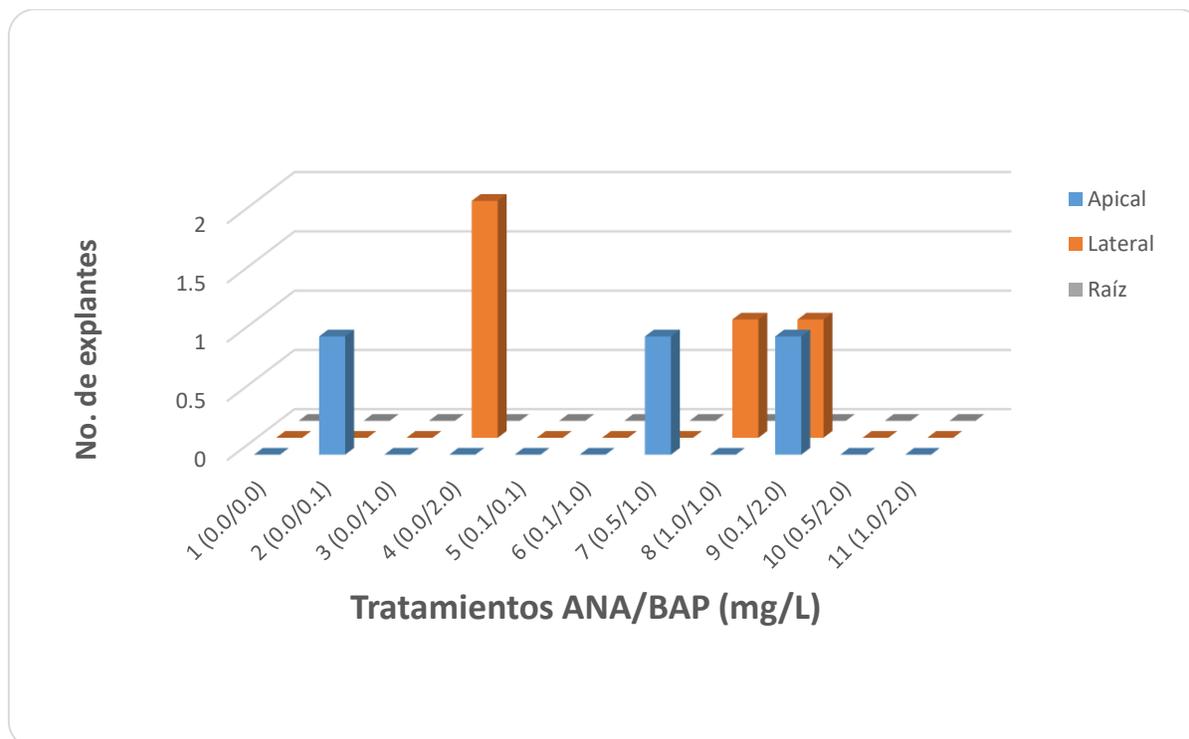


Figura 12. Desarrollo de raíces durante el ensayo en puentes de papel después de un mes de la inducción. A) Explante lateral que continuó con el desarrollo de la raíz, B) Organogénesis de raíz en tubérculo aislado. Fotografías de Alejandro Camargo.

La formación de brotes, se presentó en menos del 10% y en los tratamientos 1, 2, 4, 5, 8 y 9 (Gráfica 2). Los brotes tuvieron una morfología normal, pero escaso desarrollo. Después de 6 meses de tratamiento éstos no rebasaron los 3 mm de altura y perdieron coloración, hasta oxidarse completamente. La respuesta se observó en 5 explantes apicales y en 4 laterales (Fig. 13).

A diferencia de lo observado en este trabajo, otros estudios reportan una diferencia marcada en la respuesta morfogénica dependiendo el tipo de explante utilizado. Díaz (2007) reportó en *Theolocactus rinconensis* una mayor cantidad de explantes con respuesta a brotes en las secciones apicales que en laterales, sin embargo los brotes de explantes laterales presentaron menor porcentaje de hiperhidratación. Gómez *et al.* (2006), obtuvieron altos índices de regeneración en explantes apicales, no así en los laterales.

En el cultivo de tejidos se ha reconocido la importancia de romper la dominancia apical, para dar lugar a la activación de las yemas axilares (George *et al.*, 2008). En el caso de las cactáceas se suelen realizar cortes separando la sección apical del resto de la plántula, con lo cual se ve estimulada la producción de brotes. Al respecto Houllou-Kido *et al.* (2009) lograron un rendimiento mayor de 50% que investigaciones previas al retirar la sección apical.



Gráfica 2. Tipos de explante y su respuesta a la formación de brotes.

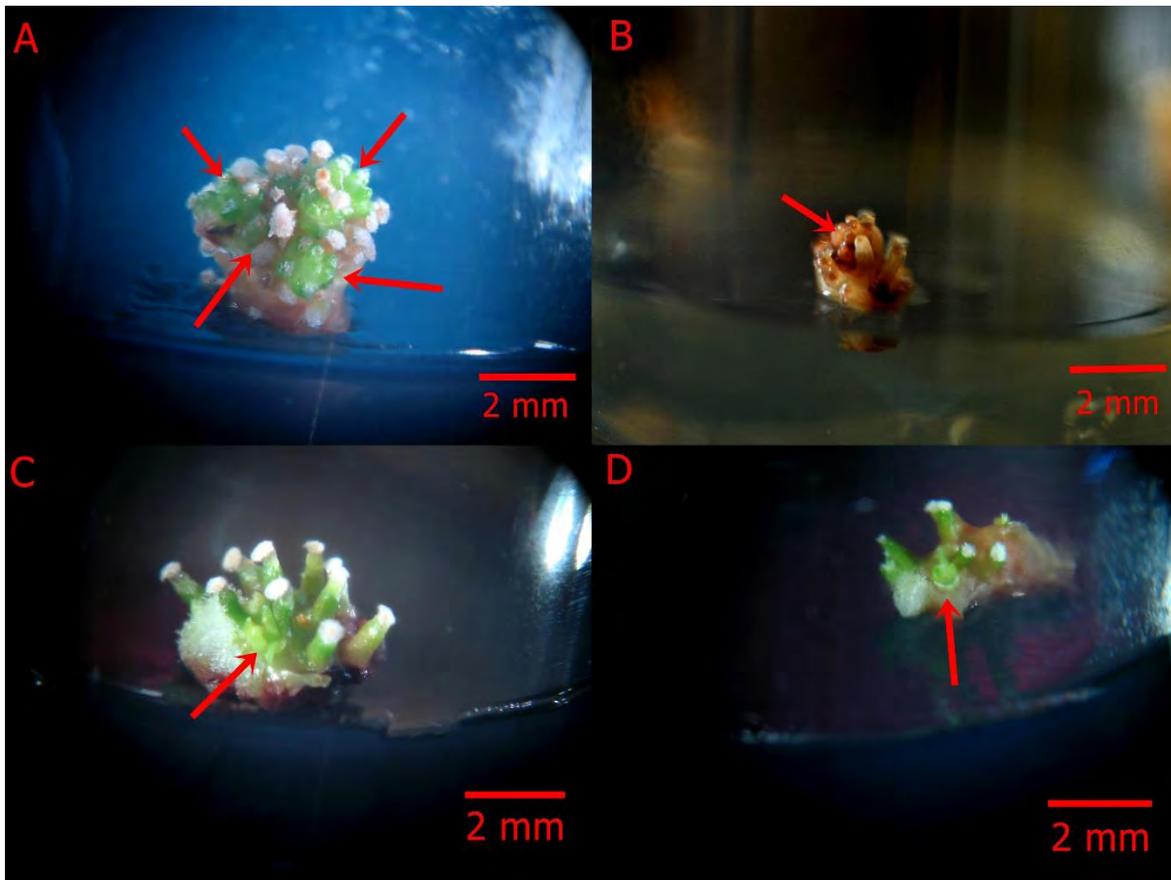


Figura 13. Brotes vía directa en explantes de *M. luethyi* a los 3 meses de la inducción. A, B) en explantes apicales; C, D) en explantes laterales. Fotografías de Alejandro Camargo.

Esto no se reflejó para esta investigación ya que de los explantes que dieron respuesta a brote, ambos tipos de explante (apical y lateral) regeneraron en proporción similar. El número de brotes por explante tampoco fue significativo; en explantes apicales se tuvo un máximo de 7 y un promedio de 2.2 brotes, mientras que en explantes laterales el número máximo de brotes fue 4 con un promedio de 2.75 brotes. La diferencia observada puede ser por la cantidad de areolas que posee cada tipo de explante, en donde la sección apical retiene una mayor densidad de areolas por superficie.

En la presente investigación se utilizó BAP y ANA como promotores de la activación areolar, con lo que se observó la formación de brotes, lo cual es indicativo que la especie mantiene su capacidad de regeneración a partir de estructuras como las areolas. No obstante, el poco número de explantes con esta respuesta, el lento crecimiento que se observó y los altos porcentajes de oxidación en ambos ensayos, denotan que existe un estricto control en los mecanismos que mantienen la

integridad de la planta y el fino balance que se requiere para llevar a cabo la inducción de regenerantes.

Lo reportado para otras especies indica además que las concentraciones son específicas para cada una de las especies estudiadas, ya que bajo un barrido hormonal similar se han registrado una mayor cantidad de regenerantes. En *Cephalocereus apicicephalum*, se probó ANA (0, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0mg/L) con BAP (0, 1.0, 2.0 y 3.0mg/L), con un máximo de brotes a 3mg/L de BAP y un promedio de 7 brotes por explante (Saucedo, 2006). En *Echinocactus grusonii* se observó una alta proliferación, con un promedio de 7 brotes por explante y un total de 659 brotes al final del estudio (Rodríguez, 2006). Para *Hylocereus purpusii* se obtuvo un promedio de 8.8 brotes por explante con concentraciones de 1.0-2.5mg/L de BAP (Feria et al., 2012). Por su parte Yáñez (2011) mencionó que su mejor tratamiento hormonal para *Mammillaria bombycina* fue de 2.0/0.5 BAP/ANA con 8 brotes por explante.

En otras especies aún en ausencia de reguladores de crecimiento vegetal se ha observado una respuesta organogénica. Elías et al. (2015), reportaron formación de brotes en el grupo control. También Ruvalcaba-Ruiz et al. (2010), reportaron brotes directos en *Coryphantha retusa* con ausencia de reguladores. Por otra parte, Durazo et al. (2012) tuvieron una buena respuesta en el grupo control con 3 a 9 brotes por explante para *Echinocactus grusonii* y *Ferocactus cylindraceus*. Lo anterior indica que en estas especies el alto potencial organogénico se mantiene aún en ausencia de los estímulos de los reguladores de crecimiento vegetal,

En la presente investigación el balance hormonal que favoreció la producción de brotes se inclinó hacia una alta concentración de citocininas y una baja o nula de auxinas, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura. No obstante, se contrapone a lo reportado por Yáñez (2011) o Rubluo et al. (2002), quienes reportaron la formación de brotes en *Mammillaria bombycina* o *M. san-angelensis* respectivamente, cultivadas únicamente con auxinas.

Del mismo modo Flores (2004), observó en *Pelecyphora strobiliformis* un rendimiento óptimo en una combinación de 0.5/0.0mg/L de ANA/BAP con un promedio de 24.5 brotes por explante. Esto hace evidente que las condiciones de cultivo (reguladores de crecimiento vegetal, composición del medio, estado fisiológico) son particulares para cada especie.

En este estudio también se resaltó la baja proliferación obtenida en las condiciones ensayadas, lo cual reporta también Escobedo et al., 2004, quienes obtuvieron incluso un promedio menor para esta especie en la formación de brotes con 2.16 brotes en su mejor tratamiento (1mg/L de BAP). Sin embargo, esto contrasta con lo obtenido por Gracidas et al. (2010) quienes obtuvieron un promedio de 13.19 brotes por explante.

Se ha sugerido que cuando los tejidos permanecen largo tiempo en el ambiente *in vitro* pierden de manera gradual su capacidad de proliferación (Rubluo et al., 2002). Las plántulas con las que se trabajó, fueron producto de la investigación de Gracidas et al. (2010), desafortunadamente se desconoce el número de ciclos que

tuvieron en el ambiente *in vitro*, por lo cual la pérdida de la capacidad regenerativa puede ser un factor para la escasa producción de brotes expresada en este estudio.

El origen de los brotes fue por organogénesis directa, a través de la activación areolar. En este sentido los primeros reportes de cultivo de tejidos vegetales (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Sing, 1999) incluyeron de manera recurrente la fase de callo como una fase intermedia en la propagación de nuevas plántulas y sólo más recientemente se ha logrado inducir la activación de los meristemas evitando con ello la organogénesis indirecta, con lo que se asegura una mayor estabilidad genética (Giusti *et al.*, 2002).

Todos los brotes se formaron de la axila del tubérculo, donde se localiza el meristemo florífero. Se ha reconocido que las areolas son estructuras con una alta capacidad para generar estructuras nuevas (flores, brotes, espinas, tricomas, lana). Durante el cultivo de tejidos vegetales se ha observado que se mantiene esta capacidad y que a su vez puede ser inducida mediante el control de diversos factores, entre ellos el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal (Mauseth, 1976). La respuesta se evidenció por la aparición de círculos naranjas en la zona meristemática y posteriormente se observaron protuberancias o abultamientos.

De manera similar se describió la activación areolar en *Aporocactus flagelliformis* como un cambio de coloración entre la zona de las areolas que se tornaron rojizas (Lara, 2010). Para *Stenocereus stellatus* la mayoría de los explantes que formaron brotes se distinguieron por tener pequeñas protuberancias en la parte de las areolas, después de 11 días de iniciado el cultivo (Martínez *et al.*, 2011).

En el género *Mammillaria* se ha observado la activación areolar mediante la inducción con BAP. En *M. carmenae* la concentración óptima fue de 2mg/L con 7.7 brotes por explante, mientras que para *M. herrerae* se obtuvo un máximo de 8.1 brotes por explante a una concentración de 0.5mg/L de BAP (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

La formación de brotes de manera directa reportada en el presente estudio es un avance en la propagación de la especie, ya que los trabajos de Escobedo *et al.* (2004) y Gracidas *et al.* (2010) reportan únicamente la organogénesis indirecta. No obstante, las condiciones de cultivo del presente ensayo son similares a las descritas por Gracidas *et al.* (2010), por lo que la diferente respuesta en la vía de organogénesis puede estar más relacionada por la fisiología del explante, que por los factores hormonales.

Supervivencia y oxidación

La supervivencia fue baja debido a los procesos de oxidación. Se obtuvieron porcentajes de supervivencia de 12 % en medio sólido y de 0% en puentes de

papel. Al inicio del cultivo se observó una fuerte exudación de compuestos fenólicos que no se pudo controlar con los antioxidantes agregados al medio. Después de los exudados, algunos explantes se tornaron rojos, probablemente por el estrés del ambiente *in vitro* y la alta cantidad de betalainas presentes. Transcurridos dos meses, en algunos explantes se observó una pérdida de la coloración, que en algunos casos se extendió a todo el explante.

Llama la atención que además de la muerte del explante inicial, los brotes generados y el callo que se logró formar también se oxidó totalmente y pareció anularse su capacidad de regeneración. Se observó además una respuesta distinta cuando los explantes se cultivaron en medio sólido o en medio líquido. Cuando fueron cultivados en medio sólido se presentó una pérdida gradual de la coloración verde del explante, en algunos casos primero se torna rojizo y conforme transcurrió el tiempo o se transfirió el explante a medio nuevo éste se volvió blanquecino a beige (Fig. 14). Los explantes cultivados en medio líquido con puentes de papel, se observó una fuerte exudación de sustancias fenólicas que pigmentaron el papel filtro a las pocas horas de la siembra. Durante las primeras semanas se observó esta fuerte exudación, que tiñó el papel filtro, seguido de un cambio de coloración del explante a una pigmentación rojiza, que después de varias semanas llevó a la pérdida gradual de la coloración (Fig. 14).

Algunas plantas contienen grandes cantidades de sustancias fenólicas, que se producen en presencia de estrés, de alguna herida o daño (George *et al.*, 2008), estos fenoles al entrar en contacto con el aire son oxidados (Laukkanen *et al.*, 1999). Cuando los fenoles son oxidados se generan otras moléculas llamadas quinonas, las cuales son altamente reactivas en el ambiente *in vitro* (Titov *et al.*, 2006); su presencia tiene como consecuencia el oscurecimiento de los tejidos y en casos más extremos la necrosis celular (Preece y Compton, 1991).

En la familia Cactaceae se ha registrado eventos similares de una fuerte oxidación. Por ejemplo, en *Backebergia militaris* se observó una oxidación letal al transferir plántulas germinadas *in vitro* a un medio de inducción con TDZ, a lo que Fernández (2014), atribuye que los cambios fisiológicos llevan a la necrosis de los tejidos. De igual forma en *Echinocereus pentalophus* se presentó una fuerte oxidación en los brotes generados bajo una combinación de ANA/BAP, los cuales murieron después de ser subcultivados (Saucedo, 2006).

Por otra parte, Flores (2004), reportó una oxidación letal en plántulas de *Pelecyphora strobiliformis*, lo cual fue adjudicado al tipo de explante, ya que al cambiar la manera de seccionar las plántulas logró detener la severidad de este proceso y observar la regeneración.

Se registraron dos periodos de oxidación, el primero durante el corte e inducción de los explantes, en donde algunos explantes se mantuvieron verdes a pesar de la exudación de fenoles. El segundo proceso oxidativo se registro después de 3 meses iniciado el cultivo, donde los explantes se oscurecieron o bien perdieron la coloración.

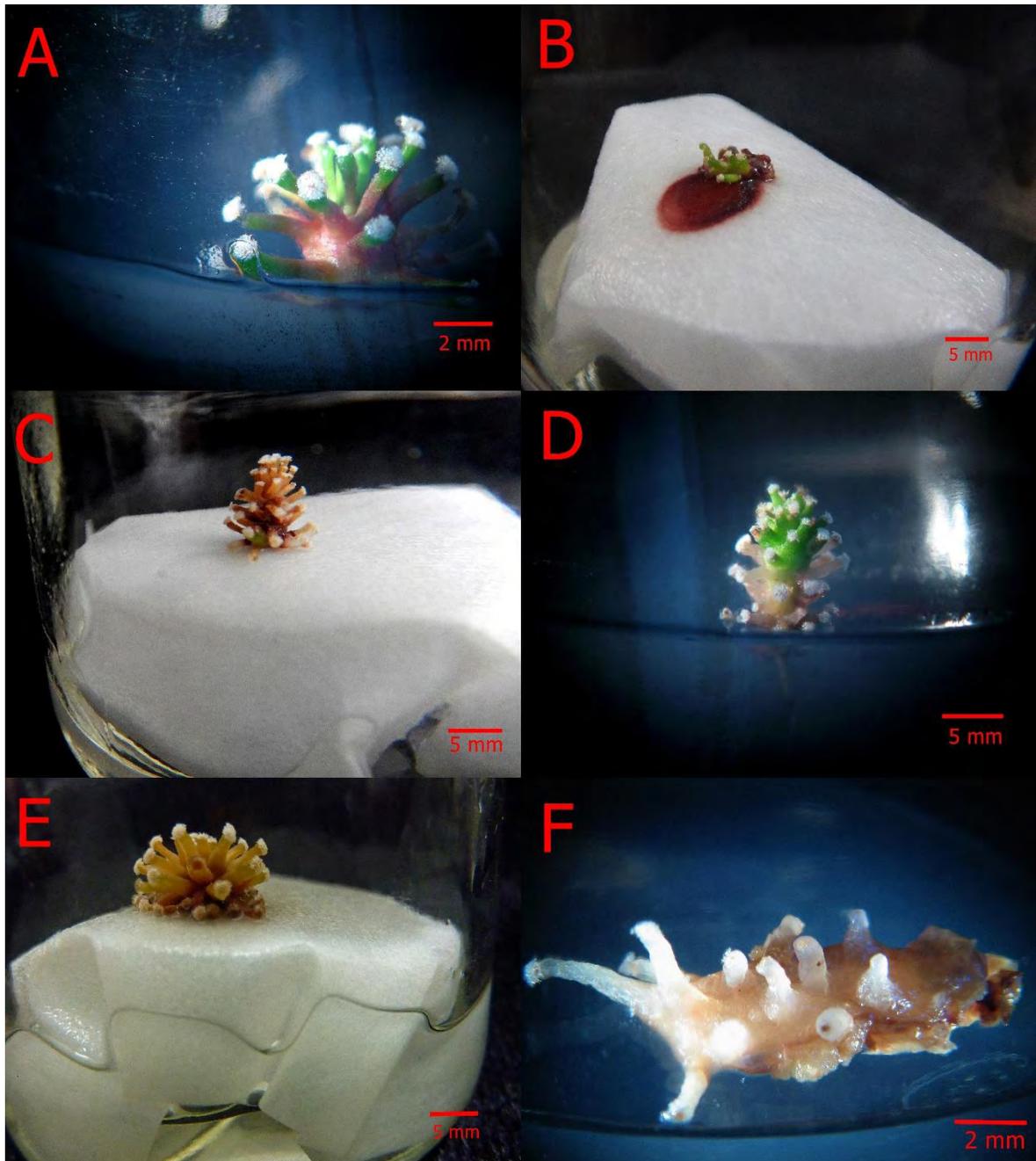


Figura 14. Condición de oxidación letal para explantes de *M. luethyi*. La oxidación se presentó: como un cambio de coloración del explante (A), exudación de compuestos fenólicos (B), pérdida gradual de coloración (C-E), oscurecimiento del explante (C) o pérdida total de la coloración (F). Fotografías de Alejandro Camargo.

Al respecto Zaid (1987), menciona que la oxidación en los cultivos puede tener dos fases, una durante los 10 primeros días iniciada la inducción la cual está dada por los cambios fisiológicos que resultan de la escisión de la planta madre; un segundo periodo de oxidación puede darse después de 3 semanas y es atribuido a la senescencia de los tejidos, el cual es generalmente irreversible.

Para reducir los niveles de oxidación se utilizaron los puentes de papel, esta estrategia fue aplicada tanto en explantes que ya presentaban un daño visible, como en aquellos en donde apenas se iniciaba su cultivo. En el caso de los explantes en puentes de papel no se observó esta parcial recuperación del proceso oxidativo, además de que este proceso se manifestó con mayor severidad en los puentes de papel. Al final del ensayo todos los explantes presentaron 100% de oxidación; por su parte en medio sólido 88% presentó una oxidación severa, 5% media y 7% ligera al final del ensayo (Tabla 10)

Tabla 10. Condición de oxidación en los diferentes tipos de explante.

| Tx ANA/BAP (mg/L) | Ligero | | | Medio | | | Severo | | | |
|----------------------|--------------------|-------|---------|-------|-------|---------|--------|-------|---------|------|
| | Grado de oxidación | Ápice | Lateral | Raíz | Ápice | Lateral | Raíz | Ápice | Lateral | Raíz |
| 1 (0.0/0.0) | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 2 |
| 2 (0.0/0.1) | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 1 |
| 3 (0.0/1.0) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 | 2 |
| 4 (0.0/2.0) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 1 |
| 5 (0.1/0.1) | | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 4 | 1 |
| 6 (0.1/1.0) | | 4 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 8 | 1 |
| 7 (0.5/1.0) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| 8 (1.0/1.0) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 1 |
| 9 (0.1/2.0) | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 1 |
| 10 (0.5/2.0) | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 |
| 11 (1.0/2.0) | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 2 |

En general, la oxidación se presenta en varias especies de la familia Cactaceae, *Mammillaria coahuilensis* y *Echinocactus platyacanthus* (Manzo, 2010), *Mammillaria prolifera* (Minocha y Mehra, 1974), *Coryphantha elephantidens* (Sing, 1999). De las estrategias utilizadas para mitigar esta condición se encuentra el cultivo en puentes de papel, reportado para *Echinocactus grusonii* (Soto, 2013), *Backebergia militaris* (Fernández, 2014) y *M. hernandezii* (Pérez, 2015).

Las posibles causas de una baja supervivencia son el número de ciclos o subcultivos, en los cuales la capacidad regenerativa puede ir en detrimento (Rubluo et al., 2002). En el presente estudio el número de subcultivos de las plántulas

recibidas fue desconocido y mostraron un bajo nivel de proliferación. Otra causa de la agresividad de la oxidación en esta especie es lo atribuido por Gracidias *et al.* (2010) quienes sugirieron que el tamaño del explante tiene un efecto sobre los procesos oxidativos, ya que en *Mammillaria luethyi* obtuvieron 66.66% de oxidación en los tejidos. Esto concuerda con la presente investigación, ya que se observó una mayor severidad de la oxidación en explantes más pequeños.

Plantas *ex vitro*

Establecimiento aséptico

En total se sometieron a desinfección 8 plantas de *Mammillaria luethyi* en los cuatro tratamientos propuestos. De manera general, ninguno de los tratamientos resultó 100% eficaz. Para esta investigación el tipo de explante fue determinante en la facilidad para desinfectar superficialmente. En el caso de tejidos adultos como los tallos, se presentó un alto grado de contaminación, por lo que se tuvieron que someter en diferentes ocasiones a diversos agentes para eliminar a los microorganismos. En el caso de las flores que son tejidos ontogénicamente más recientes que los tallos no presentaron contaminación, mientras que las semillas a pesar de que se presentó contaminación fue más sencillo erradicar a los patógenos con una segunda desinfección.

En el tratamiento uno (Tabla 7) se sometieron dos plantas, las cuales se asperjaron previamente con fungicida. Se partió de la premisa que una mayor cantidad de agentes desinfectantes debería resultar en un grado de asepsia mayor, sin embargo, no resultó así ya que en las dos plantas que se trataron, el 100% se contaminó con hongos.

Aplicar una mayor cantidad de agentes desinfectantes o bien incrementar los tiempos de exposición no es una garantía para establecer asépticamente los tejidos al medio *in vitro*. Por ejemplo, Francisco (2012) utilizó agrimicin al 2% más hipoclorito de sodio al 50% para la desinfección de semillas de *Coryphantha pycnacantha*, a pesar de ello se presentó 8.8% de contaminación. De igual forma Azcona (2009), desinfectó semillas de *Melocactus curvispinus* aplicando agrimicin al 1%, con lo que registró 80% de establecimiento.

En el caso de plantas adultas, la situación es usualmente más crítica, pues los tejidos pueden sufrir daños por la agresividad del agente desinfectante utilizado, además de que la planta tiene mayor carga de microorganismos, algunos de los cuales pueden ser endógenos. En este sentido Pérez (2015) ha recomendado usar fungicidas como un pretratamiento en el establecimiento de plantas adultas. Lara (2010) utilizó captan al 3% en explantes de *Aporocactus flagelliformis*, con 87% de establecimiento aséptico. Por otro lado, Fernández (2014) utilizó Benomil y Captan en la desinfección de semillas y plantas adultas de *Backebergia militaris*, con

porcentajes de establecimiento del 98.75% en semillas y un máximo de 70% en plantas adultas.

Con la finalidad de erradicar la contaminación de las plantas, se realizaron nuevos eventos de desinfección, con modificaciones. Se utilizó Benomil®, que es un antimicótico con acción al contacto y que además tiene efecto residual; se dejaron los explantes en una solución de 1g/L por 24 horas, después de lo cual se pasaron a medio líquido. Se tuvieron en observación, no obstante, después de 24 horas el micelio se regeneró, por lo que se sacaron de los frascos y se lavaron a chorro de agua para retirar en la medida de lo posible todo el hongo que se encontraba en la superficie del explante. Posteriormente se dejaron en yodo (1mL/L por 3h) y se transfirieron a una solución de Terbinafina® (250mg/L por 6h), antimicótico de contacto que actúa inhibiendo la formación de la membrana celular en hongos. Transcurridas las 6 horas se enjuagaron en agua destilada estéril con antioxidantes (ácido cítrico-ascórbico 150mg/L), desafortunadamente estos agentes desinfectantes no lograron erradicar al hongo (Fig. 15).

En este estudio el uso de fungicidas por aspersión a manera de pretratamiento no resultó eficaz, por lo que se modificó el procedimiento y se aplicó el fungicida en conjunto con el procedimiento de desinfección. El segundo método de desinfección consistió en mantener a las plantas madre en una solución de Benomil® (1g/L) por 24 horas, después de lo cual se trataron con una solución de agua jabonosa (10% por 5 minutos), etanol (70% por 1 minuto), Soluvet® (2% por 15 minutos) y Cloro comercial (20% durante 20 minutos); además se diseccionaron en distintos fragmentos para evitar la contaminación de toda la planta madre. Se desinfectaron tres plantas con un total de 18 explantes. El porcentaje de contaminación fue del 33.33%.

Los explantes contaminados fueron tratados nuevamente para tratar de erradicar al microorganismo. Se realizó una inmersión de los explantes en una solución de Terbinafina® (600mg/L) más Ceftazidina (antibiótico) (1.2mL/L) durante 24 horas. La persistencia del hongo en esta segunda desinfección, obligo a que se volviera a exponer el explante a un tercer procedimiento; se dio un mayor periodo de exposición (72h) en las mismas concentraciones que el procedimiento previo, luego de lo cual se transfirió a cloro (20%) más Tween (1 gota) durante 20 minutos, con lo cual se logró desinfectar 4 de los 6 explantes contaminados; sin embargo, la severa oxidación generada en los procedimientos de desinfección impidió la supervivencia de los mismos (Fig. 15).

La literatura se muestra escasa en reportes donde se dé seguimiento a plantas contaminadas. En *Mammillaria hernandezii* Pérez (2015) realizó un segundo evento de desinfección a plantas de invernadero contaminadas, sin embargo, se presentó necrosis y la muerte de los tejidos. En esta investigación se logró erradicar a los microorganismos pero no se lograron establecer los explantes debido a la necrosis de los tejidos.

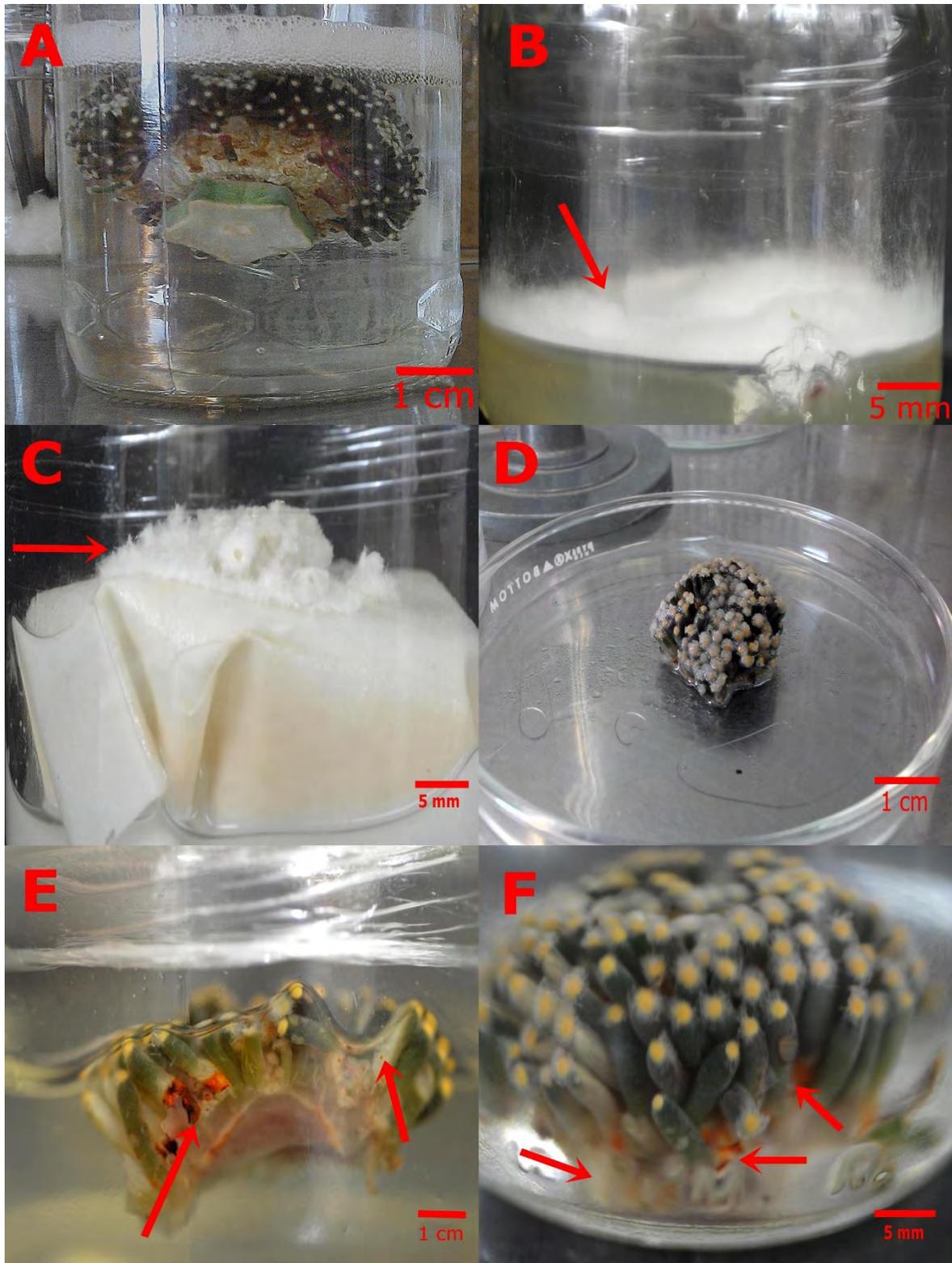


Figura 15. Proceso de establecimiento aséptico. A) Planta madre en una solución de cloro. B-C) Contaminación de explantes por hongos. D) Nuevos eventos de desinfección de plantas contaminadas. E-F) Plantas esterilizadas superficialmente después de una segunda desinfección, flechas señalan signos de estrés y daño a los tejidos. Fotografías de Alejandro Camargo.

En los ensayos previamente descritos se observó que la adición de antimicóticos no es determinante en el proceso de desinfección; por otra parte, la exposición prolongada a estos fungicidas puede derivar en una severa oxidación perdiendo su capacidad de regeneración. Los tratamientos tres y cuatro se probaron con la finalidad de evitar el uso de fungicidas durante el establecimiento *in vitro* de plantas madre y de esta manera evaluar su importancia de incluirlos en los protocolos de desinfección.

En este sentido se propuso incorporar el Soluvet®, que es una solución desinfectante para con efecto bactericida, viricida, fungicida y esporicida. El producto es utilizado en programas de Bioseguridad, con grado alimenticio, de efecto inmediato y residual, estable en un intervalo amplio de temperatura (-5°C a 100°C) y pH neutro. Dado que el producto no es irritante a la piel o a las mucosas, se realizaron ensayos previos con ejemplares de *Echinopsis sp.* para observar su eficiencia y el grado de daño causado a los tejidos (datos no publicados). Con los resultados obtenidos se decidió incorporarlo de manera conjunta al protocolo de desinfección.

En el método de desinfección tres se trataron dos plantas, con 51 explantes en total. Bajo este protocolo también se desinfectó un explante de flor, con una sección de tallo adyacente al botón. El porcentaje de contaminación fue de 49% en las plantas adultas y de 0% en el caso de la sección de flor. Con objeto de asegurar el establecimiento en ambas especies, se realizaron cambios al protocolo de desinfección tres, que consistió en incrementar la concentración de Soluvet® a 10% y aumentar el tiempo de exposición a cloro a 25 minutos, adicionando 2 gotas de Tween® 20. Con este protocolo bajo se trató una planta con un total de 28 explantes. El porcentaje de contaminación para el protocolo 4 fue de 42%, con contaminación de 12 explantes de 28 para *M. luethyi*.

El incremento en los tiempos de exposición resultó generalmente en un mayor grado de asepsia, lo cual se corroboró en esta investigación, aunque sin resultados concluyentes. Otros autores han variado las concentraciones y tiempos de exposición. Al respecto Rodríguez *et al.* (2013) incrementaron la exposición a bicloruro de mercurio de 5 a 15 minutos en explantes de plantas adultas de *Escobaria cubensis*, logrando reducir en 30% los niveles de contaminación.

En *Ariocarpus fissuratus* Medel-Narváez *et al.* (2001) incrementaron la concentración del hipoclorito de sodio al 100%, con lo que redujeron considerablemente la contaminación. De manera similar Feria *et al.* (2012), reportaron una variación en los tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos) y la concentración del hipoclorito de sodio (1, 1.5 y 2%) para explantes de *Hylocereus purpusii*, en donde el mejor resultado se observó a bajas concentraciones, con tiempos de exposición intermedios.

Para *Mammillaria luethyi* Gracidas *et al.* (2010), reportaron un porcentaje de contaminación de 72.22%, por lo que sugieren utilizar plantas en injerto. Con la presente investigación y siguiendo las recomendaciones de Gracidas *et al.* (2010), se lograron reducir los porcentajes de contaminación considerablemente. Con el

uso de fungicidas se logra un mayor nivel de asepsia cuando es incorporado al proceso de desinfección, sin embargo, tiene como consecuencia un mayor grado de oxidación. En cambio, cuando se utiliza Soluvel® los porcentajes de contaminación incrementan, pero la oxidación de los explantes se reduce considerablemente. Por consiguiente, para esta especie es preferible incrementar los tiempos de exposición de hipoclorito de sodio y de Soluvel® que el uso de fungicidas.

Ensayos a baja concentración de RCV

Formación de callo

A los 7 días de iniciada la inducción con ANA/BAP (0.0/1.0mg/L) se observó una hidratación de los tejidos, lo cual llevó a la formación de callo. Esta repuesta se presentó en todos los explantes (12 en total) que se trataron. El callo que se formó era de una apariencia friable, abundante y altamente proliferativo, el cual se disgregaba al contacto con el instrumental. La coloración que presentó fue diversa, en su mayoría verde con algunas zonas hialinas y menos frecuente una pigmentación rosa (Fig. 16).

En la familia Cactaceae se ha observado que las condiciones de incubación tienen un efecto en el tipo de callo generado. Tal es el caso de *Mammillaria prolifera*, en la que se registraron diferentes tipos de callo al parecer asociados a la concentración de sales en el medio MS. Cuando se redujo a menos de 40% de la concentración original el callo se tornó rosa, mientras que a concentraciones más altas la pigmentación fue amarilla (Minocha y Mehra, 1974).

Gracias *et al.*, 2010, obtuvieron callo de *Mammillaria luethyi* a partir de BAP (1-2.5 mg/L), sin embargo, no precisan el tipo de callo formado. Por otra parte, Escobedo *et al.* (2004) obtuvieron callo con 2,4-D, pero tampoco mencionan las características del callo formado.

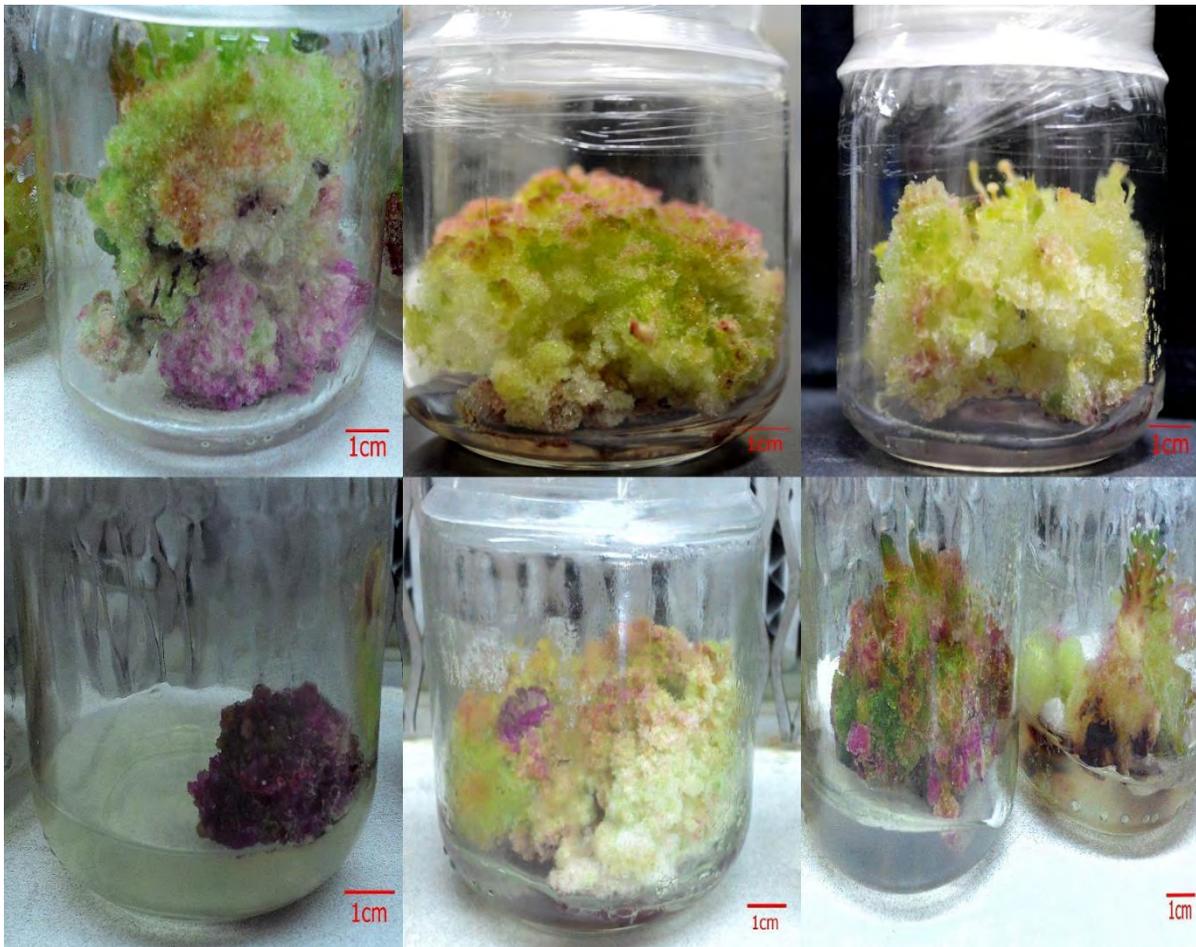


Figura 16. Coloración y tipo de callo generado a partir de plantas de invernadero de *Mammillaria luethyi* establecidas *in vitro*. Fotografías de Alejandro Camargo.

Respuestas morfogénicas

Derivado del periodo de inducción y la formación de callo, se observó el desarrollo de brotes vía organogénesis indirecta. De los 12 explantes cultivados en este ensayo, 10 generaron brotes con un máximo de 11 brotes por explante y un mínimo de 1. Todos estos brotes generados tenían una morfología normal; sin embargo, la dimensión y el crecimiento que presentaron a lo largo del estudio fueron variables.

Los primeros reportes del cultivo *in vitro* en cactáceas hacen mención del uso de altas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (Minocha y Mehra, 1974; Clayton *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1991), muchos de los cuales no lograron la regeneración. A bajas concentraciones de reguladores esta reportado para *Mammillaria bombycina* un promedio de 29 brotes por explante con 0.1/1.0 de ABA-BAP (Mancilla, 2014). De igual forma Pérez (2011) reporta una eficiencia máxima en la producción de brotes a las mismas concentraciones de reguladores

de crecimiento vegetal (ANA/BAP), con un promedio de 43 brotes por explante para *Hylocereus megalanthus*.

No obstante, la concentración de los reguladores de crecimiento vegetal es un aspecto muy variable de especie a especie. En la aplicación del juego hormonal de ANA/BAP se ha notado que las respuestas regenerativas tienen un comportamiento tipo gaussiano, donde existe un pico y a concentraciones distintas la eficiencia de la fitohormona aplicada disminuye.

Este comportamiento lo reportó Montalvo *et al.* (2004) en *Pilosocereus sp.* donde se observó un incremento en la generación de brotes proporcional al aumento de reguladores de crecimiento BAP (0,1, 2 y 3mg/L), con un máximo de 11.85 brotes por explante en una concentración de 3mg/L. Sin embargo, se observó que al incrementar la concentración, los brotes disminuyeron su calidad, mientras que en ausencia de BAP la morfogénesis fue escasa, por lo que la mejor concentración fue de 1mg/L, con brotes de calidad y en mayor proporción que el grupo control. En *Escobaria cubensis* se registraron brotes son de mayor calidad y con mejor desarrollo en concentraciones intermedias de BAP (1, 2, 3 y 4mg/L) (Rodríguez *et al.* 2013).

En este estudio se obtuvo la formación de brotes por vía indirecta a una concentración de 1mg/L de BAP en ausencia de auxinas, lo cual es contrastante con el ensayo de las plántulas que se encontraban bajo condiciones *in vitro*, en donde se presentó una pobre proliferación y regeneración. Así también la capacidad regenerativa expresada en este ensayo es sugerente de la pérdida de proliferación después de largos ciclos de cultivo en el ambiente *in vitro*. Por otra parte, se demostró que las bajas concentraciones de reguladores en esta especie fueron parte importante para la formación de callo y de brotes por organogénesis indirecta, lo que también fue registrado por Gracidas *et al.* (2010).

El primer indicio de la formación de brotes fue un cambio en la coloración del callo, generalmente expresado por una coloración verde más intenso, formando zonas circulares de las cuales se comenzaban a observar la diferenciación del tejido. Después de que se registraba el desarrollo del brote incipiente, comenzaba la formación de nuevos tubérculos y la elongación del tallo (Fig. 17). En total se formaron 59 brotes en un periodo de 7 meses y un promedio de 5.9 brotes por explante.

La formación de estructuras que preceden a tejidos diferenciados a partir de callo han sido denominadas meristemoides, las cuales tienen una apariencia nodular (Roca y Mroginski, 1991; Hartmann *et al.*, 1997). Tapia (2010) describe la aparición de estas estructuras en *Cephalocereus senilis* a los 14 días de cultivo. De manera similar la organogénesis en *Turbinicarpus laui* fue con previa formación de callo, en donde se observó que ciertas regiones se volvieron más densas y oscuras previo a la formación de un brote (Mata *et al.*, 2001). Para esta especie la formación de meristemoides se formó después de 20 semanas de iniciado el cultivo.

El número de brotes en este ensayo fue mayor que lo reportado por Escobedo *et al.* (2004), quienes obtuvieron un promedio de 2.16 brotes por explante a 1mg/L de BAP, mientras que a 3mg/L la eficiencia se redujo a 1.8 brotes por explante. Por otra parte, Gracidas *et al.* (2010) obtuvieron para la misma especie 12 brotes por vía indirecta a partir de un explante, de cinco explantes en total. De estos brotes generados se realizó una segunda inducción con ANA (0.5mg/L) y BAP (1.0-3.5mg/L), con lo que obtuvieron 270 brotes por organogénesis indirecta después de 12 meses de cultivo, mientras que en este estudio el total de brotes fue de 59 brotes después de 9 meses de cultivo.

Por lo anterior se puede considerar que los datos reportados en esta investigación superan lo reportado por los trabajos previos para la especie; además de que la concentración de reguladores empleados fue menor, lo que podría prevenir eventos de variación somaclonal. Estos resultados pueden ser atribuidos al tipo de explante empleado, ya que se utilizaron plantas vigorosas y explantes de tallo, contrario a los explantes utilizados por Escobedo *et al.* (2004).

Al final del ensayo se individualizaron 5 brotes de tamaño mayor a 2cm; no desarrollaron raíces debido al crecimiento lento de los regenerantes. Retes-Pruneda *et al.* (2007) han reportado un crecimiento lento en el ambiente *in vitro* para el género *Mammillaria*. En el estudio se registró que, para obtener una talla de 10 mm, las especies del género *Mammillaria* requirieron el doble de tiempo que otros géneros, además de generar anomalías morfológicas como hiperhidratación o desdiferenciación a callo. La desdiferenciación a callo también se apreció en este ensayo, lo que provocó la pérdida de los brotes.

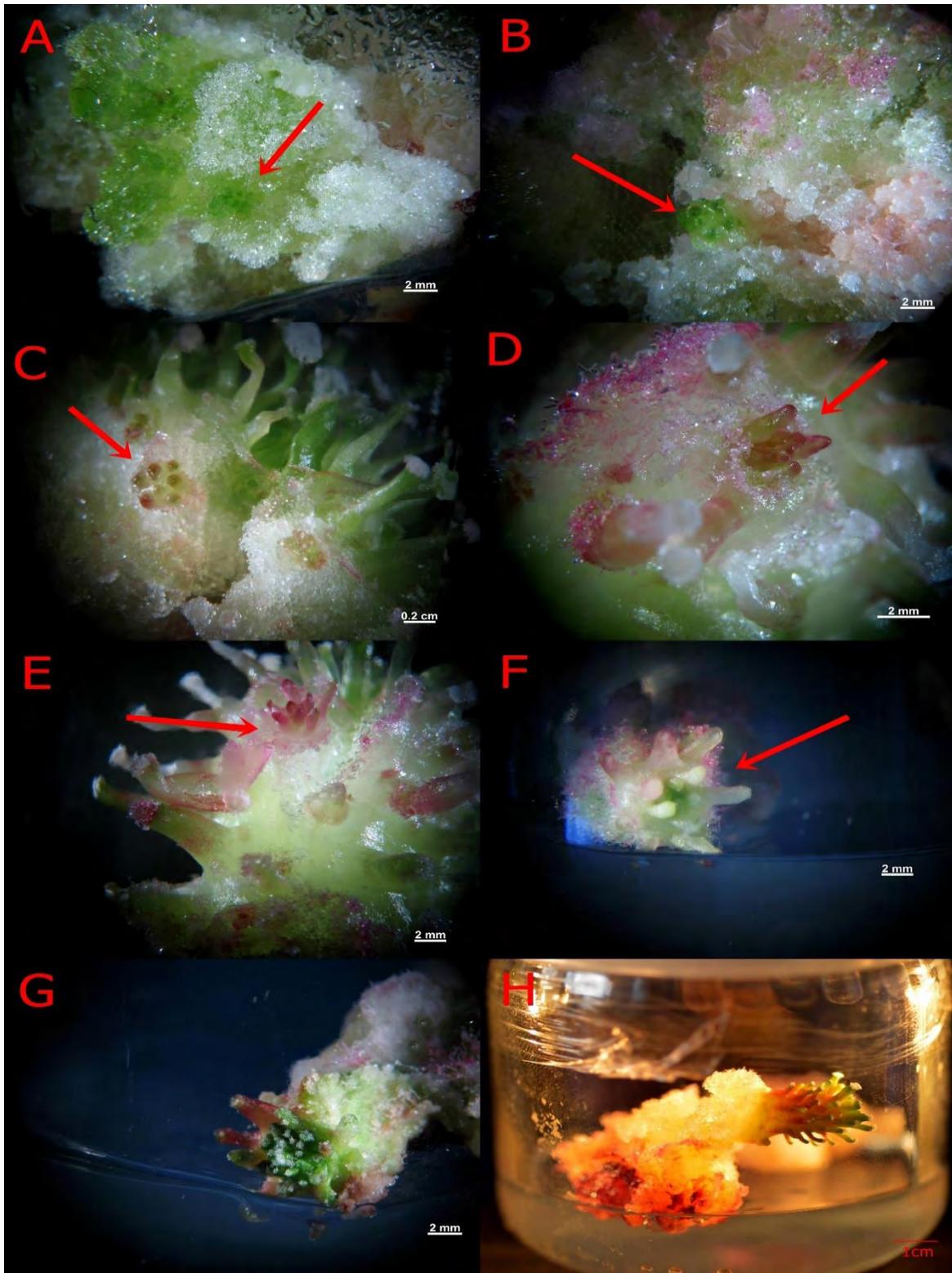


Figura 17. Secuencia en la morfogénesis indirecta en *M. luethyi*. A-B) Formación de nódulos o meristemoides, con una coloración más intensa. C-D) Brote incipiente. E-F) Brote ya bien formado, de morfología normal. G-H) Elongación y termino de desarrollo de brote. Fotografías de Alejandro Camargo.

Oxidación y supervivencia

A diferencia de los cultivos que procedían de plantas *in vitro*, la oxidación en los ensayos con las plantas de invernadero fue menor, lo que permitió observar eventos de morfogénesis aún a bajas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal. No obstante, durante los eventos de subcultivos se registró una pérdida del material vegetal debido a un proceso oxidativo.

Minocha y Mehra (1974) también reportaron la oxidación de explantes en *Mammillaria prolifera* al momento de realizar los subcultivos. De igual forma Singh (1999), registró una alta susceptibilidad en cultivos de *Coryphantha elephantidens*, durante los eventos de subcultivos en donde se presentó oxidación y necrosis del callo. Esta condición de oxidación se puede generar por cambios en las condiciones de cultivo al igual que los ensayos previos. Díaz (2007) también observó oxidación en la zona de corte, no obstante, esta condición no fue limitante para observar procesos de morfogénesis. Mientras que la oxidación en *Echinocactus pentalophus* reportada por Saucedo (2006) durante los subcultivos provocó la pérdida del material vegetal.

De los 12 explantes iniciales se generó abundante callo, que cubrió la totalidad del volumen del frasco, por lo que fue necesario dividirlo. Al final del ensayo se obtuvo un total de 19 frascos; de estos uno tuvo oxidación severa, dos con oxidación moderada y dieciséis con oxidación ligera. La supervivencia en este ensayo fue de 91%.

La oxidación se observó desde el inicio del cultivo, que se manifestó por una fuerte exudación por parte de los explantes, provocando un cambio de coloración en los tejidos. Después de varios subcultivos se presentó un segundo evento de oxidación, el cual se caracterizó por la pérdida de la coloración en el callo. La incorporación de PVP (1g/L) al medio de cultivo logró detener parcialmente la oxidación durante la primera etapa del cultivo, no obstante, se registraron pérdidas en el material vegetal a pesar de aplicar esta estrategia.

Ensayos a alta concentración de RCV

Formación de callo

A los pocos días de iniciado el cultivo en tubos de ensayo se observó la hidratación de los tejidos, que conllevó a la ruptura de los tubérculos. Algunas otras células de la parte del parénquima se hincharon y se incrementó su tamaño (Fig. 18). También se observó que la zona en contacto con el medio tomó una coloración rojiza.

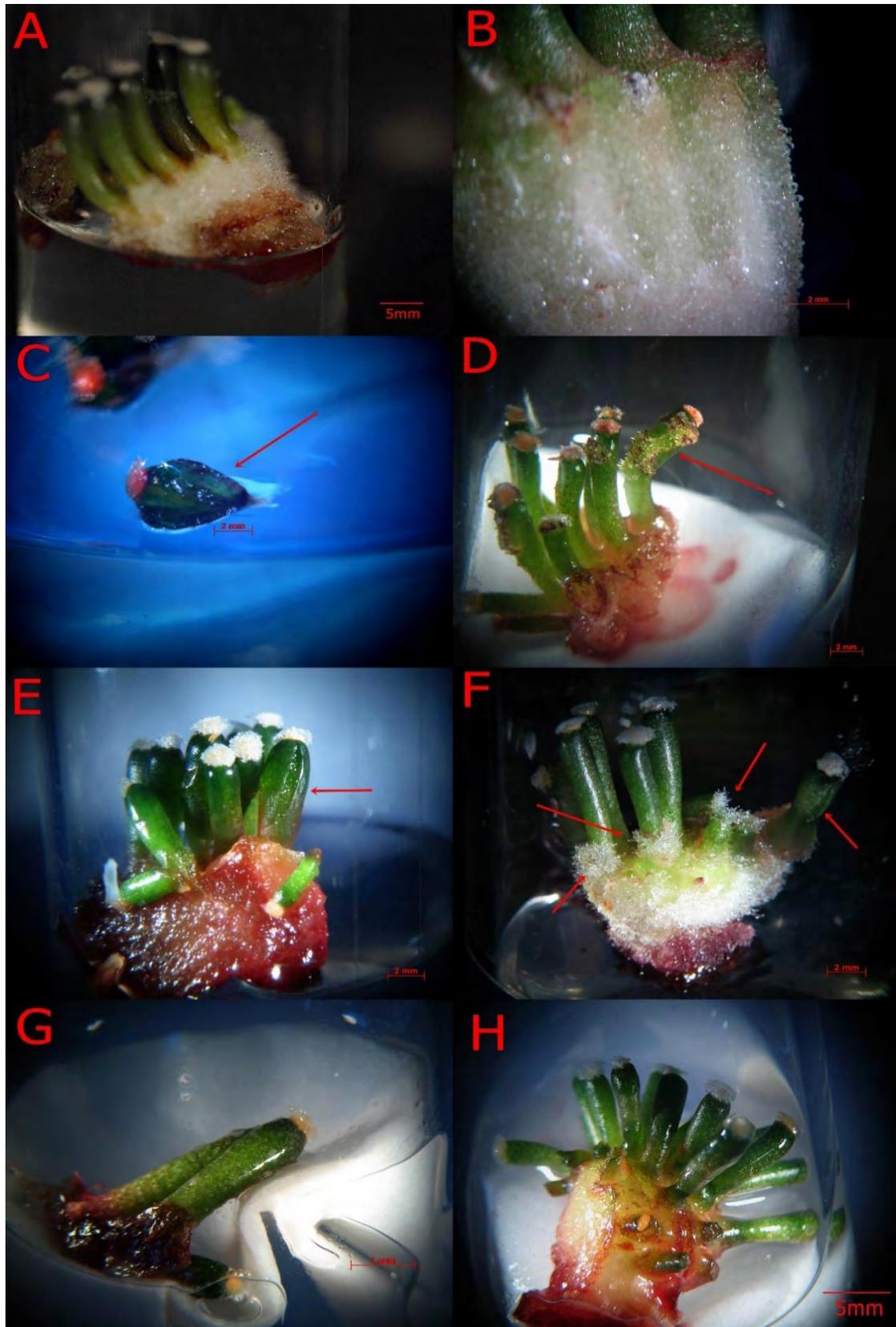
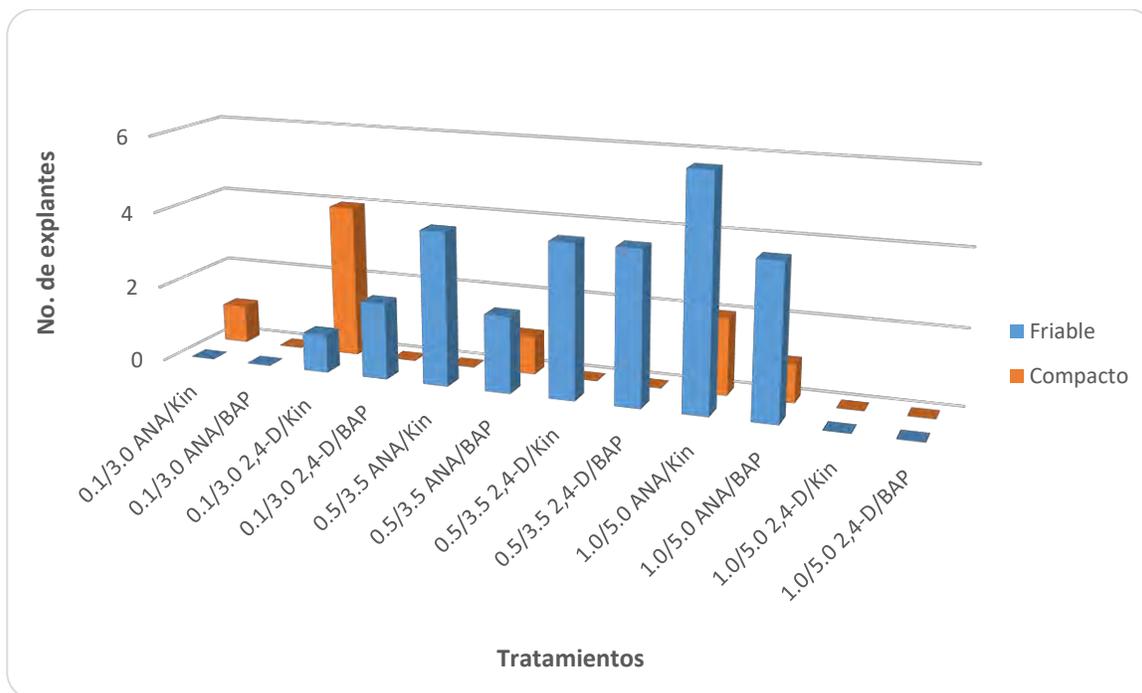


Figura 18. Respuestas *in vitro* durante el cultivo de *M. luethyi*. A-B) Hidratación de las células del parénquima (5 días de inducción). C-F) Ruptura de los tubérculos previo a la formación de callo (8 días de inducción). G-H) Coloración rojiza en las zonas de contacto con el medio (3 días de inducción). Fotografías de Alejandro Camargo.

La ruptura de los tubérculos pudo ser una respuesta a la hidratación de los tejidos debido a la alta humedad del ambiente *in vitro*, lo cual generalmente precede a la formación de callo, ya que se da primero un incremento en el tamaño de las células y posteriormente se activa la división. Después de la ruptura de los tubérculos, empezó el crecimiento de las células del parénquima que dio lugar a callo.

La formación de callo, a diferencia de ensayos anteriores fue principalmente a partir de los tubérculos y no de la zona de corte. Esto es contrario a lo reportado por Ramírez-Malagon *et al.* (2007) y por Pérez *et al.* (1998) quienes reportaron que el callo se generó de la parte basal que se encontró en contacto en diferentes especies del género *Mammillaria* (*M. densispina*, *M. orcutii*, *M. bocasana*, *M. pectinifera*, *M. perbella*, *M. candida*, *M. craigii*, *M. formosa*, *M. obscura* y *M. uncinata*).

El callo que se formó fue de dos tipos; uno friable de coloración verde intenso y desmenuzable al tacto con el instrumental, el otro compacto de aspecto hialino a verde más bien claro y de consistencia dura (Gráfica 3). La proliferación del callo fue menor a la que se observó con bajas concentraciones de reguladores, lo cual puede ser por las dimensiones del envase donde se sembró, ya que en tubos de ensayos hay un menor volumen de la atmósfera y por lo tanto menor crecimiento (Kozai, 1991; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).



Gráfica 3. Proporción de explantes con respuesta a formación y tipo de callo formado en cada tratamiento.

En el género *Mammillaria* se han registrado ambos tipos de callo. En *M. coahuilensis* se obtuvo un callo del tipo compacto con la adición exógena de 2iP, mientras que con TDZ el callo fue friable (Manzo, 2010). Por su parte Mancilla (2014) obtuvo un callo friable en *M. bombycina* al adicionar ANA/BAP. En *M. albicoma* se observaron ambos tipos de callo bajo el mismo juego hormonal. Para *M. gracilis* se obtuvo un callo compacto en ausencia de reguladores de crecimiento. Esto implica que el tipo de callo generado no estuvo en función de los reguladores de crecimiento adicionados al medio, sino más bien de factores genéticos y epigenéticos como han sugerido Saran y Kumar (2013).

La presencia de callo se dio en 35 de los 79 explantes cultivados (44%) (Fig. 19), en prácticamente todos los tratamientos con excepción del tratamiento 15 (0.1mg/L de ANA y 3.0mg/L de BAP), debido a que este tratamiento se perdió por contaminación. No se observó una tendencia en la formación de callo en los dos tipos de auxinas ensayadas. A pesar de que hay un mayor reporte de trabajos con una combinación de ANA/BAP, existen otros reportes que trabajan con otros reguladores debido a la ausencia de respuesta o bien para mejorar los protocolos (Gómez, 2008; Esparza, 2004; Manzo, 2010; Wakhlu y Bhau, 2000).

En este sentido el 2,4-D ha sido reportado con diversas respuestas, lo cual depende en gran medida de la especie. En *Mammillaria san-angelensis* los reguladores AIA, IBA y ANA mostraron un efecto positivo proporcional al incrementar la concentración, mientras que el 2,4-D no tiene buenos resultados a altas concentraciones (Rubluo *et al.*, 2002). En contraste Minocha y Mehra (1974), probaron distintos reguladores de crecimiento vegetal con *Mammillaria prolifera*, donde se observó que la presencia de 2,4-D fue esencial para mantener proliferando el callo. Se probaron además otros tipos de auxinas (AIA, IBA, ANA, GA₃) sin igualar la respuesta obtenida con 2,4-D. Santos-Díaz *et al.* (2003), obtuvieron callo a partir de explantes adultos de *Pelecyphora aselliformis* en un medio MS adicionado con BAP y Kin. En todos los ensayos el regulador BAP tuvo menor generación de callo.

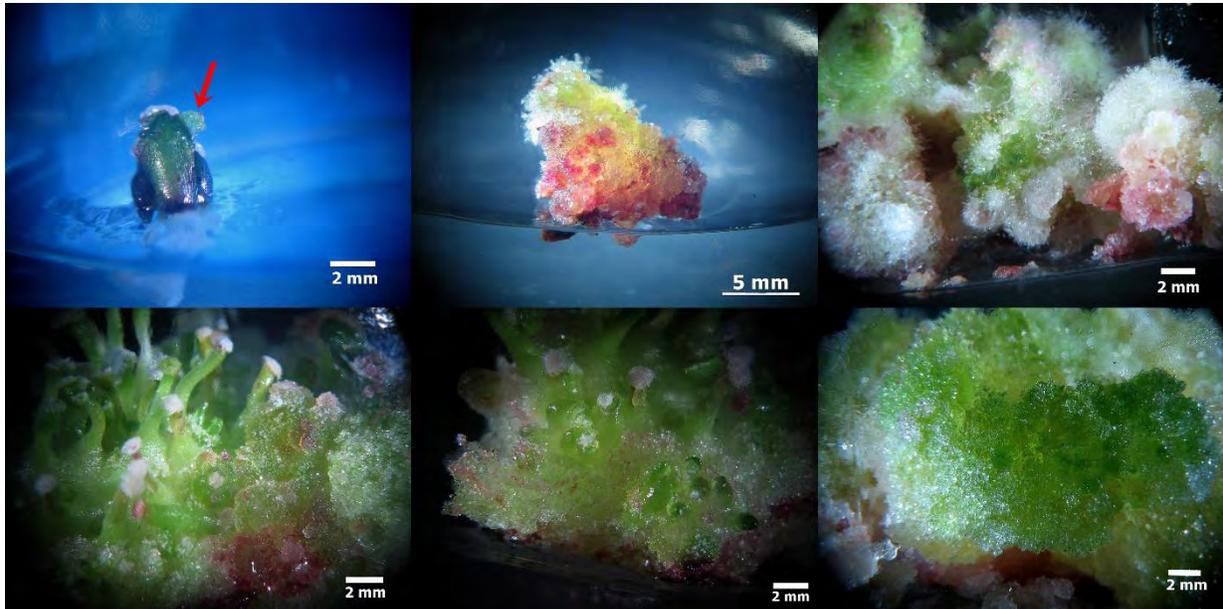
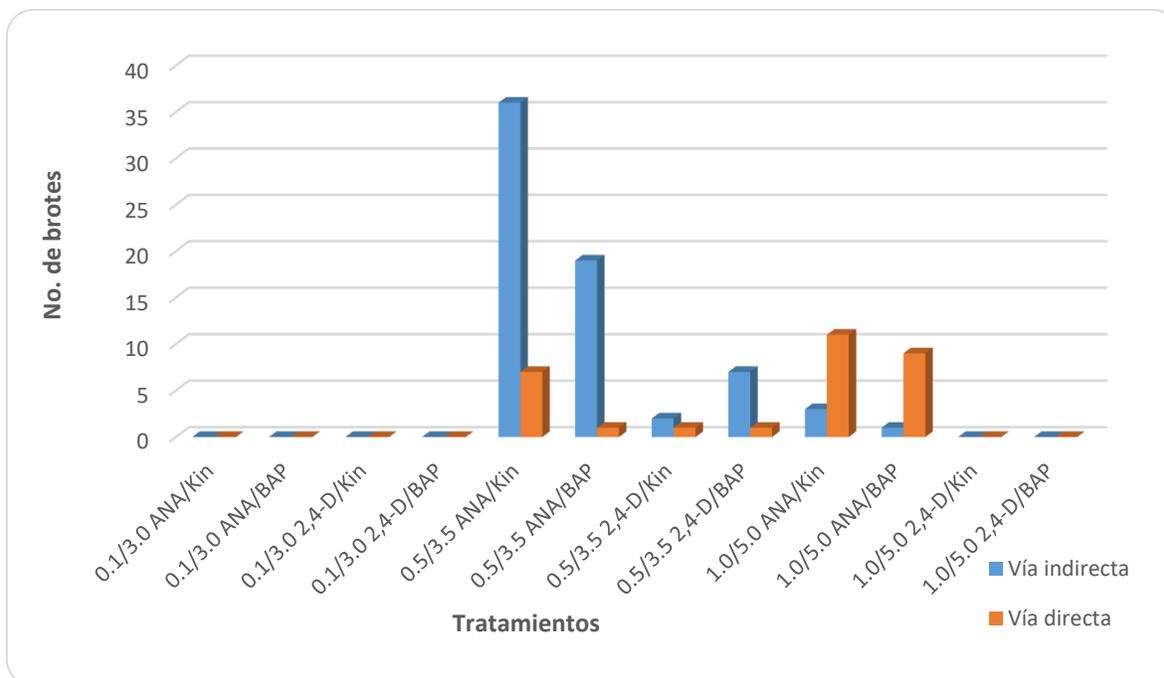


Figura 19. Formación de callo friable, con coloración intensa en explantes de *M. luethyi* cultivados en tubos de ensayo. Fotografías de Alejandro Camargo.

Respuestas morfogénéticas

Contrario a la formación de callo, la organogénesis se observó en solamente 6 de los 12 tratamientos ensayados, con una tendencia a formar brotes en las concentraciones hormonales intermedias (Gráfica 4); las combinaciones que favorecieron la producción de brotes fueron ANA/BAP (0.5/3.5 y 1.0/5.0mg/L), ANA/Kin (0.5/3.5 y 1.0/5.0mg/L), 2,4-D/BAP (0.5/3.5mg/L) y 2,4-D/ Kin (0.5/3.5mg/L). La formación de brotes se observó tanto de manera directa como indirecta. De éstos, los brotes formados por activación areolar aparecieron a las cinco semanas de iniciada la inducción a partir de explantes con oxidación de ligera a moderada; por otra parte, los brotes generados vía indirecta se presentaron a las catorce semanas de iniciada la inducción a partir de explantes con una oxidación ligera, callo abundante, friable y de color brillante.

La formación indirecta de brotes tuvo la misma secuencia que los formados por el ensayo con bajas concentraciones de reguladores de crecimiento; no obstante, el desarrollo de estos brotes fue más rápido, alcanzando tallas más altas en menor tiempo. Por otra parte, los brotes por vía directa se generaron a partir de las areolas floríferas como se observó en ensayos previos. A pesar de que no hubo respuesta en todos los tratamientos, todos los reguladores presentaron formación de brotes, en donde además las concentraciones más bajas no detonaron la organogénesis de brotes.



Gráfica 4. Número de brotes formados por activación de yemas o vía indirecta en cada tratamiento.

En el presente estudio concentraciones más altas de citocininas dieron lugar a una mayor cantidad de brotes, en contraste con los ensayos a baja concentración de éstas. Pero es similar a los resultados del ensayo con las plantas previamente establecidas *in vitro*, en donde más altas concentraciones dieron lugar a la formación de brotes. Para *Mammillaria pectinifera* se observó que solo las concentraciones más altas (5 mg/L) promovieron la formación de brotes, con una baja proliferación de callo (Giusti *et al.*, 2002). De manera similar De Medeiros *et al.* (2006) obtuvo la organogénesis indirecta de *Notocactus magnificus* con una alta concentración de BAP (5 mg/L). Sin embargo, esto es contrastante con lo reportado por Minocha y Mehra (1974), quienes no obtuvieron respuesta en *M. prolifera* a altas concentraciones de RCV (5.0-20.0 mg/L).

En esta investigación resultó más favorable la adición de ANA que de 2,4-D, ya que bajo la influencia de ANA se lograron regenerar 96 brotes, mientras que con el regulador 2,4-D sólo se obtuvieron 13 brotes. Esto concuerda con diversos reportes en cactáceas, en donde el ANA resultó más favorable para la inducción de respuestas morfogénicas y el 2,4-D como un inductor en la formación de callo. Al respecto Elías *et al.*, (2015) reportaron para el cultivo de *Echinocereus cinerascens* el uso de ANA incrementa la producción de brotes. Para *Thelocactus rinconensis* la organogénesis se dio con las combinaciones de BAP/ANA y 2iP/ANA (Díaz, 2007). Mientras que la activación areolar en *Cereus jamacaru* y en *Lobivia tegeleeriana* se

registró al utilizar BAP y ANA, con una mejor respuesta en presencia de ANA (Monostori *et al.*, 2012).

Con respecto a la adición de citocininas, éstas estuvieron en todo momento en mayor proporción que las auxinas. De las dos citocininas ensayadas no se observó una tendencia concluyente, ya que para BAP se obtuvieron 53 brotes y con el uso de Kin se obtuvieron 56 brotes. Sin embargo, llama la atención que la Kin demostró ser más eficiente en la activación areolar que el BAP, con 32 brotes y 21 brotes por esta vía respectivamente. En este sentido Rodríguez (2006) probó 3 tipos de citocininas (2iP, Kin y BAP) en donde la máxima producción de brotes se observó al adicionar BAP, pero de una menor calidad ya que el 50% de ellos presentó una morfología anormal, mientras que la Kin y el 2iP produjeron brotes de mayor calidad, pero en menor proporción, debido a esto son más recomendados para realizar la micropropagación de la especie.

De igual manera la organogénesis en *Mammillaria coahuilensis* fue diferencial dependiendo el tipo regulador agregado. El BAP formó brotes directos tanto en explantes apicales como en explantes laterales, mientras que la adición de 2iP solo tuvo organogénesis en explantes laterales (Rodríguez, 2014). En *M. rhodantha*, *M. hahniana*, *M. hutchinsoniana* y *M. orcuttii* la organogénesis fue estimulada por la adición de Kin, con un número de brotes muy variable entre especie, así como de la concentración óptima de los reguladores (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007).

En síntesis, la formación de brotes se observó en 9 de los 79 explantes (11%), con un total de 109 brotes, de los cuales 53 se formaron de manera directa y 56 a partir de la fase previa de callo (Fig. 20). El explante que con mejor respuesta detonó la formación de 31 brotes y el mínimo fue de 2 brotes por explante; sin embargo, la mayoría rebasó los 7 brotes por explante, con un promedio de 12 brotes por explante.

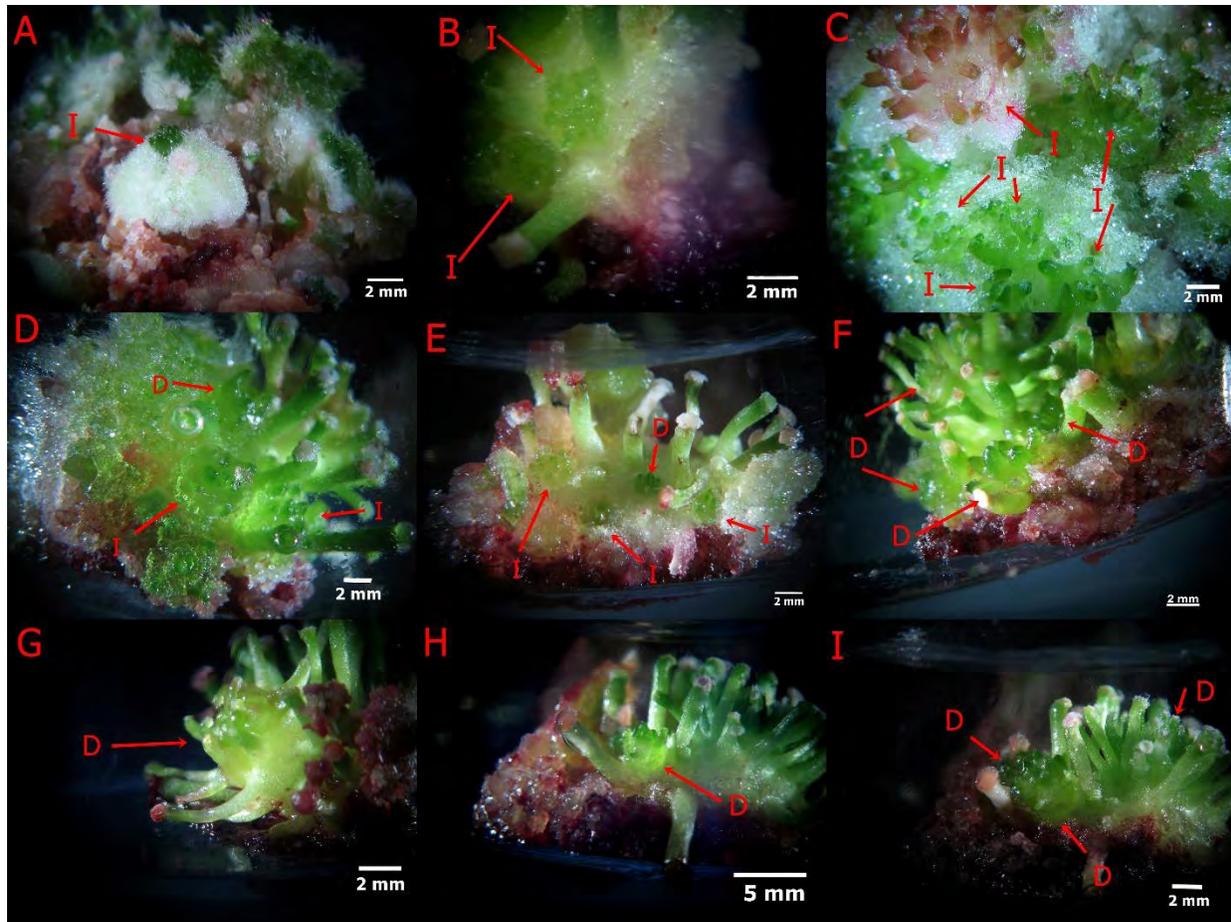


Figura 20. Formación de brotes en *M. luethyi*; de manera directa (D) y de manera indirecta (I). Fotografías de Alejandro Camargo.

El número de brotes fue menor a lo reportado en *Coryphantha elephantidens*, donde 100% de los explantes respondió con una combinación de Kin /2,4-D con un promedio de 23 brotes vía indirecta (Wakhlu y Bhau, 2000); pero superior a lo que obtuvo Manzo (2010) en *Mammillaria coahuilensis* con un promedio de 0.9 brotes por explante y de 1.6 brotes por explante en *Echinocactus platyacanthus* con la inducción de 2iP y TDZ.

Otras especies del género *Mammillaria* han presentado resultados similares, desde *M. hahniana* con un potencial regenerativo bajo con un máximo de 2.4 brotes por explante, hasta *M. orcuttii* con 12.4 brotes por explante (Ramírez-Malagon et al., 2007). En *M. theresae* se obtuvo un promedio de 8.2 brotes por explante a 5mg/L de Kin. Por otra parte, para *M. carmenae* y *M. herrerae* la adición de BAP tuvo una mejor respuesta con 7.7 brotes por explante en *M. carmenae* y 8.1 brotes por explante para *M. herrerae* (Retes-Pruneda et al., 2007). Soria-Campos et al. (2013), evaluaron la respuesta de *Mammillaria schiedeana* sembrados con BAP y ANA, con lo que obtuvieron 6.5 brotes por explante. Sin embargo, a diferencia de la presente

investigación, se observó la activación de las areolas tanto espiníferas como floríferas.

La alta concentración de reguladores demostró promover la activación areolar, lo cual no había sido reportado por Escobedo *et al.* (2004) y por Gracidas *et al.* (2010), quienes usaron los mismos reguladores ensayados en este trabajo, pero bajo diferentes condiciones. Además, bajo las condiciones utilizadas en la presente investigación se obtienen rendimientos mayores, con lo que se podría abastecer la demanda de esta especie.

La organogénesis de raíz solo se observó en un explante, del tratamiento con 1.0mg/L de ANA y 5mg/L de Kin. El explante no presentó formación de callo ni de brotes, era de apariencia seca y muy poco proliferativo (Fig. 21). La formación de raíces a partir de tallos es una respuesta escasa en el ambiente *in vitro*, que ha sido poco reportada en la literatura (De Medeiros *et al.*, 2006; Viñas *et al.*, 2012; Lara, 2010); sin embargo, en esta especie se presentó a partir de tubérculos aislados y a partir de secciones de tallo con los RCV ANA (1.0 mg/L) y Kin (5.0 mg/L) lo que indica que las células vegetales mantienen una capacidad totipotencial que puede ser expresada bajo las condiciones adecuadas.

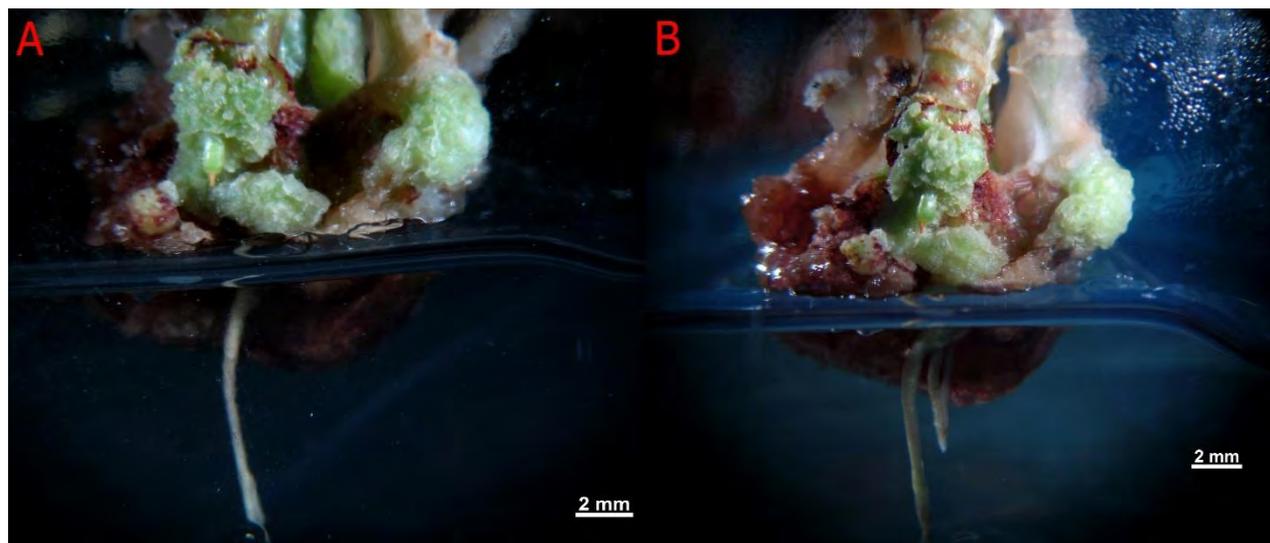


Figura 21. Formación de raíces en medio con 1.0 mg/L de ANA y 5.0 mg/L de Kin en *M. luethyi* durante su cultivo en tubos de ensayo. A) Después de 7 meses de cultivo, B) después de 9 meses de cultivo. Fotografías de Alejandro Camargo.

Se registró además de la formación de brotes y de raíz, el desarrollo de botones florales a partir de las secciones de tallo. Este botón floral se reconoció después de un mes de cultivo, el cual se generó de la axila de los tubérculos en la mayoría de los casos y en otros pareció tener origen a partir del parénquima del tallo; sin embargo, éstos últimos pudieron ser parte del meristemo floral, que al momento de

realizar los cortes del tallo perdieron la porción de los tubérculos (Fig. 22). Esta respuesta se presentó en 7 explantes de los 79 totales (8.8%) en los tratamientos 18, 20, 21 y 22. Todos los botones con excepción de uno se desarrollaron con la combinación de reguladores de crecimiento ANA y Kin, el otro se observó con 2,4-D y BAP.

La formación de los botones fue a partir de las areolas floríferas, por lo que se consideró que la respuesta fue por la activación de las yemas. La morfología de estas estructuras, aunque semejante a los brotes, se diferenciaron en que permanecieron en una forma triangular a ovoide en otros casos, siempre de menor tamaño y solamente con elongación, sin el desarrollo de nuevas estructuras. No se observó la apertura de la flor; sin embargo, se registró la elongación del botón en un periodo de 6 meses, después de lo cual se desdiferenció (Fig. 22).

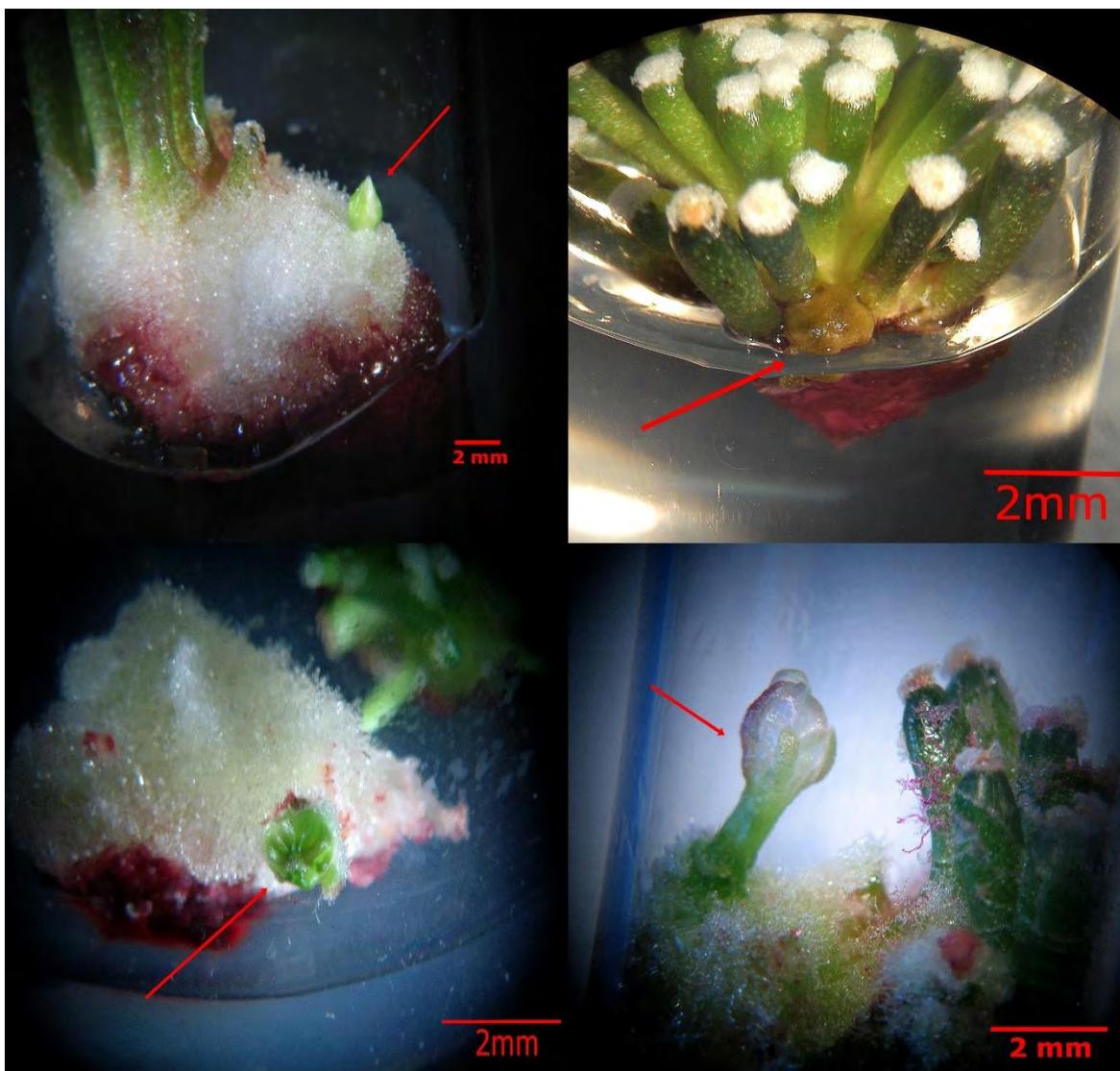


Figura 22. Desarrollo de botones florares a partir de explantes de tallo en *M. luethyi*. Fotografías de Alejandro Camargo.

Este evento no ha sido descrito con anterioridad para la familia Cactaceae. Malda *et al.* (1999) reportan la floración *in vitro* de *Coryphantha minima* después de 1 año de cultivo, sin embargo, esto es diferente a lo reportado en el presente estudio, ya que la formación de botones florales fue a las pocas semanas de iniciado el cultivo.

Oxidación y supervivencia.

La disminución del volumen de la atmósfera se evaluó a través de los tubos de ensayo, lo que permitió observar eventos de morfogénesis y proliferación celular. Además de esta estrategia se emplearon antioxidantes (250mg/L de ácido cítrico y ácido ascórbico) y PVP (2g/L). Así también, se cambiaron las concentraciones y tipo de reguladores de crecimiento vegetal (ANA, 2,4-D, BAP y Kin) con la finalidad de evaluar su eficiencia para el cultivo de esta especie. Bajo las condiciones previamente descritas se observó una reducción sustancial de los procesos de oxidación en comparación con los en ensayos previos.

La supervivencia de los explantes fue del 59%, menor al ensayo con baja concentración de RCV. Sin embargo, con esta condición se observó una mayor cantidad brotes, regeneración de la raíz, formación de botones florales y de callo. Al final del ensayo se registró un total de 48.1% de oxidación ligera, 5.1 % de oxidación moderada y 46.8% de oxidación severa (Tabla 11).

| Tabla 11. Grado de oxidación en los explantes durante la reducción del volumen de la atmósfera. | | | | |
|--|-------------------|---------------|--------------|---------------|
| Tx | RCV | Ligero | Media | Severa |
| 1 | 0.1/3.0 ANA/Kin | 0 | 0 | 1 |
| 2 | 0.1/3.0 ANA/BAP | 1 | 0 | 0 |
| 3 | 0.1/3.0 2,4-D/Kin | 2 | 0 | 5 |
| 4 | 0.1/3.0 2,4-D/BAP | 5 | 1 | 7 |
| 5 | 0.5/3.5 ANA/Kin | 5 | 1 | 2 |
| 6 | 0.5/3.5 ANA/BAP | 7 | 1 | 2 |
| 7 | 0.5/3.5 2,4-D/Kin | 1 | 0 | 4 |
| 8 | 0.5/3.5 2,4-D/BAP | 5 | 0 | 4 |
| 9 | 1.0/5.0 ANA/Kin | 2 | 1 | 6 |
| 10 | 1.0/5.0 ANA/BAP | 6 | 0 | 6 |
| 11 | 1.0/5.0 2,4-D/Kin | 2 | 0 | 0 |
| 12 | 1.0/5.0 2,4-D/BAP | 2 | 0 | 0 |

Azofeita (2009) menciona que la producción de polifenoles está influenciada por los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo. No obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de los tejidos no es del todo clara, pues un

mismo regulador que induce la oxidación en una especie en otra no tiene efecto alguno. A pesar de ello el 2,4-D y la BAP son los reguladores con un mayor número de reportes de oscurecimiento a los explantes. En este trabajo se observaron dos periodos de estrés oxidativo, el primero generado por los cambios fisiológicos provocados por el ambiente *in vitro* y el segundo debido a la pérdida de la capacidad proliferativa. Cuando se realizó el tercer ensayo con las mejores condiciones de los ensayos previos se logró superar las barreras impuestas por el estrés oxidativo, con lo cual se observaron múltiples eventos de organogénesis. Al momento de probar diversos reguladores de crecimiento (ANA, 2,4-D, BAP y Kin), no se observaron tendencias de oxidación por la adición de cualquiera de ellos.

En general durante los primeros días de cultivo se observó una ligera oxidación de los explantes en la zona de contacto con el medio (Fig. 23), tomando una coloración rojiza y con una ligera exudación de compuestos fenólicos. La coloración rojiza puede ser atribuida a los pigmentos denominados betalainas (González, 2008), mientras que la liberación de fenoles en general puede estar determinada por el estrés del cambio de condiciones, el corte realizado y la gran cantidad de estas sustancias para esta especie. Este proceso oxidativo fue breve, ya que se observó la proliferación de las células, con lo que se detuvieron los exudados. Esto implica que una menor cantidad de oxígeno en la atmósfera *in vitro*, así como los antioxidantes y adsorbentes fueron suficientes para detener este primer evento de oxidación provocado por los agentes desinfectantes y los daños mecánicos de la esterilización.

Rodríguez (2006), reportó algo similar, este autor observó una oxidación de los explantes al inicio de los cultivos en *Echinocactus grusonii*, manifestada por un cambio de coloración principalmente en la zona de corte, de verde a rojiza o café e incluso cambiando la coloración del medio a vino, grisácea o café. No obstante, el grado de oxidación no afectó el desarrollo y regeneración en esta especie. Por otra parte, Flores (2004) reportó una oxidación letal en explantes laterales de *Pelecypora strobiliformis*, mientras que los explantes apicales presentaron una oxidación que no impidió la regeneración.

Para *Mammillaria hernandezii* se observó la oxidación de los tejidos a los 8 días de iniciada la siembra, con exudados hacia el medio a partir de la zona de corte y en algunos casos afecto a todo el explante (Pérez, 2015). En *Mammillaria bombycina* y *M. coahuilensis* se observó un comportamiento similar, ya que la oxidación comenzó después de que se realizaron los cortes (Yáñez, 2011; Rodríguez, 2014).

Los primeros eventos de oxidación se lograron superar con la adición de antioxidantes, adsorbentes y reducción de la atmósfera. Sin embargo, se observó un segundo periodo de oxidación más severo, el cual no pudo ser controlado en su totalidad y causó la pérdida del material vegetal. Este segundo periodo fue característico de los subcultivos a medio fresco y en un envase de mayor capacidad y sin reguladores de crecimiento vegetal (Fig. 23). También se registró que cuando un explante con una oxidación media o ligera al ser transferido a tubos de ensayo, recuperaba su condición a la normalidad y comenzaba a proliferar. Esto es un indicativo de la importancia de la atmósfera en los procesos de

oxidación para esta especie, por lo que se sugiere realizar ensayos más detallados para desentrañar los procesos que envuelven al estrés oxidativo para esta especie.

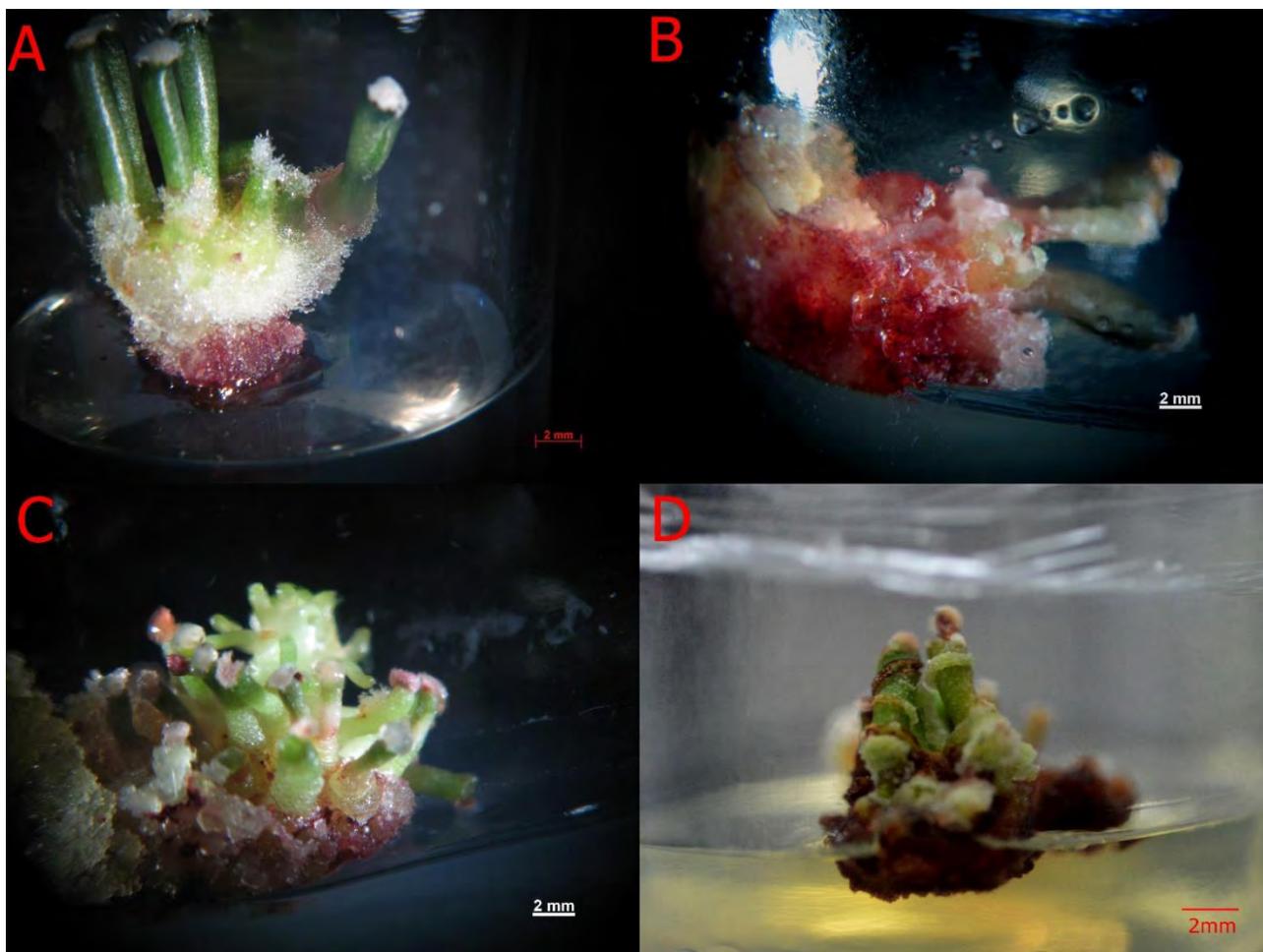


Figura 23. Oxidación en explantes de *M. luethyi* durante su cultivo en tubos de ensayo. A-B) Oxidación al inicio del cultivo, con un cambio de coloración en la base del explante en contacto con el medio. C-D) Oxidación después de un periodo de proliferación y al momento del subcultivo. Fotografías de Alejandro Camargo.

Otros ensayos

Debido a que las plantas adultas llegaron a la madurez y tuvieron eventos de floración (Fig. 24), se planteó la posibilidad de cultivar una flor y aislar los óvulos para obtener alguna respuesta de embriogénesis. El explante de flor se desinfectó con el protocolo 3. Dada la naturaleza del explante se sembró en medio Litz con su complemento de elementos orgánicos (L-glutamina, Hidrolizado de caseína, L-arginina y L-asparagina), adicionando los reguladores de crecimiento vegetal 2,4-D y BAP en concentración de 1 mg/L y 0.1 mg/L respectivamente.

Benega *et al.* (2009) buscaron la vía de embriogénesis somática en tres especies de los géneros *Selenicereus* y de *Hylocereus* a partir de órganos florales bajo un juego hormonal de Picloram, BAP, 2,4-D y TDZ. Para *Mammillaria prolifera* se indujo la formación de callo en explantes de flor a partir de 2,4-D, Kin y agua de coco, en esta especie se observó que la Kin potencio la formación de callo (Minocha y Mehra, 1974).



Figura 24. Planta madre injertada con eventos de floración. Fotografía de Alejandro Camargo.

Se aisló la sección de flor junto con una porción de 5 mm de tallo del área circundante a la misma. En la sección de tallo se incluyeron los tubérculos de alrededor. En la campana de flujo laminar se procuró dejar la menor cantidad de parénquima y exponer la parte del ovario, dejando las estructuras somáticas en

frascos separados. Las respuestas que se registraron fueron la formación de callo, así como la hidratación y cambio de coloración en los óvulos (Fig. 25). Transcurridos 6 meses de cultivo el callo invadió el frasco, cubriendo los óvulos. Al término del ensayo no se registraron eventos de organogénesis.

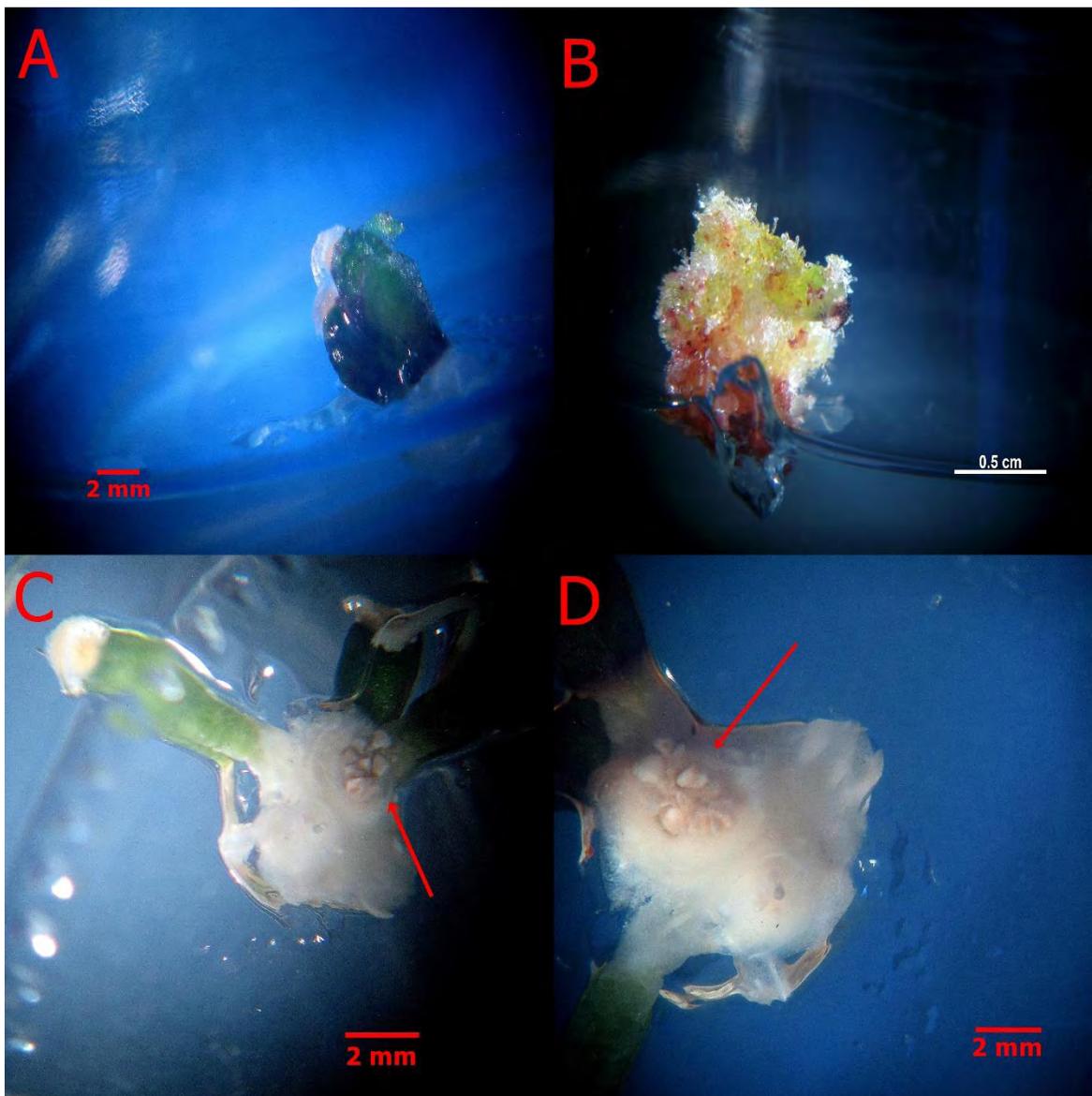


Figura 25. Explantes de flor de *M. luethyi* cultivados en medio Litz. A-B) Secciones de tubérculos con proliferación de callo. A) Al inicio del cultivo, B) A dos meses de cultivo. C-D) Ovario aislado, con presencia de óvulos. C) Al inicio del cultivo, D) después de dos meses de cultivo, cambio de coloración e incremento de tamaño en óvulos. Fotografía de Alejandro Camargo.

Por otra parte, se realizó un ensayo de germinación, a partir de semillas de un fruto maduro que se encontró en las plantas de invernadero. Se obtuvieron 5 semillas

que se desinfectaron bajo el protocolo 3, con 3 semillas establecidas y 2 contaminadas. Las semillas que se contaminaron se volvieron a desinfectar con el mismo protocolo una segunda ocasión, con lo cual se logró la asepsia. Se sembraron en medio MS 50-100% de componentes inorgánicos-orgánicos respectivamente. Después de 6 meses de cultivo no se registró la germinación de las semillas.

Para esta especie se han reportado bajos porcentajes de germinación; sin embargo, las causas de la baja viabilidad son poco claras, ya que los trabajos reportados no especifican el tiempo ni las condiciones de almacenamiento. No obstante, las causas de esta baja tasa de germinación podrían ser una pérdida rápida de la viabilidad de las semillas, que éstas sean infértiles por procesos de autopolinización o que requiera algún tipo de estratificación.

Gracidas *et al.* (2010), sembraron un lote de 17 semillas de *M. luethyi* en medio MS, las cuales después de 9 meses presentaron una nula germinación. Por lo anterior, decidieron romper mecánicamente la testa y con ello se logró la germinación de tres semillas. Por otra parte, Turner (2007) reportó para esta especie una germinación de 0% a partir de un lote de 20 semillas, no obstante, tampoco precisa los tiempos de almacenamiento o de colecta.

Los argumentos anteriores han contribuido para que se considere el uso del cultivo de tejidos vegetales como una opción viable y aceptable en especies con algún grado de amenaza de extinción y con semillas recalcitrantes (Pence, 2011), así como el redoblar esfuerzos para contribuir al entendimiento de los procesos que se observan en el cultivo *in vitro*.

Astrophytum caput-medusae

Cultivos de origen *in vitro*

Las plántulas *in vitro* procedentes de investigaciones previas fueron subcultivados en medio fresco y sin reguladores de crecimiento vegetal en dos ocasiones. De los dos frascos que se recibieron, se registró para ambos un aspecto seco y coloración café a negruzca. Después del primer subcultivo uno de ellos se recuperó parcialmente, con una hidratación parcial de los tubérculos y cambió su coloración de café a una de ligera pigmentación verde. No obstante, no se observó crecimiento, intensificación de la coloración o formación de nuevas estructuras (Fig. 26). Después de un mes del subcultivo la coloración se perdió y ya no presentó ninguna respuesta por lo que se le consideró muerta.

Por otra parte, la otra plántula no tuvo respuestas de recuperación, ganancia de coloración o hidratación de los tejidos durante el subcultivo (Fig. 27). Después de un mes del segundo subcultivo se dio por muerta dada la nula regeneración. Para esta especie se perdió la posibilidad de realizar ensayos de plántulas procedentes de cultivos *in vitro*.



Figura 26. Mejora de la condición del explante de *Astrophytum caput-medusae* después del subcultivo a medio fresco. Izquierda: condición inicial; derecha: condición al primer subcultivo. Fotografías de Alejandro Camargo.



Figura 27. Ausencia de la respuesta regenerativa o de proliferación de uno de los frascos de *A. caput-medusae* derivado de la investigación de Hernández (2012). Izquierda: condición inicial; derecha: condición al primer subcultivo. Fotografías de Alejandro Camargo.

Supervivencia y oxidación

La supervivencia fue nula debido a la condición en la que se recibieron los cultivos, lo que eliminó la posibilidad de realizar ensayos para observar el potencial regenerativo de esta especie.

Plantas *ex vitro*

Establecimiento aséptico

Durante el establecimiento aséptico, se tomó como referencia tres elementos básicos: una solución jabonosa, etanol al 70% y una solución de hipoclorito de sodio. Bajo este esquema se han manejado diversas especies como *Mammillaria bombycina*, *M. wrightii*, *M. coahuilensis*, *Echinocereus cinerascens*, *Ariocarpus bravoanus*, *Hylocereus megalanthus*, *Echinocactus grusonii*, *Astrophytum capricorne*, *Pilosocereus sp.* (Mancilla, 2014; Clayton *et al.*, 1990; Manzo, 2010; Elías *et al.*, 2015; Gómez, 2008; Pérez, 2011; Martínez, 2007; Garza, 2010; Montalvo *et al.*, 2004).

Lo anterior ha resultado viable cuando la fuente de explante es por semillas; sin embargo, cuando se utilizan secciones de plantas adultas (tubérculos, tallos, raíces,

flores) este tren de desinfección resulta ineficiente, por lo que usualmente es modificado a criterio del investigador, ya sea adicionando otro tipo de agentes desinfectantes o incrementando los tiempos de exposición.

Al respecto Minocha y Mehra (1974) utilizaron cloruro de mercurio al 0.075% para explantes de flor en *Mammillaria prolifera*, sin reportar porcentajes de contaminación. De igual forma Rodríguez *et al.* (2013) utilizaron bicloruro de mercurio en plantas adultas de *Escobaria cubensis* con concentraciones de 0.1% y 0.2%, con un establecimiento de los explantes menor al 50%. Mientras que Ojeda-Zacañas *et al.* (2010), agregaron al tren de desinfección fungicida a razón de 10g/L en explantes de plantas adultas de *Opuntia ficus-indica*. En este sentido en la presente investigación se propuso modificar el esquema básico de desinfección dado que se disectaron estructuras somáticas con una gran cantidad de ornamentaciones, características de la especie. Se propuso utilizar fungicidas en forma de aspersión a manera de pretratamiento o bien en solución durante el tren de desinfección. Así también se planteó incorporar y evaluar la eficiencia de un desinfectante de nombre Soluvet® utilizado en clínicas y hospitales.

En total se sometieron a desinfección 8 plantas de *Astrophytum caput-medusae* en los cuatro tratamientos propuestos (Fig. 28). Se presentaron bajos porcentajes de contaminación, lo cual se describe a continuación. En el tratamiento uno con una aspersión de fungicida durante 1 mes previo al tren de desinfección, resultó eficaz dado que no se presentó ningún tipo de contaminación.

En la presente investigación la aspersión de fungicidas resultó eficiente, contrario a lo reportado por Ramírez-Malagon *et al.* (2007), quienes utilizaron una combinación de tres fungicidas (Previcur N, Derosal 500D y Buzan 30 WB), en diez especies del género *Mammillaria*, sin embargo, obtuvieron bajos porcentajes de establecimiento (20%) debido necrosis por oxidación y contaminación; o lo reportado por Azcona (2009) quien adicionó Agrimicin (1mg/L) en solución por una hora en *Melocactus curvispinus*, sin embargo, se presentó contaminación por hongos en el 20%.

El segundo método de desinfección consistió en mantener a las plantas madre en una solución de Benomil® (1g/L) por 24 horas, después de lo cual se trataron con una solución de agua jabonosa (10% por 5 minutos), etanol (70% por 1 minuto), Soluvet® (2% por 15 minutos) y Cloro comercial (20% durante 20 minutos); para este método se utilizó una planta con un total de 16 explantes. De los 16 explantes, sólo se presentó contaminación en un explante de tallo. Esto resulta interesante ya que para *A. caput-medusae* el uso de antimicóticos ya sea en un pre-tratamiento o durante el protocolo de desinfección permite un establecimiento aséptico exitoso.

A pesar de presentarse buenos porcentajes de asepsia con los ensayos previos, se planteó realizar ensayos sin el uso de fungicidas debido a que generan estrés oxidativo en los explantes. En el método de desinfección tres se trataron dos plantas incorporando Soluvet®, donde se contaminaron 7 explantes de tubérculo y dos de tallo. Cabe aclarar que el tallo y los tubérculos contaminados pertenecían a una planta madre que presentó una coloración anormal al momento de ser extraído

del portainjerto (Fig. 28), por lo que la contaminación pudo ser de fuente endógena y no por una baja eficiencia del protocolo de desinfección.

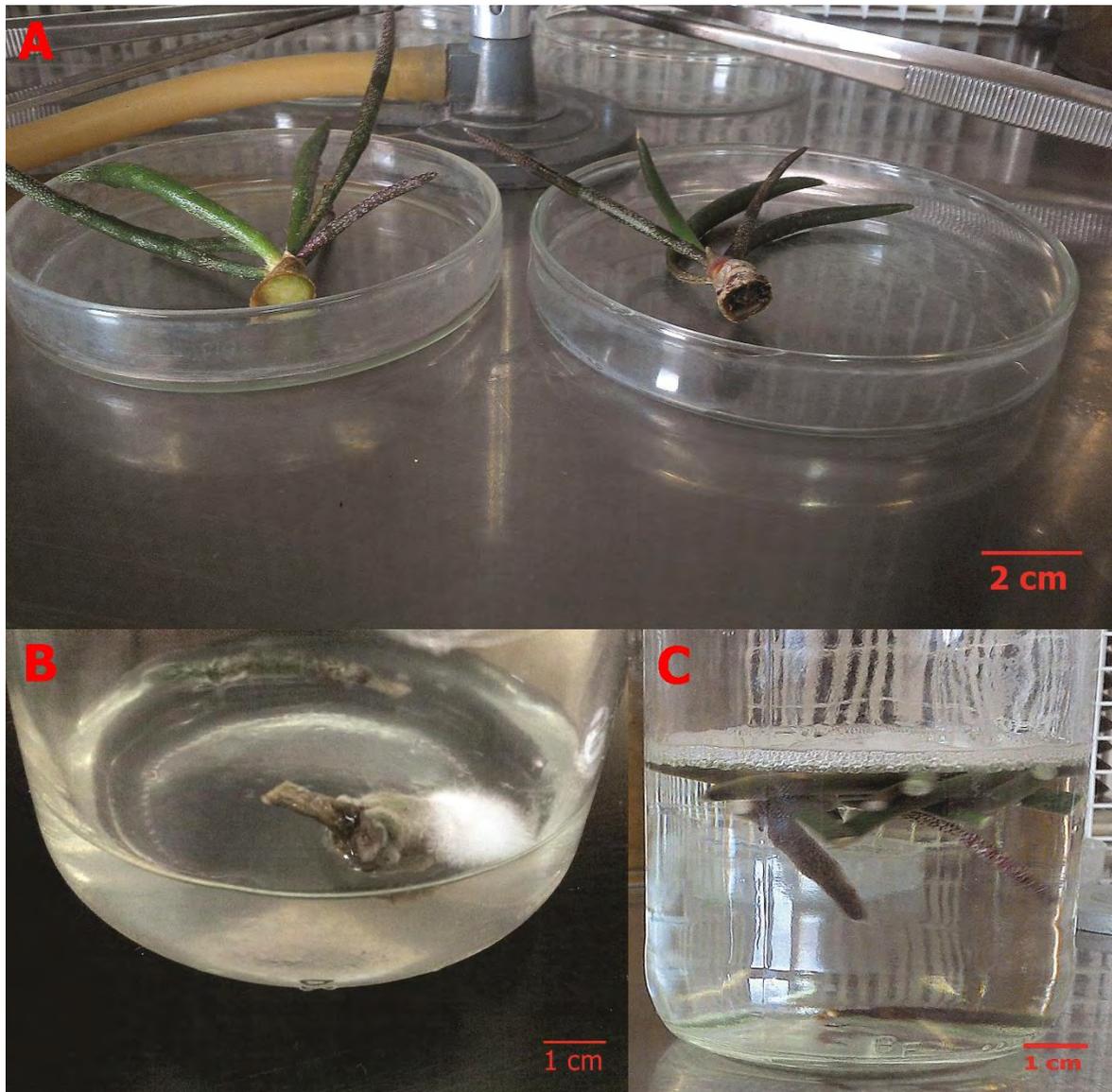


Figura 28. Establecimiento de explantes de *Astrophytum caput-medusae*. A) Comparación de una planta normal (izquierda) con una con signos de enfermedad (derecha). B) Contaminación de sección de tallo por hongos. C) Desinfección de secciones de tubérculos. Fotografías de Alejandro Camargo.

Pocos son los casos donde la contaminación de los cultivos puede ser atribuida a una fuente endógena, debido a que ésta es imperceptible; sin embargo, para la planta que presentó contaminación en todos los explantes, el aspecto de pudrición evidenciaba una condición enferma de la planta.

Con objeto de asegurar el establecimiento en ambas plantas, se realizaron cambios al protocolo de desinfección tres, que consistió en incrementar la concentración de Soluvel® a un 10% y aumentar el tiempo de exposición a cloro a 25 minutos, adicionando 2 gotas de Tween® 20. Con este protocolo se ensayaron tres plantas de *A. caput-medusae*, con lo que se logró la esterilización superficial.

Porcentajes bajos de contaminación son poco frecuentes (Mancilla, 2014; Fernández, 2014; Yáñez, 2011, Flores, 2004; Rodríguez, 2006). No obstante, tuvieron como fuente de explante semillas, que resultan más sencillas de establecer debido a la gruesa testa que presentan, que protege de la acción abrasiva de los agentes desinfectantes. En plantas adultas los resultados han sido diversos. Para *Astrophytum capricorne* se obtuvo una baja contaminación en explantes de semillas, pero alta para plantas adultas, aun cuando los tiempos de exposición y agentes desinfectantes aumentaron (Garza, 2010). Mientras que en *A. myriostigma* el hipoclorito de sodio al 15% por 10 minutos fue suficiente para desinfectar secciones de tallo de plantas adultas (Garza-Padrón *et al.*, 2010). En *A. asterias* no se registró contaminación a partir de semillas, sin embargo, en *Mammillaria bombycina* se presentó contaminación por bacterias y hongos.

De los cuatro tratamientos ensayados, se observó que la parte con mayor carga de microorganismos es la sección del tallo. Además de ello es importante notar que la adición de antimicóticos no es determinante en el proceso de desinfección ya que aún prescindiendo de ellos se lograron altos porcentajes de asepsia; por otra parte, la exposición prolongada a estos fungicidas puede derivar en una severa oxidación, donde la mayoría pierde su proceso de regeneración. El uso de Soluvel® en conjunto con los otros agentes desinfectantes resultó eficiente en la desinfección de esta especie, por lo que puede ser una opción a considerar en el establecimiento de otras especies de cactáceas en riesgo de extinción.

Ensayos a baja concentración de RCV

Formación de callo

Durante los primeros días de cultivo se observó que los tubérculos de *A. caput-medusae* se curvaron, comenzaron a hidratarse y se rompió la epidermis, después de lo cual muchos de ellos comenzaron a formar callo (Fig. 29). No obstante, la ruptura de la epidermis no siempre generó esta respuesta ya que sólo 7 explantes de los 19 totales (36%) derivaron en la formación de callo.

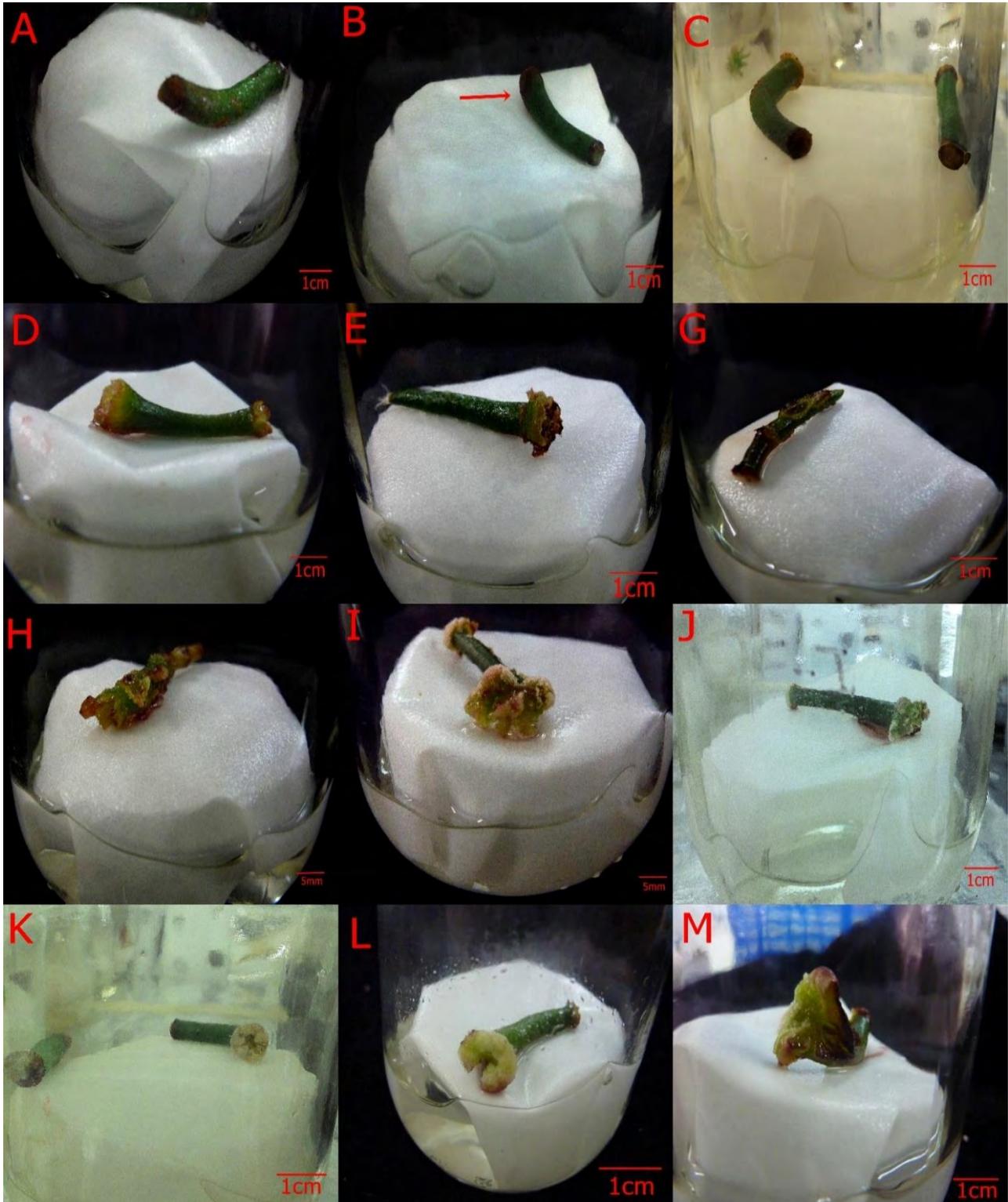


Figura 29. Principales respuestas obtenidas en *A. caput-medusae* cultivado a baja concentración de RCV. A-C) Curvatura de explantes en los primeros días de cultivo. D-I) Hinchamiento y ruptura de la epidermis por la hidratación de los tejidos. J-M) Formación de callo a partir de la zona de corte. Fotografías de Alejandro Camargo.

Iniciado el cultivo, el explante se ve expuesto a condiciones artificiales, que incluyen cambios hídricos, osmóticos, de composición de la atmósfera, así como a los reguladores de crecimiento vegetal (Gaspar *et al.*, 2002). Esto genera un cambio en la fisiología de la planta, particularmente en las cactáceas se ha observado que las condiciones del ambiente *in vitro* generan un crecimiento acelerado (Malda *et al.*, 1999; Balen *et al.* 2009), lo que aunado a un incremento en la hidratación de los tejidos puede generar la ruptura de la epidermis, aumento en el tamaño de las células o curvaturas por un crecimiento asincrónico. Esto se observó en 21 especies de los géneros *Astrophytum*, *Mammillaria*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Cephalocereus*, *Ferocactus*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*, donde se generó callo a partir de la zona del corte después de 6 semanas (Pérez *et al.*, 1998).

En *Coryphantha elephantidens* la formación de callo a partir de secciones de tubérculos se observó después de la segunda semana de iniciado el cultivo (Wakhlou y Bhau, 2000), mientras que para *Cereus peruvianus* la formación de callo se observó hasta las 4 semanas a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Para *Astrophytum capricorne* la formación de callo se observó a partir de la segunda semana de cultivo en explantes de plántulas germinadas *in vitro*. Por su parte Hernández (2013) reportó para *A. caput-medusae* la formación de callo, sin precisar el origen y tiempos de formación.

En la presente investigación el callo que se registró fue en la mayoría de los casos de aspecto compacto, poco proliferativo y con una coloración hialina (Fig. 27). La proliferación de estas células se generó a partir de la zona de corte, sin que el tubérculo perdiera su diferenciación. Por otra parte, se observó que el tamaño del tubérculo influyó de manera determinante en la generación de callo, ya que en explantes con un tamaño menor a dos centímetros no se registró esta respuesta. En ningún caso el callo fue regenerativo, además al paso de varias semanas se oxidó completamente.

Callo no regenerativo también ha sido reportado por Lara (2010), en *Aporocactus flagelliformis*. Para *Echinocereus pentalophus*, el callo obtenido demostró ser no regenerativo y presentó alta oxidación (Saucedo, 2006). La inducción de callo en *Astrophytum myriostigma* se observó después de un mes de inducción, con un alto grado de oxidación y una pobre proliferación (Garza-Padrón *et al.*, 2010). El callo obtenido por Hernández (2013) en *Astrophytum caput-medusae* fue muy distinto al de la presente investigación, ya que fue del tipo friable y presentó múltiples respuestas morfogénicas. Esto resulta interesante, ya que se observa mejor respuesta en la capacidad regenerativa para explantes de origen ontogénico joven, mientras que cuando se trabaja con plantas adultas, se pierde esa capacidad proliferativa (Pérez, 1998; Roca y Mroginski, 1991). De acuerdo a Gamborg *et al.* (1976) y a Lema-Ruminska y Kulus (2014) tanto el origen, como las condiciones de cultivo tienen una amplia relevancia para el éxito en el cultivo de tejidos vegetales.

Debido al alto porcentaje de oxidación y poca respuesta por parte de los explantes se incrementó la concentración de ANA/BAP a 0.5/2.0mg/, además de recibir un

pretratamiento durante 1 mes previo con una solución de citocininas (BAP) con una concentración de 5mg/L. Transcurrido el mes de pretratamiento se sometió a la planta al protocolo de desinfección uno y se sembraron en frascos con puentes de papel con una concentración hormonal de 0.5mg/L de ANA y 2.0mg/L de BAP. Las respuestas que se registraron bajo este ensayo fueron similares al anterior; sin embargo, se observó una oxidación más severa que llevó a la muerte de los explantes. No se observó organogénesis ni por brotes o raíces en ninguno de los dos ensayos, debido probablemente a la severa oxidación que se presentó y que no permitió explorar la capacidad regenerativa de la especie.

Las causas que provocan un estrés oxidativo en las plantas son diversas. Por ejemplo, Durazo *et al.* (2012) demostraron en *Echinocactus grusonii* que la adición de reguladores de crecimiento vegetal resultó perjudicial para la propagación de la especie. De manera similar en *Astrophytum capricorne* los reguladores 2,4-D (3 mg/L) y Kin (1 mg/L) tuvieron efecto negativo en la inducción de callo, además, se registró una oxidación severa de los explantes (Garza, 2010). Para *Turbincarpus laui* solamente al agregar BAP a una concentración de 1mg/L tuvo una respuesta favorable, mientras que, a concentraciones mayores, menores y en ausencia de reguladores se observó una respuesta muy pobre (Mata *et al.*, 2001).

La escasa respuesta de los explantes observados en la presente investigación es similar a lo reportado por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), en la que se observó una respuesta pobre en la proliferación y regeneración de *Mammillaria haageana* con concentraciones de 1-2 mg/L de BAP y ausencia de auxinas (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989). Esto contrasta con lo registrado para *Astrophytum asterias*, donde se observó una buena respuesta, generando hasta 5 brotes por explante (Mancilla, 2014). De igual manera la alta tasa de regeneración mostrada en *Turbincarpus laui* a partir de plántulas germinadas *in vitro*, con un promedio de 269 brotes por explante, demuestra que las células con un estado de desarrollo joven presentan una gran capacidad de plasticidad y de competitividad para detonar procesos de organogénesis (Mata *et al.*, 2001). En el caso de *A. caput-medusae* Hernández (2013) reportó un promedio de 0.25 brotes por explante; este potencial regenerativo es muy bajo en comparación con otras especies, lo cual sugiere que aún con cultivos iniciados de plántulas germinadas *in vitro* la especie se muestra recalcitrante al cultivo *in vitro*.

Oxidación y supervivencia

La supervivencia de la especie fue baja, con una oxidación severa después de los subcultivos. Al final del ensayo se presentó 87.3% de oxidación severa, 5.2% de oxidación moderada y 10.5% de oxidación ligera. Los procesos de oxidación en esta especie se manifestaron a las dos semanas de iniciado el cultivo, después de ser cortados muchos de los explantes comenzaron a perder la coloración, se observó un oscurecimiento y una fuerte exudación de fenoles al medio. En *Astrophytum myriostigma* se registraron gran cantidad de oxidrilos fenólicos en cultivos de callo (Garza-Padrón *et al.*, 2010); lo anterior podría sugerir que el género está caracterizado por una alta presencia de sustancias fenólicas, que en el ambiente *in vitro* provocan un estrés oxidativo.

Para remediar esta situación se probaron diferentes estrategias, que incluyeron la adición de antioxidantes al medio, baños de antioxidantes, el uso de adsorbentes y el empleo de medio líquido con el uso de puentes de papel. La primera condición que se ensayó fue el incremento en la cantidad de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico) de 150mg/L a 250mg/L. Después de un mes del ensayo no se observó mejoría en el control del oscurecimiento de los tejidos. Esto difiere de lo reportado para *Lophophora williamsii* donde la oxidación que se produjo al seccionar los tejidos fue superada al incrementar las concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico al doble (200mg/L y 100mg/L respectivamente) (Esparza, 2004). El uso de antioxidantes también fue funcional en *Astrophytum asterias*, en donde se realizaron los cortes en una solución de ácido ascórbico (Mancilla, 2014).

En el caso de *Astrophytum caput-medusae* Hernández (2013), utilizó lavados de ácido cítrico y ácido ascórbico esterilizados por filtración, con lo que se logró detener la oxidación. Sin embargo, los explantes tratados fueron plántulas germinadas *in vitro*, por lo que el grado de compuestos fenólicos es generalmente menor de acuerdo a Pérez *et al.* (1998). Por otra parte, la ineficiencia en el uso de antioxidantes en la presente investigación puede estar dada por la vida efímera de la molécula de estos antioxidantes. Se sabe que el ácido ascórbico tiene una vida promedio de entre 50 minutos y 3 horas después de ser agregado. Las causas de la degradación pueden ser varias, la temperatura, oxígeno, luz, pH, entre otros (Elmore *et al.*, 1990).

Con objeto de detener la oxidación se transfirieron los explantes a una solución con alta concentración de antioxidantes con ácido cítrico (500mg/L) y ácido ascórbico (500mg/L) y BAP (30mg/L) durante dos horas, lo que se conoce como pulsos hormonales. La inmersión temporal de los explantes por un tiempo corto en elevadas concentraciones de citocininas se ha reportado como una técnica que permite aumentar la cantidad de respuestas morfogénicas en los explantes durante la inducción (Cañal *et al.*, 2001), se ha probado en *Aloe vera* con una inducción de Kin y BAP (25mg/L y 50mg/L respectivamente) por 30, 60 y 90 minutos (Vílchez *et al.*, 2007) y en *Bencomia exstipulata* con BA (100mg/L y 200mg/L) por 2 horas (Tacoronte *et al.*, 2008), por lo que se propuso esta estrategia para *Astrophytum caput-medusae*; no obstante, no se registró mejoría en este ensayo (Fig. 30). Esto tiene además un sustento en donde los reguladores de crecimiento vegetal tienen un papel preponderante, ya que en *Astrophytum capricorne* la ausencia de fitohormonas desembocó en la necrosis de los explantes, aún cuando procedían de plántulas germinadas *in vitro* (Garza, 2010).



Figura 30. Explantes después de un mes de realizar un baño con antioxidantes (ácido cítrico/ácido ascórbico), en donde se observó que persistió la condición de oxidación. Fotografías de Alejandro Camargo.

Otra estrategia que se probó para detener el proceso oxidativo fue el uso de adsorbentes como el PVP. Se incorporó PVP (1g/L) a los explantes con lo cual se detuvo parcialmente la oxidación, ya que prolongó el tiempo en que los cultivos permanecían en buen estado; no obstante, con el paso del tiempo y de los subcultivos se llegaba a una condición de necrosis. Al respecto Pérez *et al.* (1998) mencionan que la adición de PVP en *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis* o *Coryphantha clavata*, *Coryphantha durangensis* y *Nyctocereus serpentinus* controló parcialmente los procesos oxidativos. Por su parte Hernández (2013), reporta para *A. caput-medusae* una pérdida de 40% del total de explantes por procesos oxidativos después de retardar la oxidación con ácido cítrico y ácido ascórbico. En consecuencia, sustituyó el uso de antioxidantes con PVP (1g/L), con lo que se corrigió el oscurecimiento de los explantes. Esto contrasta con la presente investigación ya que la adición de PVP sólo tuvo un efecto retardante en los procesos oxidativos, pero no se controlaron.

La última estrategia que se manejó en el control del oscurecimiento de los explantes fue el uso de puentes de papel. Estos fueron desarrollados por Heller 1953 como medios de soporte en el medio líquido (Soto, 2013) y permiten que las sustancias exudadas por los explantes se laven en el medio para no dañar las áreas circundantes donde se producen. En este sentido Murashige (1973) mencionó que el estado físico del medio es un factor determinante en la respuesta de los explantes. Por lo anterior la estrategia fue aplicada tanto en explantes que ya presentaban un daño visible, como en aquellos en donde apenas se iniciaba su

cultivo (Fig. 31). Del mismo modo que las estrategias anteriores, no fue suficiente para detener el oscurecimiento de los explantes, pero retardó el proceso oxidativo comparado con el uso de antioxidantes. En contraste el empleo exitoso de puentes de papel ha sido reportado para *Echinocactus grusonii* en el que se obtuvo una menor oxidación en los explantes, así como un crecimiento más acelerado con lo que se obtuvieron ciertas ventajas como un crecimiento más acelerado y mayor número de brotes (Soto, 2013). De igual manera Pérez (2015) reportó una mejor respuesta en la producción de brotes tanto vía directa como indirecta en puentes de papel.

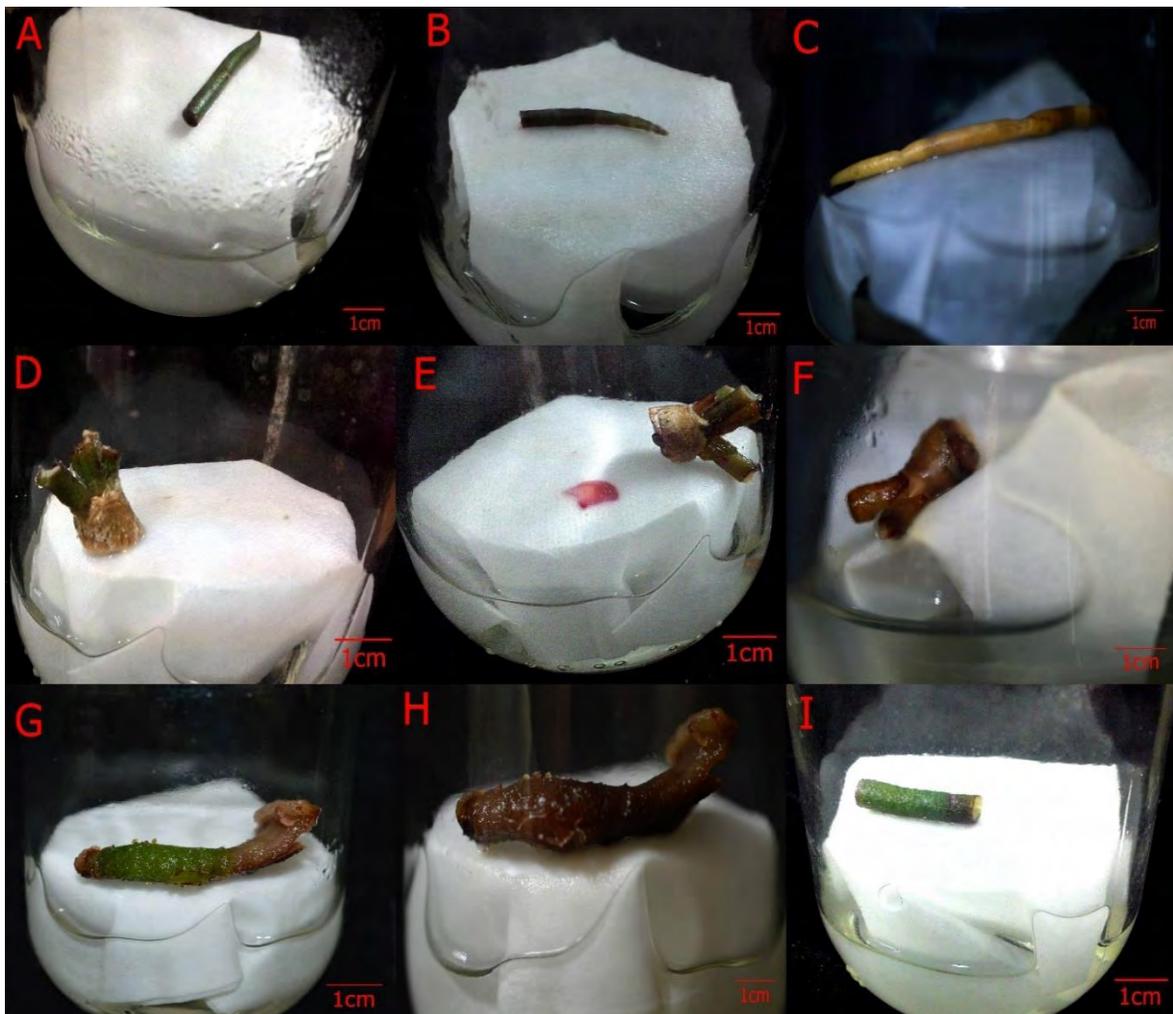


Figura 31. Oxidación en explantes de *A. caput-medusae* cultivados en puentes de papel. A-C) Oscurecimiento de la parte apical de un tubérculo. C) Pérdida de coloración en parte apical de tubérculo. D-E) Oxidación gradual en explante de tallo, se observó la pigmentación del papel filtro debido a la exudación de compuestos fenólicos. G-H) Oscurecimiento gradual de tubérculo. I) Inicio de proceso oxidativo, empezando por la zona de corte. Fotografías de Alejandro Camargo.

A diferencia del medio sólido, en los puentes de papel se observó una mayor exudación al inicio del cultivo, que se prolongó además varias semanas; por otra parte, en el medio sólido la exudación fue menor, pero se caracterizó por provocar el oscurecimiento de los explantes. Esto es similar a lo reportado por Flores (2004) quien menciona que la germinación en puentes de papel provocó oxidación en *Pelecypora strobiliformis*. Así también Fernández (2014) observó una fuerte exudación de compuestos que tiñeron el papel filtro, en todos los tipos de explante en *Backebergia militaris*.

Ensayos a alta concentración de RCV

Formación de callo

En los primeros días de cultivo en *A. caput-medusae* se observó la aparición de protuberancias nodulares en la epidermis de los tubérculos, de coloración café o blanquecina y con apariencia de callo, Estas zonas no fueron proliferativas ya que su tamaño no incrementó a lo largo del ensayo, además no se registró una organización definida; sin embargo, se mantuvieron durante todo su cultivo. Así también se observó la ruptura de la epidermis en algunos tubérculos (Fig. 32).

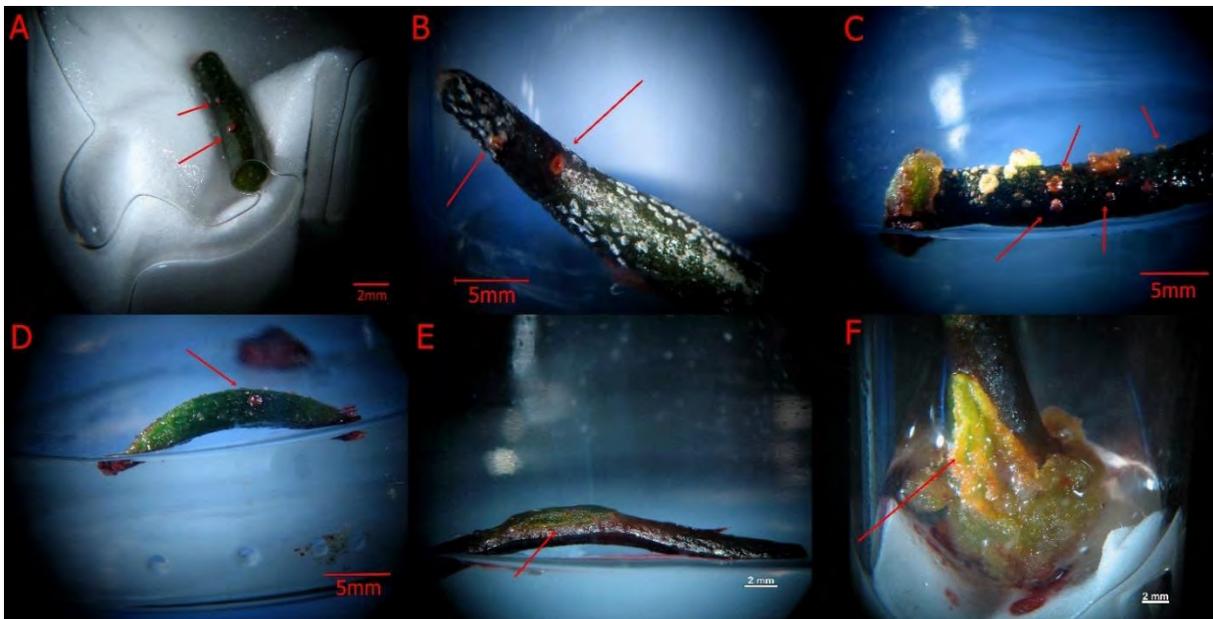
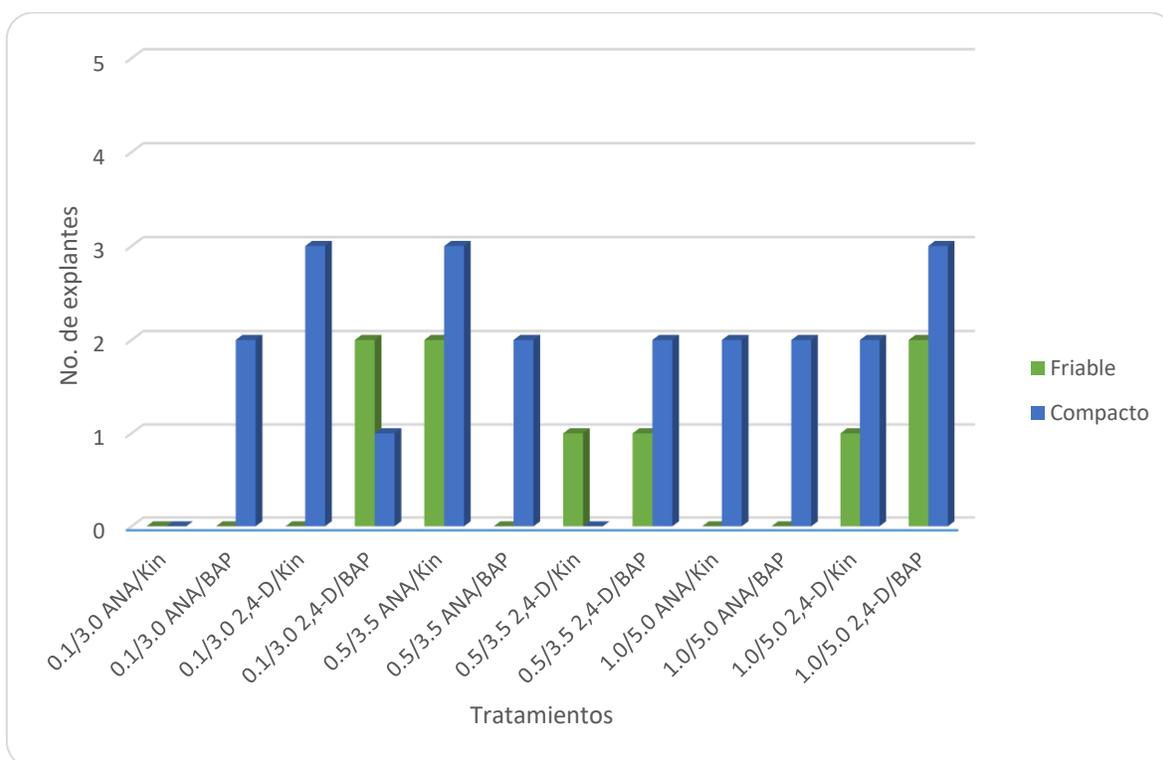


Figura 32. Primeras respuestas en *A. caput-medusae* durante su cultivo en tubos de ensayo. A-D) Formación de estructuras circulares, de color café y apariencia de callo, no proliferativo. E-F) Ruptura de la epidermis por hidratación de los tejidos. Fotografías de Alejandro Camargo.

De los 12 tratamientos, 11 tuvieron formación de callo, con un total de 47% de los explantes (Gráfica 5). Todos los explantes que generaron callo fueron secciones de tubérculos, mientras que los explantes de tallo no tuvieron una respuesta favorable a su cultivo *in vitro*, teniendo como principal respuesta la ruptura de la epidermis en los tubérculos adyacentes (Fig. 33), lo cual es un hecho que contrasta con la literatura, ya que en esta porción está definida la zona meristemática; sin embargo esto puede ser consistente con lo reportado por Karimi *et al.* (2010), quienes encontraron que en las secciones de explantes con una porción meristemática no se presentó la formación de callo. De los dos tipos de auxinas, la que presentó mejor respuesta para la formación de callo fue el 2,4-D; por otro lado, no se observó una tendencia clara con respecto al tipo de citocininas para la formación de callo.



Gráfica 5. Cantidad de explantes de *A. caput-medusae* que respondieron a la formación de callo durante la reducción del volumen de la atmósfera.

Los reguladores ensayados en esta investigación han demostrado ser buenos promotores de la formación de callo. En este sentido los resultados concuerdan con los reportados por Wakhlu y Bhau (2000), quienes observaron la formación de callo después de dos semanas en tubérculos de *Coryphantha elephantidens*, además se registró que de 3 tipos de auxinas (2,4-D, AIA y AIB), el 2,4-D resultó el mejor promotor de esta respuesta. De igual manera Gómez (2008), reportó la formación de callo a las 16 semanas de iniciado el cultivo con combinaciones de ANA, 2,4-D, BAP y Kin. En el caso de *Astrophytum capricorne* la formación de callo

se obtuvo con una inducción hormonal de 2,4-D, BAP y Kin después de un mes de la inducción (Garza, 2010). Mientras que en *Epithelantha micromeris* Velázquez y Soltero (2001), registraron una respuesta eficiente a altas concentraciones (8mg/L) de ANA/ Kin. Por otra parte, la presencia de 2iP no fue suficiente para generar callo en *Lophophora williamsii*, por lo que Esparza (2004), recomienda el uso de otros reguladores de crecimiento para detonar esta respuesta.

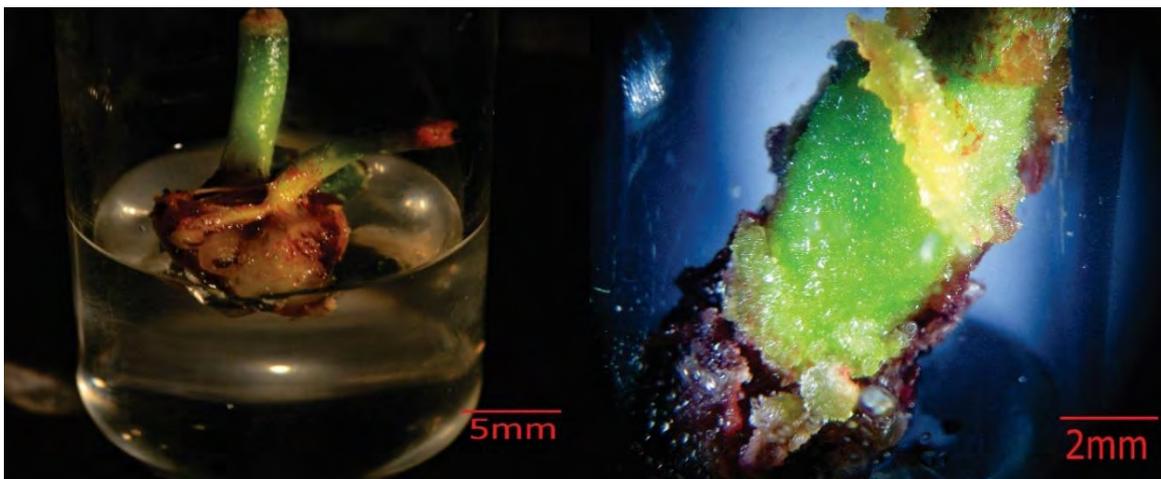


Figura 33. Explante de tallo cultivado con 0.5mg/L de ANA y 3.5 mg/L de Kin en tubos de ensayo. Se observó que después de 6 meses de cultivo no se presentó crecimiento, formación de callo u organogénesis. Fotografías de Alejandro Camargo.

El porcentaje de formación de callo en el ensayo con altas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal fue mayor al ensayo con bajas concentraciones. Debido a que en la mayoría de los tratamientos se observó esta respuesta, incluyendo a los tratamientos con ANA y BAP, se puede concluir que la concentración de los reguladores es el factor determinante en la inducción de las respuestas proliferativas. También es importante mencionar que la reducción de la atmósfera en 65% podría estar jugando un papel importante en las respuestas observadas en este ensayo.

El callo que se formó fue de dos tipos. El primero compacto, de coloración verde brillante y en algunos casos de aspecto semejante a nieve, poco proliferativo y difícil de seccionar con el instrumental (Fig. 34). El segundo tipo fue callo de tipo friable, en menor número de explantes que el compacto, de coloración verde a café, de apariencia oxidada, pero con mayor proliferación que el compacto, se disgregaba al realizar la manipulación con el instrumental (Fig. 35). En ambos tipos se observó que se generó a partir de las zonas del corte. Esto contrasta con el callo obtenido en el ensayo previo, donde el callo fue poco proliferativo y de aspecto compacto en todo momento. Sarasan *et al.*, (2006) mencionan que la inducción y multiplicación *in vitro* puede ser difícil para algunas especies, debido a que necesitan una concentración de nutrientes y de fitohormonas muy específicas. Lo

anterior se vio reflejado en *A. caput-medusae*, donde un cambio de condiciones detonó otro tipo de respuestas. Es así que se ha reconocido que la optimización de los procedimientos demanda numerosos experimentos (Maschke *et al.*, 2014).

En otros trabajos se ha observado que el cambio en las condiciones de cultivo ha generado respuestas distintas. Por ejemplo, en *Coryphantha elephantidens* se obtuvo un callo distinto en función del tipo de regulador adicionado; cuando se agregó 2,4-D se generó un callo traslúcido y friable, mientras que cuando se adicionó Kin el callo fue del tipo compacto y de coloración verde (Wakhlu y Bhau, 2000). Algo similar reportó Manzo, (2010) en *Echinocactus platyacanthus*, ya que se observaron callos compactos cuando el medio fue suplementado con 2iP, no obstante, cuando se cambió de regulador a TDZ el callo formado fue del tipo friable, con abundante lana.

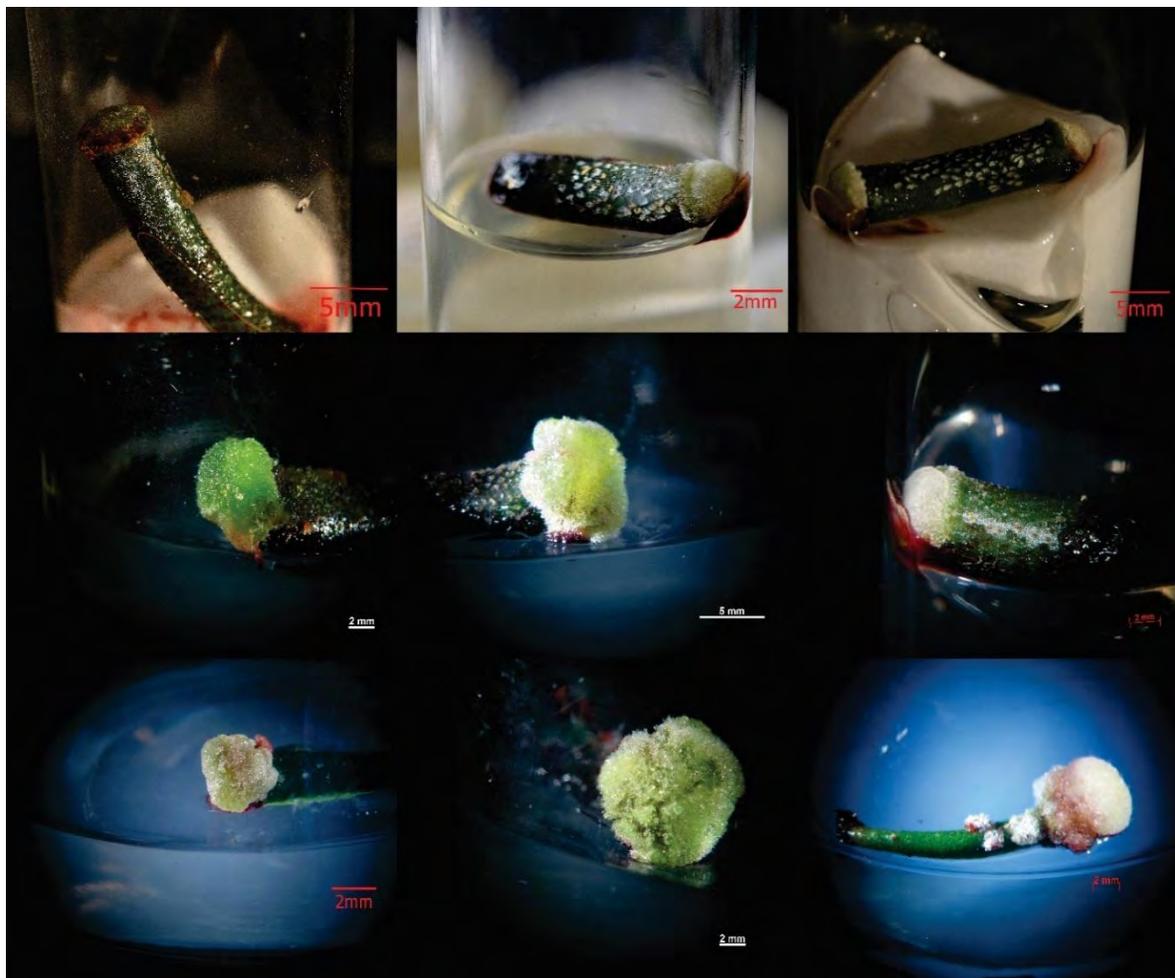


Figura 34. Formación de callo en explantes de tubérculos en *A. caput-medusae*. El tipo de callo observado es del tipo compacto, de coloración variable. Fotografías de Alejandro Camargo.

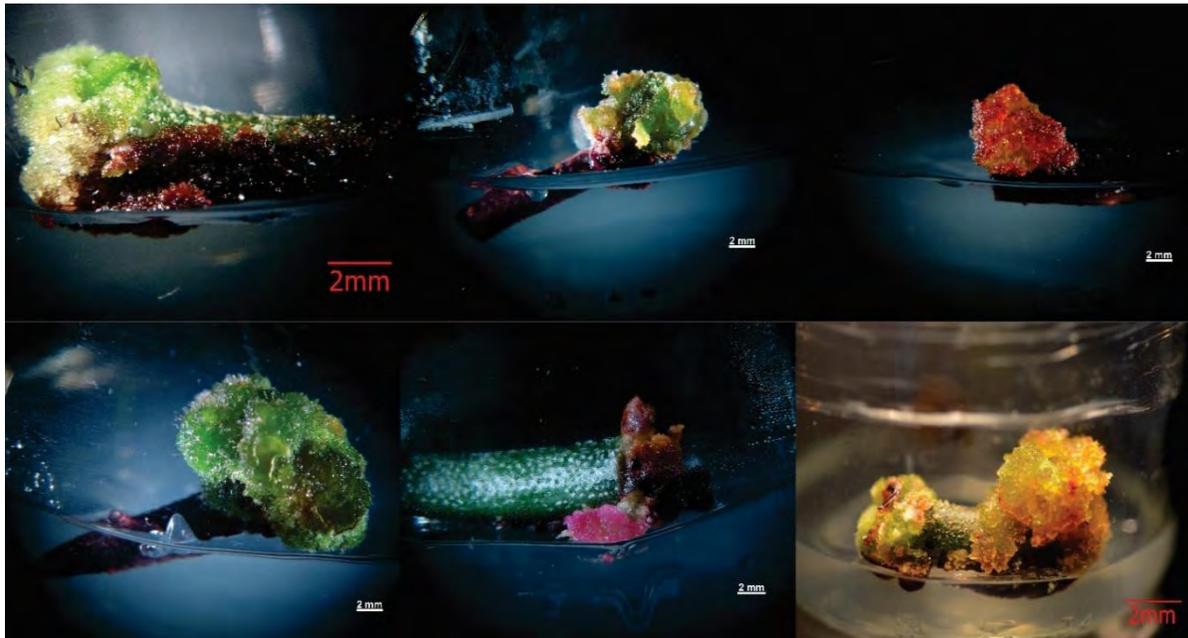


Figura 35. Formación de callo friable en tubérculos de *A. caput-medusae*. Se observa hidratado, de coloración variable, abundante, con origen de la zona de corte. Fotografías de Alejandro Camargo.

Respuestas morfogénéticas

El callo que se formó en *A. caput-medusae* no fue regenerativo, no obstante, sí se registró organogénesis directa. Se observó la formación de tres brotes vía directa a partir de la aréola florífera, lo que indica que fue por la activación de yemas preformadas (Fig. 36). Los brotes se dieron en los tratamientos 18 (0.5/3.5mg/L ANA/Kin), 19 (0.5/3.5mg/L ANA/BAP) y 25 (1.0/5.0mg/L 2,4-D/BAP). La regeneración se presentó en todos los casos en explantes de tubérculo; para el tallo no se observó ni callo ni brotes. Los brotes generados presentaron una morfología distinta, uno tuvo una morfología similar a los botones florales, con abundante lana y alargado, mientras que los dos restantes tuvieron una morfología similar a la descrita por Hernández (2013), de estructura globular, con prolongaciones en el ápice simulando tubérculos, con lento crecimiento y de aspecto hinchado. Estos últimos se oxidaron después de varias semanas.

Distintos tipos de reguladores han sido explorados en la familia Cactaceae, con respuestas altamente variables. Pérez (2011), reportó en *Hylocereus undatus* 43 brotes por explante y en *H. megalanthus* 69 brotes por explante a partir de la combinación de tres tipos de auxinas (ANA, AIA y 2,4-D) y tres de citocininas (BAP, 2iP y TDZ), con una respuesta más eficiente con ANA/BAP. En *Opuntia lanigera* se probaron tres citocininas (BAP, Kin y DAP), en donde el BAP tuvo una mejor respuesta, con alrededor de tres veces más brotes que con los otros reguladores

(Estrada-Luna *et al.*, 2008). Por su parte Molphe-Bach y Dávila-Figueroa (2002), realizaron ensayos con tres citocininas (BAP, 2iP y TDZ) en *Pelecocyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*, con una mejor respuesta con BAP. Esto implica que el tipo de reguladores de crecimiento vegetal utilizado durante el periodo de inducción puede ser muy específico, en este sentido Clayton *et al.* (1990), obtuvieron respuestas muy disímiles en 11 especies de cactáceas al probar diferentes auxinas (Picloram, AIA, IBA, ANA). Para especies del género *Escobaria*, *Mammillaria*, *Sclerocactus* y *Pediocactus* el BAP no tuvo una buena eficiencia en la activación de areolas, mientras que la Zeatina con altas concentraciones indujo respuestas morfogénéticas en todos los géneros (Clayton *et al.*, 1990).

Los brotes generados en esta investigación se formaron en distintas condiciones a las que reportó Hernández (2013), quien obtuvo sus brotes a bajas concentraciones de citocininas, mientras que en este trabajo se generaron a altas concentraciones. Gratton y Fay (1999), recomiendan el uso de altas cantidades de citocininas en la familia Cactaceae, para promover respuestas regenerativas. De igual manera Clayton *et al.* (1990) observaron una mejor respuesta a altas concentraciones de citocininas en *Escobaria missouriensis*, *Sclerocactus spinosior*, *Pediocactus despainii*, *P. winkleri* y *Toumeyia papyracantha*. La baja concentración de reguladores también tuvo un efecto negativo en *Stenocereus stellatus*, ya que se vio un crecimiento lento (Martínez *et al.*, 2001).

Los rendimientos reportados en este trabajo contrastan con lo que reportó Pérez *et al.* (1998), quienes obtuvieron 9.8 brotes por explante en *Astrophytum myriostigma* o lo obtenido por Morales (2000), quien tuvo un total de 9 brotes por explante en *Hylocereus undatus*. No obstante, una respuesta deficiente se ha observado en otras especies, en *Coryphantha elephantidens* se registró un promedio de 1.6 brotes por explante (Singh, 1999). Mientras que en *Ariocarpus bravoanus* se observó la formación de un solo brote a partir de 78 explantes (Gómez, 2008).

Además de la diferencia en las condiciones de cultivo reportadas en este estudio contrastado con Hernández (2012), se encontró que la morfología de uno de los brotes generados fue distinta. Dos de los brotes generados tuvieron un aspecto globoso y con una porción de callo en la base, similar a los brotes reportados por Hernández (2012). Sin embargo, en otro la morfología fue de apariencia más similar a la morfología en la especie (Fig.34).

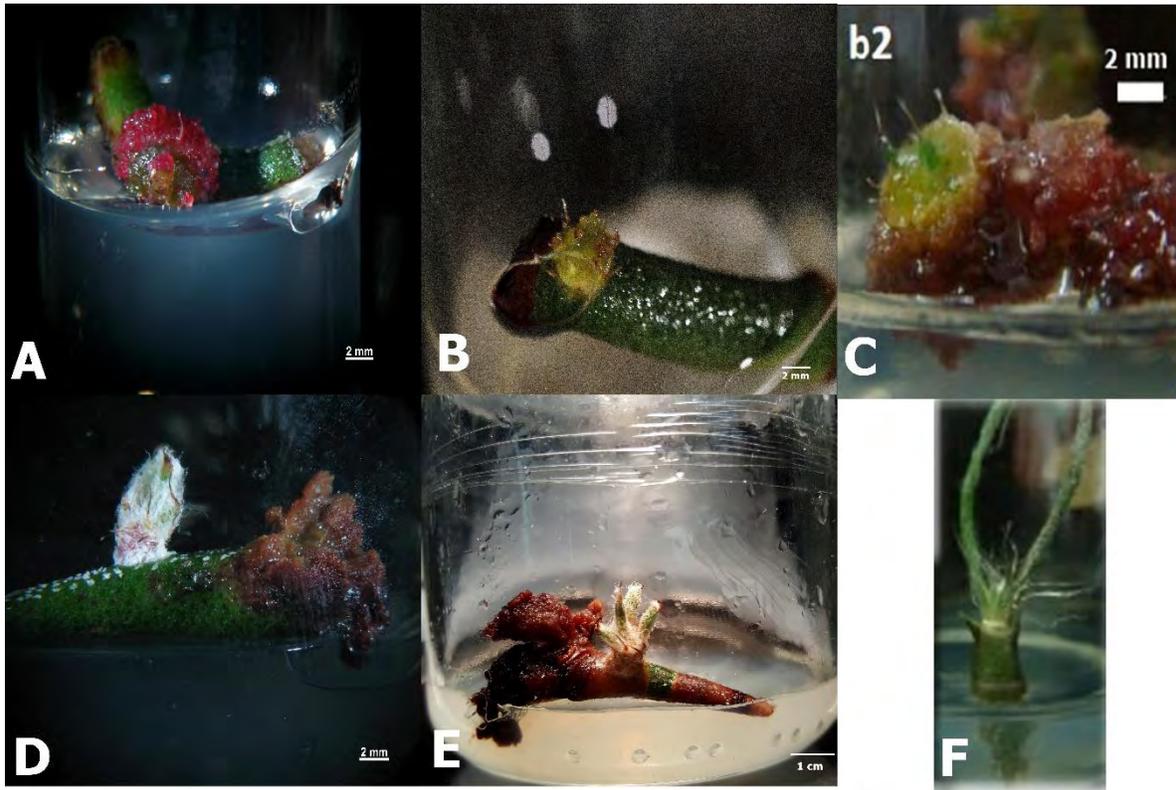


Figura 36. Formación de brotes de manera directa en explantes de tubérculo en *A. caput-medusae*. A-B) Tubérculos de aspecto globular, de baja proliferación y aspecto hidratado; C) Brote reportado por Hernández (2012) como comparación para lo reportado en el presente estudio; D-E) Brote morfológicamente normal; D) después de 5 meses de cultivo; E) después de 10 meses de cultivo; F) plántula germinada in vitro reportada por Hernández (2012). (A-E: Fotografías de Alejandro Camargo; F: Fotografía Hernández (2012)).

Se observó además la formación de raíces en tres explantes de tubérculo (5.6%), de los tratamientos 17, 19 y 21. En uno de ellos se registró una oxidación severa previa a la formación de las raíces (Fig. 37). En todos los casos se formó una fase previa de callo, sin embargo, se consideró que las raíces se originaron directamente del explante, pues se observó que se formó muy cercano a la epidermis del tubérculo y no del callo en sí; además en ningún momento se observó la formación de meristemoides.

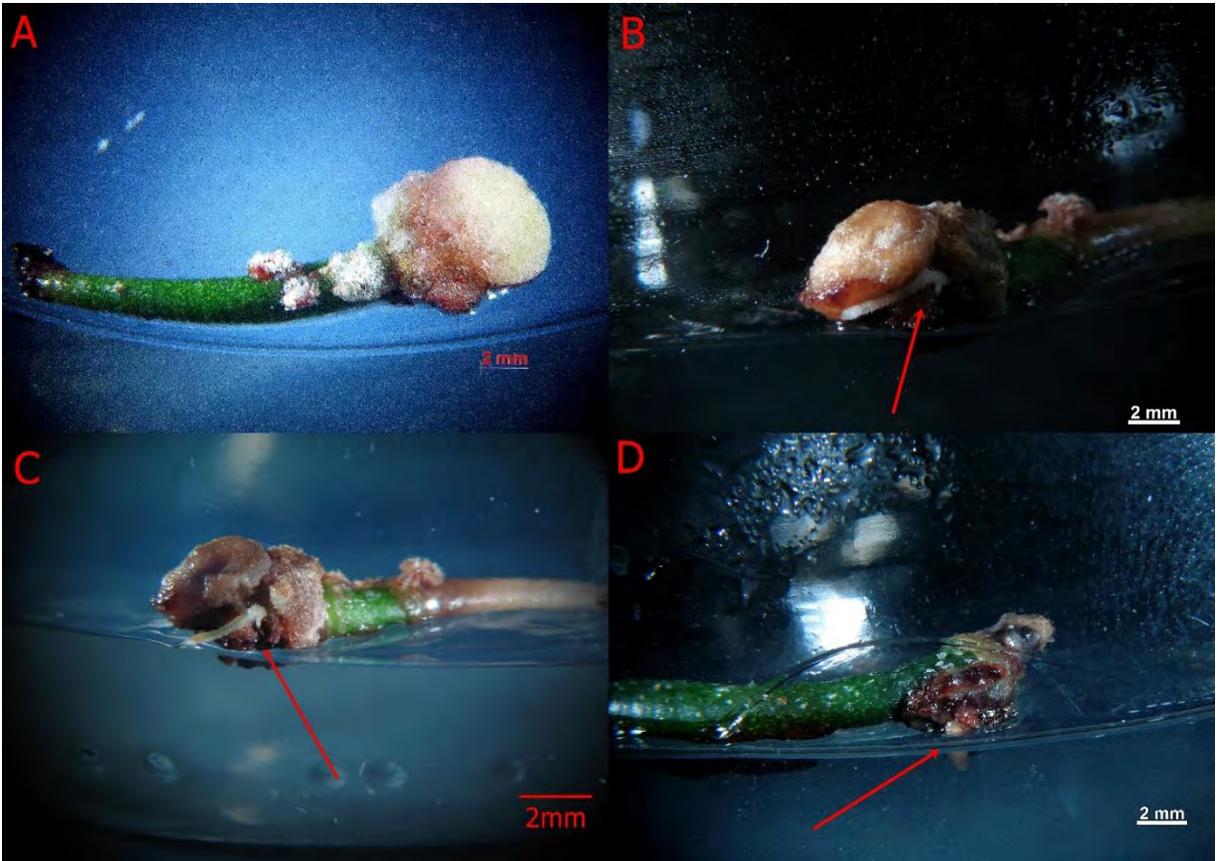


Figura 37. Formación de raíz a partir de tubérculos en *A. caput-medusae*. A-C) Proceso oxidativo y formación de raíz, con seguimiento cada 60 días. D) Formación derivado de ruptura de la epidermis después de cuatro meses de cultivo. Fotografías de Alejandro Camargo.

En el cultivo de tejidos vegetales, algunas especies presentan poco potencial de proliferación y regeneración, a las cuales se les ha denominado recalcitrantes. Esta característica se ha observado en plantas perennes, con largos ciclos de vida; superar esta condición en el ambiente *in vitro* resulta un reto, ya que la recalcitrancia está determinada a nivel genético por lo que es difícil superarla cambiando la composición del medio o las condiciones de cultivo (Belokurova, 2009). Debido a los resultados obtenidos en la presente investigación, así como los resultados de Hernández (2013) se podría considerar que *A. caput-medusae* se comporta como una especie recalcitrante.

Oxidación y supervivencia.

En este ensayo se registró una fuerte exudación de fenoles hacia el medio de cultivo; sin embargo, este evento fue en menor proporción que en el ensayo previo. Se manifestaron al igual que con los explantes sembrados a baja concentración de RCV dos periodos de estrés oxidativo, el primero al momento del corte y el segundo después de varios subcultivos (Fig. 38). Las estrategias que se adoptaron para contrarrestar la situación consistieron en la reducción de la atmósfera, que se evaluó cultivando los explantes en tubos de ensayo; adición de antioxidantes (250mg/L de ácido cítrico y ácido ascórbico) y de PVP (2g/L) al medio. Bajo estas condiciones se observó una reducción sustancial de los procesos de oxidación durante los tres primeros meses de cultivo, contrario a lo que se observó en el ensayo con bajas concentraciones de RCV y con un volumen de atmósfera mayor. No obstante, al final del ensayo se registró 18.9% de oxidación ligera, 1.9% de oxidación moderada y 79.2% de oxidación severa (Tabla 12).

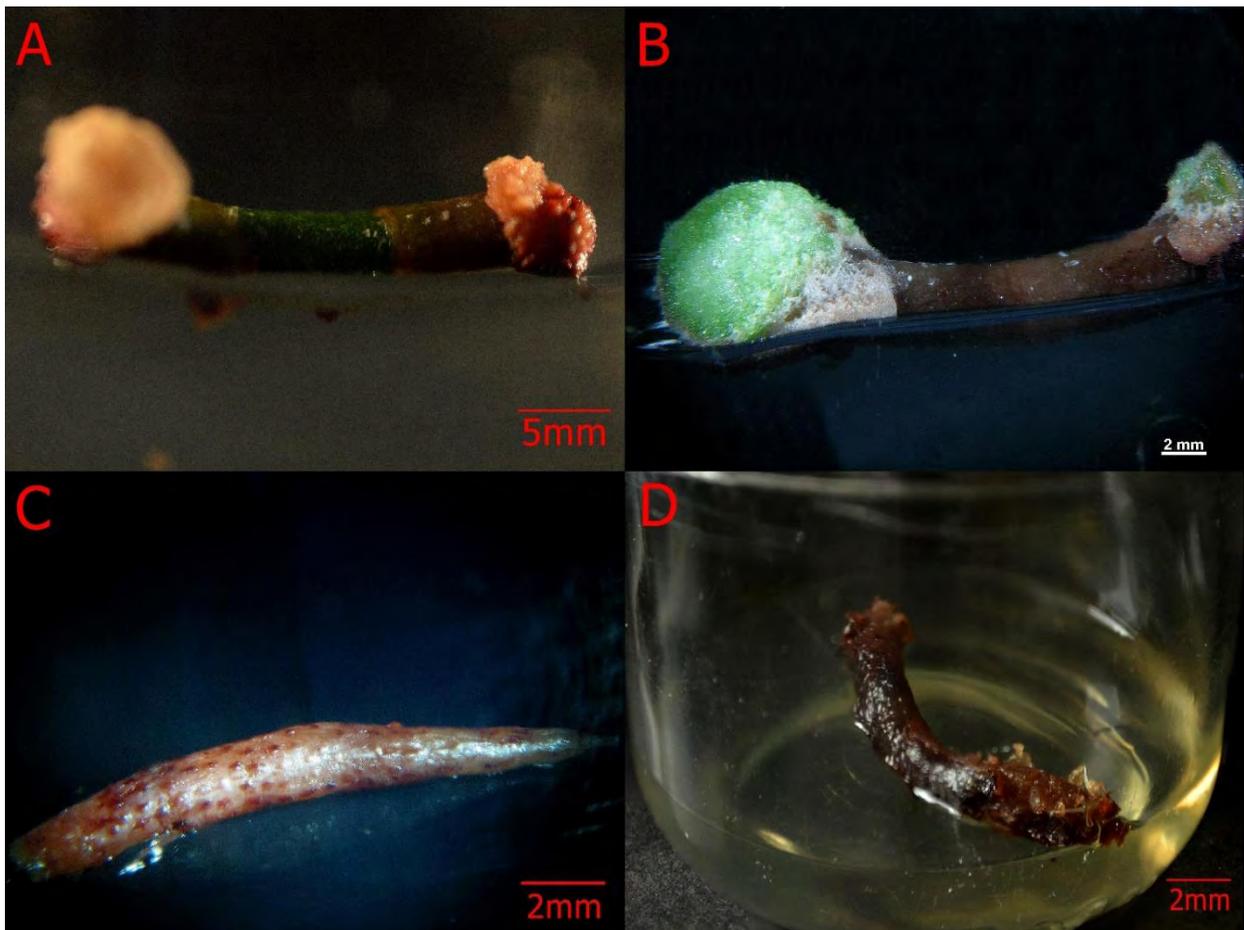


Figura 38. Etapas de oxidación en explantes de *A. caput-medusae*. A-B) Oxidación al inicio del cultivo, el explante inicial se oscurece totalmente, pero hay proliferación celular. C-D) Oxidación después de un par de subcultivos (tres meses) a medio fresco. Fotografías de Alejandro Camargo.

Tabla 12. Grado de oxidación en explantes de *A. caput-medusae* al reducir el volumen de la atmósfera.

| Tx | RCV (mg/L) | Ligero | Media | Severa |
|-----------|-------------------|---------------|--------------|---------------|
| 1 | 0.1/3.0 ANA/Kin | 1 | 0 | 1 |
| 2 | 0.1/3.0 ANA/BAP | 0 | 0 | 3 |
| 3 | 0.1/3.0 2,4-D/Kin | 2 | 0 | 2 |
| 4 | 0.1/3.0 2,4-D/BAP | 0 | 0 | 2 |
| 5 | 0.5/3.5 ANA/Kin | 3 | 0 | 6 |
| 6 | 0.5/3.5 ANA/BAP | 1 | 0 | 5 |
| 7 | 0.5/3.5 2,4-D/Kin | 0 | 0 | 1 |
| 8 | 0.5/3.5 2,4-D/BAP | 0 | 0 | 4 |
| 9 | 1.0/5.0 ANA/Kin | 1 | 0 | 6 |
| 10 | 1.0/5.0 ANA/BAP | 1 | 0 | 5 |
| 11 | 1.0/5.0 2,4-D/Kin | 1 | 0 | 6 |
| 12 | 1.0/5.0 2,4-D/BAP | 1 | 1 | 5 |

El intercambio gaseoso ha recibido poca atención, Buddendorf-Joosten y Woltering (1994) reconocen que, aunque el medio nutritivo sea óptimo para una especie, el tipo de contenedor y el grado de intercambio atmosférico altera el crecimiento y desarrollo celular. Se observó que reducir el volumen de la atmósfera redujo considerablemente los exudados al medio de cultivo y con ello una condición estable durante un mayor tiempo en el cultivo. Al respecto Azofeita (2009) enmarcó que en cultivo *in vitro* como respuesta al estrés generado por los cortes y los agentes desinfectantes abrasivos se desencadenan una producción elevada de especies reactivas de oxígeno en donde el volumen de la atmósfera y tipo de frasco utilizado tienen participación. En este sentido George *et al.* (2008), indican que este proceso tiene menor impacto si hay una limitada disponibilidad de oxígeno en el recipiente utilizado; además reducir la cantidad de oxígeno disponible puede ser tan eficiente como agregar sustancias inhibitoras de la oxidación de los fenoles. Además de inhibir la oxidación de los fenoles, una menor cantidad de oxígeno contribuye a reducir la síntesis de etileno, ya que su precursor (ACC) no puede ser oxidado (George *et al.*, 2008); lo anterior resulta benéfico, pues la acumulación de etileno en la composición gaseosa puede ser limitante del desarrollo celular (Saran y Kumar, 2013). Por otra parte, reducir la cantidad de exudados liberados permite mantener la capacidad proliferativa de los explantes (Azofeita, 2009).

El origen del explante ha sido vinculado con el grado de oxidación en sus tejidos (Pérez, 1998). En explantes de semilla la oxidación no suele representar un problema en el cultivo *in vitro*, lo cual es corroborado por la investigación realizada por Hernández (2013), quien obtuvo a partir de plántulas germinadas *in vitro* de *A. caput-medusae* una oxidación que permitió en todo momento observar la

proliferación celular. En contraste con este trabajo, el estrés oxidativo para la presente investigación fue severo; las estrategias adoptadas permitieron mitigar los procesos y observar respuestas regenerativas. Sin embargo, el grado de oxidación que se observó fue una barrera que limitó el desarrollo celular en el ambiente *in vitro*. Us-Camus *et al.* (2014) menciona que en la activación del crecimiento y proliferación celular es necesario que se coordinen los factores genéticos y epigenéticos implicados, lo que refleja la plasticidad del organismo; se ha observado además que la adición exógena de reguladores de crecimiento vegetal permite que se exprese dicha plasticidad.

A. caput-medusae puede considerarse como recalcitrante, debido a su crecimiento lento y alto contenido de compuestos fenólicos en sus tejidos y condiciones muy específicas para su cultivo, características reconocidas por Belokurova (2009) y que se observaron en la presente investigación y en lo que reportó Hernández (2013). Parte de esta recalcitrancia, así como la hiperhidratación y baja calidad fisiológica (estomas atrofiados, carencia de ceras, alteraciones en la fotosíntesis) pueden tener como elemento común la participación del estrés oxidativo (Cassels y Curry, 2001).

Los avances en el cultivo de tejidos vegetales se han dado en el tema de los medios de cultivo y componentes del ambiente gaseoso. No obstante, esto no ha sido suficiente como se observó en este trabajo, por lo que se deberá desentrañar el complejo genético que envuelve a los procesos regenerativos en el cultivo *in vitro*, para ayudar a regenerar a aquellas especies con una condición recalcitrante (Phillips, 2004).

DISCUSIÓN GENERAL

El desarrollo de nuevas técnicas de propagación o mejorar la eficiencia de las ya existentes es una acción deseable para conservar y aprovechar de manera sostenible los recursos genéticos y naturales de las especies de cactáceas que se distribuyen en nuestro país (Pérez et al., 1998). En este sentido para las especies tratadas en esta investigación se propuso realizar la multiplicación por cultivo de tejidos, que, si bien ya contaban con antecedentes por esta técnica, los protocolos desarrollados encontraron dificultades en su propagación. De los trabajos de Gracidas et al., 2010 y Hernández (2013), se desprenden problemáticas para llevar a cabo el cultivo *in vitro* para *Mammillaria luethyi* y *Astrophytum caput-medusae*, dentro de las que destaca la contaminación durante el establecimiento de los explantes y altas tasas de oxidación. La falta de un protocolo de propagación bien establecido agrava la situación en la que se encuentran estos organismos, pues siguen siendo saqueadas sus poblaciones e incrementa su demanda como plantas ornamentales. Para poder optimizar los procedimientos es necesario realizar numerosos experimentos (Maschke et al., 2014), sin embargo, cuando se trabaja con especies en peligro de extinción el material disponible es limitado, con lo cual las condiciones que se ensayan tienen que ser basadas en experiencias previas, para de esta forma asegurar en cierta medida una mayor disponibilidad de material biológico.

Los métodos de desinfección propuestos en este trabajo fueron eficientes para *Astrophytum caput-medusae*, no así para *Mammillaria luethyi*. A pesar de que se trataron orígenes diferentes en los explantes de Hernández (2013), se puede constatar que los porcentajes de contaminación son bastante bajos para esta especie. Hernández (2013) reportó un 0% de contaminación para explantes de semillas y en este trabajo se reporta alrededor de 2% de contaminación. Con respecto *M. luethyi* el porcentaje de contaminación fue mayor. No obstante, los resultados obtenidos en esta investigación son más favorables que los de Gracidas et al. (2010) quienes reportan un 72.2% de contaminación contra un 60% del presente trabajo. Por su parte Escobedo et al., (2004) no precisan este dato, por lo que no pueden ser comparados.

El uso de fungicidas arrojó resultados aceptables para la esterilización superficial de los explantes, sin embargo, esto conllevó a su vez a una mayor oxidación. Por otro lado, el uso de Soluvet® no tuvo efectos perjudiciales durante el establecimiento de la especie. Es interesante señalar que de los explantes contaminados de *A. caput-medusae* fueron en general de las secciones de tallo, que dada la morfología de la especie es un resultado esperado, mientras que para *M. luethyi* la morfología de las espinas podría impedir que el agente desinfectante penetre y esterilice la superficie del tejido. Los tratamientos propuestos en este trabajo deberán ser modificados para establecer con éxito a la especie *M. luethyi*, pero para *A. caput-medusae* se podría considerar para futuras referencias.

Una vez superados los problemas de contaminación, se debe asegurar que la oxidación de los explantes no sea un factor limitante en el desarrollo de los explantes. Similar a lo que reportaron Gracidas *et al.* (2010) y Hernández (2013) la oxidación en ambas especies es un factor limitante en su propagación. Para *A. caput-medusae* la oxidación fue letal para la mayoría de los explantes, además en muchas ocasiones evitó que se observaran respuestas regenerativas, con lo cual se eliminó la posibilidad de obtener nuevos individuos. Pérez *et al.*, 1998 encontraron una relación entre el tipo de explante y su grado de oxidación, con menor oxidación en estadios más jóvenes. Esto se corrobora con la tesis de Hernández (2013) quien a partir de semillas logró establecer *in vitro* plántulas de *A. caput-medusae* con menores porcentajes de oxidación en comparación con este estudio, que partió de plantas adultas. Por otra parte, en *M. luethyi* los porcentajes de oxidación se lograron reducir con respecto a lo reportado por Gracidas *et al.* (2010) quienes tuvieron una oxidación de alrededor del 60% mientras que en este trabajo se reporta un porcentaje cercano al 50%. En este sentido los resultados fueron más favorables para *M. luethyi* que para *A. caput-medusae*.

De acuerdo a Zaid, 1987 existen dos periodos de oxidación en el cultivo *in vitro*, el primero se da a los 10 días aproximadamente y se debe a los cambios fisiológicos que resultan de la escisión de la planta madre, mientras que el segundo se da a los 25 días o más y es atribuido a la senescencia del explante en sí. Este fenómeno se observó en ambas especies, pero más marcado para *A. caput-medusae* en donde la oxidación fue letal. Las estrategias implementadas para ambas especies no resultaron en los ensayos a baja concentración de reguladores de crecimiento. Sólo cuando se adoptaron múltiples estrategias se solucionó la limitante del oscurecimiento de los explantes, con lo que se lograron observar respuestas regenerativas. La estrategia más importante en el control de la oxidación fue la reducción del volumen de la atmósfera. Se observó que ambas especies tuvieron una recaída en su condición al momento de transferir los explantes de tubos a frascos gerber, sin embargo, mejoró su condición al regresarlos a tubos de ensayo aun sin reguladores de crecimiento.

Con respecto a los reguladores de crecimiento ensayados, el juego hormonal propuesto por Gracidas *et al.* (2010) y Hernández (2013) no tuvo un efecto favorable en este trabajo. Debido a lo anterior se tuvieron que modificar los esquemas iniciales de siembra y se propusieron explorar 2 reguladores más (Kin y 2,4-D), así como incrementar la concentración. Resulta interesante que en estas nuevas condiciones fue posible observar respuestas regenerativas para ambas especies, lo cual no se observó con las condiciones inicialmente propuestas.

En *M. luethyi* se obtuvieron mejores resultados con Kin, mientras que en *A. caput-medusae* se observó una mejor respuesta con BAP; respecto a las auxinas, en ambas especies se registró una respuesta más favorable con ANA que con 2,4-D. Para *M. luethyi* se registró además la formación de brotes por organogénesis directa, lo cual no se había reportado previamente para la especie. Esto supone un gran avance, ya que la organogénesis directa permite la obtención de nuevos individuos sin variación somaclonal, es decir, con una mayor estabilidad genética. Debido a lo anterior los resultados son más deseables para aspectos de

conservación de la especie. Por otra parte, en *A. caput-medusae* se registraron brotes morfológicamente distintos a los reportados por Hernández (2013), de apariencia más apegada a lo natural, por lo que esta respuesta deberá explorarse en otros ensayos.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos de esta investigación demuestran que la propagación *in vitro* para cada especie representa un reto, esfuerzo y capacidad de decisión para superar las barreras que impiden obtener nuevos individuos en cantidad suficiente para satisfacer una demanda creciente en el mercado internacional, lo cual sumado al lento crecimiento, baja tasa de germinación, escasas poblaciones y desconocimiento sobre la biología y ecología de estas especies las pone al borde de la extinción. Se debe agregar que los cambios que está sufriendo el Planeta por acción antropogénica como el calentamiento global, degradación de suelos, contaminación de fuentes de agua potable, así como de la atmósfera y alteración de los ecosistemas, amenaza no solo la integridad de las especies con las que coexistimos, sino también a la especie humana en sí. Por ello es importante realizar esfuerzos encaminados hacia la conservación y el aprovechamiento sustentable de nuestros recursos naturales.

Sería importante por tanto dar continuidad a los resultados obtenidos en la presente investigación y conjuntarlos con las investigaciones de Escobedo *et al.* (2004), Gracidas *et al.* (2010) y Hernández (2013), para culminar con un protocolo de propagación eficiente, que permita propagar estas especies de manera sustentable. Contar con un alto número de individuos a través de la propagación por cultivo de tejidos vegetales no solo permitiría satisfacer la demanda en el mercado como especies ornamentales, sino además realizar estudios sobre la biología de estas especies. La presente investigación aporta alternativas para realizar la desinfección superficial de los explantes sin dañar los tejidos, lo cual puede ser considerado para futuras investigaciones con las especies del presente estudio o con otras que presenten problemas durante su establecimiento *in vitro*. De igual manera se demostró la importancia del volumen de la atmósfera en el estrés oxidativo generado por el ambiente *in vitro*, lo cual cobra peso cuando se dispone de un material biológico limitado.

Se debe poner énfasis en entender las barreras que existen en el cultivo de tejidos vegetales, ya que para especies que se muestran recalcitrantes como el caso de *Astrophytum caput-medusae* (la cual ha desaparecido casi en su totalidad de su ambiente natural) se vuelve crítico obtener nuevos individuos para rescatarla de su extinción. Queda claro que para estas especies resta poco tiempo y mucho camino por desentrañar en los mecanismos que dificultan su cultivo; sin embargo, profundizar en esta área del conocimiento nos permitirá redimir los daños que hemos provocado por años para diversas especies del Planeta.

CONCLUSIONES

Mammillaria luethyi

- La desinfección superficial de los explantes resultó mejor al adicionar fungicidas en solución, pero esto derivó en una mayor oxidación. Es recomendable utilizar concentraciones elevadas de Soluvel® para tener un establecimiento exitoso para esta especie.
- Se mejoró el protocolo de desinfección propuesto por Gracidas *et al.* (2010) al reducir los niveles de contaminación.
- Los procesos oxidativos fueron una limitante durante el cultivo de la especie, que impidió el buen desarrollo de los regenerantes.
- El uso de antioxidantes (ácido cítrico [150mg/L] y ácido ascórbico [150mg/L]), así como de PVP (1g/L) no fueron eficientes en el control de la oxidación.
- El uso de medio líquido con puentes de papel incrementó la severidad en la exudación de los compuestos fenólicos, observándose por mayor cantidad y por un tiempo más prolongado.
- La reducción del volumen de la atmósfera en 65% fue un elemento que permitió reducir considerablemente los procesos de estrés oxidativo, inhibiendo la oxidación de los fenoles exudados al medio.
- La adición exógena de reguladores de crecimiento vegetal a bajas concentraciones tuvo como resultado la formación de callo y organogénesis indirecta.
- La formación de callo se observó con todas las combinaciones hormonales, lo que indicó el potencial proliferativo de la especie. Se observaron mejores resultados bajo la influencia de ANA (Ácido α -naftalenacético) que de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético).
- Se observó una etapa temprana de botones florales que se originaron de la zona de los meristemas floríferos, lo cual no se había reportado en familia Cactaceae.
- La organogénesis por vía directa tuvo un alto rendimiento en número de brotes, sin embargo, éstos tuvieron un desarrollo lento en comparación con la activación areolar
- Se registró la morfogénesis directa por activación areolar con una mayor proporción a concentraciones altas de citocininas (3.5mg/L) y bajas de auxinas (0.5mg/L).

- Se formaron un total de 168 brotes por ambas vías en un plazo de 12 meses. Su sobrevivencia fue variable, con un promedio de 6 meses. Se individualizaron 5 brotes, que no generaron raíz.

Astrophytum caput-medusae

- El establecimiento aséptico de fracciones de tubérculos en *A. caput-medusae* tuvo mayor éxito en un tren de desinfección con Soluvel® al 10%, comparado con el resto de los tratamientos que generaron mayor oxidación para esta especie.

- Los procesos oxidativos fueron letales en la mayoría de los casos, principalmente durante los eventos de subcultivo.

- La incorporación de antioxidantes y de PVP no tuvo buenos resultados en el control de la oxidación.

- El uso de puentes de papel permitió que los compuestos fenólicos se lavaran hacia el medio, pero fueron insuficientes para detener el oscurecimiento de los explantes.

- La reducción del volumen de la atmósfera fue la estrategia con mejores resultados para controlar la oxidación, permitiendo observar respuestas regenerativas bajo esta condición.

- El callo generado fue en su mayoría compacto, de crecimiento lento y no regenerativo. Sólo en algunos tubérculos se presentó callo friable y con mayor tasa de crecimiento, sin embargo, tampoco se observó organogénesis a partir de este.

- Se observó la formación de 3 brotes y de 1 raíz por organogénesis directa. En el caso de los brotes estos fueron de morfología distinta a la descrita por Hernández (2013), lo que sugiere que los brotes globulares podrían ser hiperhidratados.

- La baja capacidad proliferativa, el largo y lento desarrollo, así como la alta producción de fenoles sugieren que esta especie se comporta recalcitrante en el cultivo *in vitro*.

LITERATURA CITADA

Acosta, G.S. 2013. Propagación *in vitro* y caracterización molecular de dos cactáceas mexicanas endémicas y protegidas. Tesis de Maestría, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 156p.

Alanís, G.J., C.G. Velazco, R. Forougbakhch, V. Valdez y M.A. Alvarado. 2004. Diversidad florística de Nuevo León: Especies es categoría de riesgo. Ciencia UANL Vol.VII N°2.

Álvarez, M.G.A y C. Montaña. 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. Acta Botánica Mexicana 40: 43-58.

Amo-marco, J.B y M.D. Lledo. 1996. *In vitro* propagation of *Salix tarraconensis* Pau Ex Font Quer, an endemic and threatened plant. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 35: 42-46.

Anand, A., C.R. Srinivasa y P. Balakrishna. 1999. *In vitro* propagation of *Syzygium travancorium* Gamble- an endangered tree species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 59-63.

Anderson, E.F., M.S. Arias y N.P. Taylor. 1994. Threatened cacti of México. England: Royal Botanic Gardens. 135p.

Ángeles, F.T. 2008. *Mammillaria pectinifera* W. y *Coryphanta greenwoodii* B. Especies en peligro de extinción. Su cultivo *in vitro* como alternativa de rescate. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 38p.

Arakaki, M., P. Christin, R. Nyffeler, A. Lendel, U. Eggil, R. Ogburn, E. Springgs, M. Moore y E. Edwards. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. PNAS 108(20): 8379-8384.

Arellano-Perusquía, A., M.C.G. López-Peralla, F. Chablé-Moreno y A. Estrada-Luna. 2013. Effect on growth regulators on the organogénesis and multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander. Propagation of Ornamental Plants 13(4): 160-167.

Arias, M.S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Volumen especial XLIV: 109-115.

Arias, M.S., S.G. López, L.U.C. Gúzman y B.B. Vázquez. 2012. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Fascículo 95. Cactaceae Juss. 2ª edición. Instituto de Biología, UNAM. México. 246p.

Arreola, H. 1997. Legislación y conservación 101-111. En Valles S.C. y L. Rodríguez (eds.). Suculentas Mexicanas. Cactáceas. CVS Publicaciones, S.A. de C.V. México.

Azcona, C.A.G. 2009. Organogénesis directa de *Melocactus curvispinus* subsp. *dawsonii* (Bravo) N.P. Taylor, 1991 a partir de explantes de Tallo y germinación *in vitro* de *Mammillaria haageana* subsp. *elegans* D.R. Hunt 1997. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 42p.

Azcona, C.G., M. López, L. Blanca y G. Nader. 2009. Organogénesis directa de *Melocactus dawsonii*. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y levaduras, en XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

- Azofeita, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Balen, B., M. Tkalec, D. Pavokovic, B. Pevalek-kozlina y M. Krsnik-Rasol. 2009. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 36-45.
- Balvanera, P. y H. Cotler. 2009. Estado y tendencias de los servicios ecosistémicos, en *Capital natural de México, Vol.II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México, 185-245p.
- Bárceñas, R.T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* 68, 11-15.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. *Biodiversitas* 32: 1-5.
- Belokurova, V.B. 2009. Methods of Biotechnology in System of Efforts Aimed at Plant Biodiversity Preservation (Review). *Cytology and Genetics* 44(3):174-185.
- Benega, G.R., B. Schneider y N. Tel-Zur. 2009. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cactaceae). *Plant Cellular, Tissue and Organ Culture* 96: 191-199.
- Binet, M.N., M.C. Lemoine, C. Martin, C. Chambon y S. Gianinazzi. 2007. Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43(5): 473-478.
- Boyle, T. 2007. Cacti. In N.O. Anderson (ed.) *Flower Breeding and Genetics*. 361-368.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las cactáceas de México, Vol. 1*. UNAM. México. 741p.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. *El interesante mundo de las cactáceas*. CONACYT-FCE. México, DF. 233p.
- Buddendorf-Joosten, S.M. y E.J. Woltering. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15:1-16.
- Butiuc-Keul, A.L. y C. Deliu. 2001. Clonal Propagation of *Arnica montana* L., a medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37(5): 581-585.
- Calva, G. y J. Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 2-16.
- Cañal, M.J., R. Rodríguez, B. Fernández, R. Sánchez-Tames y J.P. Majada. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. *Bioteología vegetal* 1: 3-9.
- Casas, A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. CONABIO. *Biodiversitas* 40:18-23.
- Cassels, A.C. y R.F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 64: 145-157.
- Castillo-Campohermoso, A.D., A. López-Espinosa y I. Ocampo-Fletes. 2010. Conocimiento y uso de cactáceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Ra Ximhai* 6(3): 347-353.
- Ceballos, G., A. García y P.R. Ehrlich. 2010. Loss of Animal Populations and Species. *Journal of Cosmology* Vol.8: 1821-1831.
- Chávez, V., O. González, R.E. Litz, L.T. González, W. Juárez, P. Heredia, B. Estrada, A. Jiménez, A. Martínez, P. Ortega, M. Mata, R. Bye, D. Fragoso, A. Flores, C. Sánchez, F. Cruz, S. Arizaga y M.T. Olivera. 2012. Conservación *in vitro* de especies

vegetales mexicanas en peligro de extinción en el Jardín Botánico, IB-UNAM, 1er Simposio Internacional de Conservación *in vitro* y Criopreservación, Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP). Tepatitlán de Morelos, Jalisco, 27-29 junio 2012.

Choreño-Tapia, J.M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Delgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Hawort Pfeiffer a partir de aréolas. Revista Chapingo Serie Horticultura 8(2): 183-196.

Clayton, P.W., J.F. Hubstenberger and G.C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. Journal of the American Society of Horticultural Science. 115(2): 337-343.

Collen, B., N. Pettorelli, J.E.M. Baillie y S.M. Durant. 2013. Biodiversity Monitoring and Conservation: Bridging the Gaps Between Global Commitment and Local Action, in Biodiversity Monitoring and Conservation: Bridging the Gap between Global Commitment and Local Action (eds B. Collen, N. Pettorelli, J. E. M. Baillie and S. M. Durant), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Collín, H.A. y S. Edwards. 1998. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publisher Limited. Guildford, UK. 168p.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2010. Medusita (*Digitostigma caput-medusae*). Fichas de especies mexicanas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México, D.F. Compilado por Carlos Gerardo Velazco Macías. 4p.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2012. Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, 2012-2030. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

CONANP. 2013, tomado de <http://www.conanp.gob.mx/>

Cuellar, L., E. Morales y Treviño JF. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en cactáceas. Zonas Áridas 10:129-133.

De Medeiros, L.A., R.C.S. de Ribero, L.A. Gallo, E.T. de Oliveira y M.E.S.P. Demattê. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 165-169.

Dhaka, N. y S.L. Kothari. 2005. Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk: an important medicinal plant. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 41 (5): 658-661.

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

Dirzo, R. 1990. La biodiversidad como crisis ecológica actual ¿qué sabemos? Ciencias, Especial (4).

Durazo, J.F.G., D.T. Fragoso, V.M.A. Chávez y O.C. González. 2012. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann. y *Ferocactus cylindraceus* Orcutt. La vida en la Sierra 3(1): 19-25.

Eguiarte, F.L.E. 2010. La vida en los desiertos mexicanos. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 55(1): 26-29.

Elías, H., R.M. Taha, H.A. Hasbullah, N. Mohamed, A.A. Manan, N. Mahmud y S. Mohajer. 2015. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120:729-739.

Elías-Rocha, M.A., M.S. Santos-Díaz y A. Arredondo-Gómez. 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia* 6:96101.

Elmore, H.W., B. Samples, S. Sharma y M. Harrison. 1990. Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 131-135.

Escobedo, B.L., O.H.T. García, M.R. Rojas y G.F. Ramírez. 2004. Propagación *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton 27-31. En *Avances y Resultados de proyectos de Investigación 2004*, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila. 452p.

Esparza, I.R.S. 2004. Formación de callo e inducción de cultivo de células en suspensión en *Lophophora williamsii*. Tesis de Maestría, División de Ciencias Básicas y de la Salud. UAM. 87p.

Estrada-Luna, A.A., J.J. Martínez-Hernández, M.E. Torres-Torres y F. Chablé-Moreno. 2008. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dick and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117:378-385.

Fay, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 28: 1-4.

Fay, M.F. 1994. In What situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity & Conservation*, 3(2): 176-183.

Feria, M., D. Rojas, M. Chávez, M. Reyna, E. Quiala, J. Solís y F. Zurita. 2012. *In vitro* propagation of *Hylocereus purpusii* Britton&Rose, a Mexican species in danger of extinction. *Bioteconología Vegetal* 12(2): 77-83.

Fernández, T.M.A. 2014. Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 103p.

Flores, R.D. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada del Estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 61p.

Flores, S.J.C. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pelecocyphora strobiliformis* (Wendermann) Fric et Schelle (Cactaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 66p.

Francisco, E.V. 2012. Generación de brotes de *Coryphantha* aff. *pyncacantha* (Mart.) Lem., (Cactaceae) a partir de tallo de plántulas germinadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 36p.

Fruns, E.L.E. 2010. Reseña Hernández, M.H. 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Colección La ciencia para Todos, 213. México: Fondo de Cultura Económica, ISBN 968-16-8036-7,2006, 188p. Cactáceas y suculentas mexicanas Vol.55: 26-29.

Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe y I.K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12(7): 473-478.

Garay-Arrollo, A., M.P Sánchez, B. García-Ponce, E. Azpeitia y E.R. Álvarez-Buylla. 2012. Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics* 421: 1867-1885.

Garay-Arrollo, A., M.P. Sánchez, B. García-Ponce, E.R. Álvarez-Buylla y C. Gutiérrez. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica* 33(1): 13-22

García, R.O. y B.G. Malda. 2009. Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro. *Ciencia UAQ*, 2(1): 3-16.

Garza, R.A.P. 2010. Análisis fitoquímico y actividad biológica de los extractos de tallos y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire, 1839) y *Astrophytum capricorne* (Dietrich, 1922) Fam. Cactaceae. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 82p.

Garza-Padrón, R.A., M.J. Verde-Star, M.E. Morales-Rubio, A. Oranday-Cárdenas, C. Rivas-Morales, M.A. Nuñez-González y M.P. Barrón-González. 2010. Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica* 30: 111-121.

Gaspar, T., C. Kevers, C Penel, H. Greppin, D.M. Reid y T.A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 32: 272-289.

Gaspar, T., T. Frank, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J.F. Housman y J. Dommes. 2002. Concepts in plants stress physiology: Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285.

Gaston, K.J. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* Vol. 405: 220-227.

George, E.F. y P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial laboratories*, Exegetics Limited. United Kingdom. 709p.

George, E.F., M.A. Hall y G.J. de Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture* 3ª edición. Ed. Springer, Netherlands. 501p.

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.

Gómez, A.A. y F.R. Sánchez. 2007. Guía técnica para la protección y rescate de cactáceas por eventos de perturbación. A Folleto técnico.

Gómez, J.L.J, J.E. Morales, C. Lechuga, A. José y F.S. Cruz. 2006. Reproducción *in vitro* del garambullo *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 51 (2): 35-45.

Gómez, R.J. 2008. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*, Hernández y Anderson (Cactaceae), especie endémica mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. UNAM. 67p.

Gómez, S.A. 2010. *Enciclopedia Ilustrada de los Cactus y otras Suculentas*. Ed. Mundi-Prensa, España. 221p.

González, C.O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbiniacarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R.A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría. UNAM. 106p.

Gracidas, D.P., C.O. González, A.V.M. Chávez y M. Mata-Rosas. 2010. Regeneración de *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton. VIII Simposio Internacional sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas Memorias *in extenso*. Biotecnología Vegetal. Hermosillo. Sonora.

Gratton, J. y M. Fay. 1990. Vegetative Propagation of Cacti and Other Succulents *In vitro* from Methods in Molecular Biology. *Plant Cell and Tissue Culture* Vol.6.

- Gratton, J. y M.F. Fay. 1999. *In vitro* propagation of succulent plants p.135-140. En: Hall, R.D (eds). *Methods in molecular biology*, Vol. 111. *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies y R.L. Geneve. 1997. *Plant propagation: principles and practices*. Ed. Prentice Hall, New Jersey. E.U. 770p.
- Hernández, A.M. 2013. Análisis de la variabilidad genética y cultivo *in vitro* de *Digitostigma caput-medusae* (Cactaceae): Como estrategia integral de la conservación. Tesis de Maestría Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. 127p.
- Hernández, H.M. y H.A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta botánica Mexicana* N°26: 33-52.
- Hernández, H.M., C. Gómez-Hinostrosa y B. Goettsch. 2004. Checklist of Chihuahuan Desert Cactaceae. *Harvard Papers in Botany* 9(1): 51-68.
- Hernández-Oria, J.G., R Chávez-Martínez y E. Sánchez-Martínez. 2007. Factores de riesgo en las cactáceas amenazadas de una región semiárida en el Sur del Desierto Chihuahuense, México. *Interciencia* 32(11).
- Heydinger, J.M. 2012. Affirming the values of conservation science. *Biodiversity* 13(2): 115-117.
- Houllou-Kido, L.M., K.S. Silva, R. Rivas y A.L.F. Aias. 2009. Effect of apical dominance absences on *in vitro* micropropagation of *Nopalea cochenillifera* cv. IPA Sertânia. *Acta Horticulturae* 811:259-264.
- IUCN 2015. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2015-4.
- Janeba, Z. 2013. *Agave albopilosa*: the recent described gem of the genus. *Cactus and Succulent Journal* 85(3): 108-111.
- Jordán, M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En Squeo, F.A. y L. Cardemil (Eds). *Fisiología Vegetal*. Ed. Universidad de la Serena, Chile.
- Kareiva, P., H. Tallis, T.H. Ricketts, G.C. Daily y S. Polasky. 2011. *Natural capital: theory & practice of mapping ecosystem services*. 432p.
- Karimi, N., M.R. Mofid, M. Ebrahimi y R. Naderi. 2010. Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences* 8(2): 31-35.
- Kartsonas, E. y M. Papafotiou. 2007. Mother plant age and seasonal influence in *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., and endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cellular, Tissue and Organ Culture*. 90: 111-116.
- Kodym, A., S. Hollenthoner y F.J. Zapata-Arias. 2001. Cost reduction in the Micropropagation of Banana by using tubular Skylights as source for natural lighting. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37(2): 237-242.
- Koleff, P. y T. Urquiza-Haas (coords). 2011. *Planeación para la conservación de la biodiversidad terrestre en México: retos en un país megadiverso*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México. 244p.
- Kozai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. En: *Micropropagation: Technology and Application* eds. Debergh, P. and R. Zimmerman. Kluwer Academic Pub. 447-469.
- Krulik, G. 1980. Tissue culture of succulent plants. *Nat. Cactus & Succulent Journal* 35(1): 14-17.

Lara, M.L. 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 106p.

Larrain, B.B.C. 2011. Determinación de áreas prioritarias para la conservación de las cactáceas endémicas de la región del Desierto Sonorense. Tesis de Maestría. UNAM. 80p.

Laukkanen, H., H. Häggman, S. Kontunen-Soppela y A. Hohhtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum* 106: 337-343.

Lebgue-Keleng, T., Y.E. Aviña-Domínguez, R.A. Soto-Cruz, M. Quiñonez-Martínez, L. Cortés-Palacios, A. Melgoza-Castillos, C. Morales-Nieto, C. Vélez-Sánchez y S. Balderrama-Castañeda. 2014. Mineralogía del suelo y su relación con las especies de cactáceas en el sureste de Chihuahua, México. *Ecología Aplicada* 13(2).

Lema-Ruminska, J. y D. Kulus. 2014. Micropropagation of cacti- a review. *Haseltonia* 19: 46-63.

León de la Luz, J. L. y A. Valiente-Banuet. 1994. Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominante mexicano. *Ciencia y Desarrollo* 20(117): 58-65.

Llorente-Bousquets, J. y S. Ocegueda. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, Vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, 283-322p.

López, E.A.L. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 86p.

Lüthy, J. 2007. A new locality for *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton. *Cactus World*. Vol. 25 Supplement.

Machado, M.F.P. y A.J. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 32: 199-203.

Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71-87.

Malda, G., R.A. 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, P.L.V. 2014. Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Y *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. UNAM. 59p.

Manzo, S.M.R. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 47p.

Marszal-Jagacka, J. y K. Kromer. 2011. *In vitro* propagation of Rare and Endangered Serpentine Fern Species. Chapter 11 En: Fernández, H., A. Kumar and M.A. Revilla (Eds.) *Working with Ferns, Issues and Applications*. Ed. Springer. 386p.

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

Martínez, Y.M.V., M.R. Andrade, A.M. Villegas, I.T. Alia, O.G.T. Villegas y V.M. López. 2011. Cultivo *in vitro* de Pitayo (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono). Revista Chapingo Serie Horticultura 17(3): 95-105.

Martínez-Meyer, E., J.E. Sosa-Escalante y F. Álvarez. 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿Una ruta con dirección? Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl 85: S1-S9.

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: 99-105.

Martorell, C. 2013. Algunas reflexiones en torno a la investigación con plantas suculentas en México. En Briones-Salas, M., Manzanero-Medina, G. González-Pérez. Estudios en zonas áridas de Oaxaca: homenaje al Dr. Alejandro Flores Martínez. Instituto Politécnico Nacional-CIDIIR Unidad Oaxaca. Ciencia Espinosa 87-98.

Maschke, W.R., K. Geipel y T. Bley. 2014. Modeling of plant *in vitro* cultures-overview and estimation of biotechnological processes. Biotechnology and Bioengineering DOI 10.1002/bit.25346.

Mata, R.M., A.V.M. Chávez y B.R. Bye. 2001. *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 37: 73-78.

Mata, R.M., M.A.R. Monroy, K.G. Goldammer y V.M.A. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass Et Foster, and Endemic and Endangered Species. *In vitro* Cellular & Developmental Biology Plant 37(3) 400-404.

Mauseth, J. 1977. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. Cactus and Succulent Journal XLIX: 80-81.

Mauseth, J.D. 1976. Cytokinin and Gibberellic Acid induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). American Journal of Botany 63(10): 1295-1301.

May, R.M. 2011. Why Worry about How Many Species and Their Loss? Plos Biol 9(8) e1001130.

Medel-Narváez, A., A. Flores-Hernández, S. Armendáriz-Eravez y E. Santamaría-César. 2001. Técnicas de desinfestación y siembra *in vitro* de embriones maduros del falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) Shumann) (Cactaceae). Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 2(1): 53-59.

Mendonça, D. S. Luna, S. Bettencourt, M.S. Lopes, L. Monteiro, J.D. Neves, P. Monjardino y A.C. Machado. 2015. *In vitro* propagation of *Picconia zorica* (Tutin) Knobl. (Oleaceae) an Azorean endangered endemic plant species. Acta Physiology Plant. 37:47.

Mendoza, G.M. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 87p.

Minocha, S.C. y P.N. Mehra. 1974. Nutritional and Morphogenetic investigations on callus cultures on *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). American Journal of Botany 61(2):168-173.

Monostori, T., L. Tanács y L. Mile. 2012. Studies on *in vitro* propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*. Acta Horticulturae 937: 255-261.

Montalvo, G, E. Quiala, R. Mederos, S. Matos, M. Fera, M. Chávez, O. Placencia y M. León. 2004. Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. *Biotechnología Vegetal* 4(1): 43-48.

Mora, C., D.P. Tiffensor, S. Adl, A.G.B. Simpson y B. Worm. 2011. How Many Species Are There On Earth and in the Ocean? *Plos Biology* 9 (8): e1001127.

Morales, M.E.R. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántulas y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 75p.

Murashige, T. 1973. Nutrition of plant cells and organs. *In vitro* 9(2).

Naranjo, E.J., R. Dirzo, J.C.A. López, J. Redón-von Osten, A. Reuter y O. Sosa-Nishizaki. 2009. Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna, en Capital natural de México, Vol.II: Estado de Conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, 247-276p.

Naranjo, J.E., I.A. Urrea y L. Atehortúa. 2014. Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuana* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico. *Revista Colombiana de Biotechnología* 16(1): 86-92.

Nelson, R.L. y J.F. Carter. 2012. *Biodiversity Conservation: New research*. Ed. Nova, New York. 158p.

Ojeda-Zacarías, M.C., R.E. Vázquez-Alvarado y H. Rodríguez-Fuentes. 2010. Establecimiento *in vitro* del nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Revista Salud Pública y nutrición, VII Simposium-Taller Nacional y 1º Internacional "Producción y aprovechamiento del nopal"* 5: 176-181.

Oliveira, S.A., M.F.P da Silva, A.J. Prioli y C.A. Mangolin. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 31(1): 47-50.

Ortega-Baes, P. y H. Godínez-Álvarez. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15: 817-827.

Padilla, I.M.G. y C.L. Encina. 2004. Micropropagation of adult cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Fino de Jete. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 40(2): 210-214.

Padrón, P.C.A. 2012. Innovaciones en el agrodesarrollo de las cactáceas. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3(1): 038-079.

Papafotiou, M. G.N. Balotis, P.T. 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.

Park, S.Y., H.N. Murthy y K.Y. Paek. 2000. *In vitro* seed germination of *Calanthe sieboldii*, an endangered Orchid species. *Journal of Plant Biology*. 43(3): 158-161.

Pence, V.C. 2010. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *Kew Bulletin* 65: 539-547.

Pence, V.C. 2011. Evaluating cost for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In vitro Cellular Developmental Biology*: 47: 176-187.

Pence, V.C. S.M. Charls, B.L. Plair, M.A. Jaskowiak, G.D. Winget y L.L. Cleveland. 2007. Integrating *in vitro* methods for propagating and preserving endangered plants. En Z. Xu et al. (eds), *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. 363-373.

Pérez Molphe-Balch, E. y C.A. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology* 38(1): 73-78.

Pérez, J.P. 2011. Micropropagación de *Hylocereus megalantus* (K. Shum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose, y caracterización molecular de brotes mediante RADP's. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 71p.

Pérez, P.M.E.M., M.E.R Pérez, E.A. Villalobos, E.R. Meza, L.R.R. Morones y H.J.V. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican Cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 34:131-135.

Pérez. H.F. 2015. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 77p.

Phillips, G.C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants- Recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40: 342-345.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 324p.

Preece, J.E. y M.E. Comtom. 1991. Problems with explants exudation in micropropagation. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 17 High-Tech and Micropropagation I* (ed. by Y.P.S. Bajaj) Ed. Springer Berlin Heidelberg. 168-169.

Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. 1993. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. Oxford University Press, New York. 812p.

Ramírez-Malagon, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J.L. Barrera-Guerra, H.G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 43:660-665.

Randell, B.J. 2008. Ordenamiento ecológico territorial regional en los municipios donde se ubica el Parque Nacional Los Mármoles. Consejo Estatal de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DQ006. México D. F

Retes-Pruneda J.L., M.L. Valadez-Aguilar, M.E. Pérez-Reyes y E.M.B. Pérez. 2007. Propagación *in vitro* de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 9-16.

Rivas-Rossi, M.E. 1996. Cactáceas y suculentas del Jardín Botánico Lancaster. Ed. EUNED CR. 120p.

Roca, W.M. y L.A. Mroginsky. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. 969p.

Rodríguez, G.M. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 86p.

Rodríguez, L.E.F., M.A. Daquinta, E.H. Fonet, R.A. Cantillo y J. Vázquez. 2013. Propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. *Ciencia y Sociedad* 38(2): 345-375.

Rodríguez, N.A.L. 2014. Micropropagación de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), a partir de semillas de plantas regeneradas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 78p.

Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured

Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95: 341-349.

Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo y A.J. Valencia-Bofín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(1): 139-143.

Sánchez, M.E y J.M. Cantú. 1999. La guerra de las cactáceas. *Este País* N° 102.

Sangwang, S.R., S.B Sangwang-Norreel y H. Harada. 1997. *In vitro* techniques and plant morphogenesis: fundamental aspects and practical applications. Review. *Plant Biotechnology* 14(2) 93-100.

Santos, D.M.S., J.M. del Campo, G.A. Arredondo y D.M.L. Santos. 2001. Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae) *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 24(2): 133-138.

Santos-Díaz, M.S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M.L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* Vol.39 (5): 480-484.

Saran, B.S. y D. Kumar. 2013. *Plant Tissue Culture: an Introductory Text*. Ed. Springer, India. 309p.

Sarasan, V., R. Cripps, M.M. Ramsay, C. Atheron, M. McMichen, G. Prendergast y J.K. Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3): 206-214.

Saucedo, G.S. 2006. Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentallophus*, cactáceas nativas de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 154p.

SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. <http://www.profepa.gob.mx/>

SEMARNAT. 2011. Biodiversidad: conocer para conservar, México. D.F.

Shaid, M., A. Shahzad, A. Malik y A. Sahai. 2013. *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*. Ed. Springer, Reino Unido. 359p.

Singh, B.B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. *Scientia Horticulturae* 81: 337-344.

Smith, R.H., P.J. Burdick, J. Anthony y A.A. Reilley. 1991. *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HorScience* 26(3): 315.

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 Metztlán, Hidalgo. *Estudios Científicos en el estado de Hidalgo y Zonas Aledañas* 16: 121-128.

Soto, C.D.C. 2013. Evaluación de la regeneración *in vitro* de brotes de *Echinocactus grusonii* (Cactaceae), utilizando medio líquido. Tesis de Licenciatura. UNAM. 75p.

Srivastava, L.M. 2002. *Plant growth and development*. Ed. Academic Press, Amsterdam.772p.

Tacoronte, Z., J.F. Pérez-Francés, E. Suárez y F. Valdés. 2008. Establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Bencomia exstipulata*, planta endémica de las islas Canarias en peligro de extinción (Magnoliopsida, Rosaceae). *Vieraea* 36: 73-79.

Tapia, D.M.C. 2010. Estudio de la morfogénesis durante el desarrollo de brotes de *Cephalocereus senilis*(Haw.) Pfeiff. (Cactaceae) cultivados *in vitro*. Tesis de Maestría. UNAM. 61p.

Téllez, R.J. 2012. Morfogénesis *in vitro* de cactáceas. Fisiología vegetal. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. 171p.

Titov, S., S.B. Kumar, A. Mandal, Md. A. Sadrul y S.U. Nasir. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa spp.* cv. Kanthali floral bud explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2(3): 97-104.

Toribio, M. y C. Celestino. 2008. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Forest Systems*, 9(4), 249-260.

Torres, G.F. 2011. Germinación *in vitro* y cinética de crecimiento de callo de *Mammillaria huitzilopochtli* D.R. Hunt. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. 59p.

Turner, D. 2007. *Mammillaria luethyi* or Found, Lost and Found Again. *The Cactus and Succulent Society of NSW Inc.* 26(2): 35-40.

Uhlig, M. 2008. Cactus y otras suculentas. Editorial hispano Europea. 128p.

Us-Camus, R., G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké y C. De la Peña. 2014. *In vitro* Culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 187-201.

Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas, S. Arias y H. Ochoterena. 2013. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity* 11(1): 103-116.

Velazco, C.G. y M.R. Nevárez. 2002. Nuevo género de la familia Cactaceae en el Estado de Nuevo León, México: *Digitostigma caput-medusae* Velazco et Nevárez sp. Nov. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47(4): 76-86.

Velázquez, L.E.E. y R.Q. Soltero. 2001. Micropropagación de *Ephitelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *Micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46(3): 56-62.

Vílchez, J., O. Ferrer, P. Chacín y N. Albany. 2007. Efecto del pulso líquido sobre la multiplicación *in vitro* de zabila (*Aloe vera* (L.) Burm. F.). *Revista de la Facultad de Agronomía* 24(1): 110-113.

Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W.M. y L.A. Mroginski (Ed). *Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia 127-141.

Villaseñor, J.L. y E. Ortíz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 134-142.

Villavicencio, E.G., A.P. Cano y A.S. Juárez. 2009. Micropropagación y producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del Desierto Chihuahuense. INIFAP, Folleto Técnico N° 39

Villavicencio, G.E.E., A.G. Arredondo, M.A.P. Carranza, O.A. Mares, S.S. Comparan y A.C. González. 2010. Cactáceas ornamentales del Desierto

Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. Libro Técnico N°2. INIFAP. ISBN:978-607-425-473-0. 188p.

Viñas, M., M. Fernández-Brenes, A. Azofeita and V.M. Jiménez. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebrá. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 48: 469-477.

Vovides, A.P., E. Linares y R. Bye. 2010. Jardines Botánicos: historia y perspectiva. México: Gobierno del Estado de Veracruz, Secretaria de Educación.

Waklu, A.K. y B.S. Bhau. 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 211-214.

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

Yáñez, M.M. 2011. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 87p.

Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures- a review. *Acta Horticulturae* 212: 561-566.