

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Propagación *in vitro* de *Turbinicarpus heliae* García-Mor.,
Díaz-Salim & Gonz.-Bot. (Cactaceae)

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

KARLA LORENA RAMIREZ PEREZ

Director de tesis: Biól. Juan Romero Arredondo

Asesora de tesis: M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales

Trabajo realizado con el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME: PE204219

Cd. De México, Septiembre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de iniciar el camino de mi carrera profesional en la carrera que amo, agradezco a todos los docentes, compañeros y amigos que a lo largo de mi carrera universitaria tuve el placer de conocer y aprender de ellos.

A Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por los años que pase dentro de sus instalaciones enriqueciéndome de todo el aprendizaje que me dio su comunidad.

A Juan Romero por compartir conmigo su sabiduría, tiempo y dedicación en mi proyecto para titulación, por darme la libertad y el apoyo necesario para poder concluir este trabajo. Por siempre estar ahí con las palabras exactas para motivarme. Un agradecimiento personal por brindarme su amistad y todos los momentos divertidos que vivimos a lo largo de todo el tiempo del proyecto.

A Susana por toda la sabiduría compartida, por permitirme la oportunidad de aprender dentro de la Unidad de Investigación en biología vegetal, Por todas las aventuras vividas en las prácticas de campo, por mantener tan buen ambiente entre compañeros dentro de la Unidad.

A Armando por su tiempo y pasión hacia el aprendizaje del análisis estadístico, herramienta fundamental para la comprensión de la biología.

A Olga gracias por todo, por el apoyo incondicional, por hacer posible el sueño, por dejarme ser, por la libertad y la confianza,

A Monserrat por siempre estar ahí, brindando su apoyo, porque sé que siempre puedo contar con contigo, por la ayuda con mis proyectos profesionales y personales.

Gracias a ambas por el amor. Las amo

A mis compañeros de la universidad

Si me remonto al primer día que entre a la facultad agradezco a todas esas personas que me brindaron su apoyo para adaptarme a una nueva ciudad, a un nuevo sistema educativo, que me brindaron confianza, me dieron a alguien con quien contar, a mis compañeros de clases, a mi compañeros de equipo.

Un agradecimiento a esos amigos que continúan conmigo, A Arely por siempre darme lo mejor de ti, por la risas, las pláticas sinceras, los buenos trabajo, las horas de atletismo, el apoyo incondicional y sobre todo por ser autentica. A Erick por ser tan franco, por siempre estar ahí con un buen consejo y una palabra sincera, por acoplarte tan bien a mi carácter huraño y ser mi compañero de aventuras ciudadinas. A Monse por inspirarme y por acompañarme en este proceso. A Luis por estar ahí noble, fuerte, sencillo y siempre con unas grupo de palabras alentadoras. A Jesús por siempre acompañarme, por escucharme, por darme otro punto de vista. A Esdras por la risas infinitas, por siempre darme apoyo.

Índice

1.	Resumen.....	8
2.	Introducción	10
3.	Antecedentes	11
3.1.	Problemas de conservación de la vegetación en México	11
3.2.	Daño a la vegetación árida	12
3.3.	Problemas con la conservación de cactáceas	12
3.4.	Cultivo <i>in vitro</i> como herramienta de conservación	13
3.5.	Cultivo <i>in vitro</i>	15
3.6.	Cultivo <i>in vitro</i> en cactáceas.....	16
3.7.	Trabajos de cultivo <i>in vitro</i> en el género <i>Turbinicarpus</i>	17
3.8.	<i>Turbinicarpus</i> (Backeb.) Buxb. & Backeb.....	18
3.9.	<i>Turbinicarpus heliae</i> García-Mor., Díaz-Salim & Gonz.-Bot.	19
4.	Justificación	22
5.	Hipótesis.....	22
6.	Objetivos	23
6.1.	Objetivo general.....	23
6.2.	Objetivos particulares	23
7.	Material y Métodos.....	24
7.1.	Material Biológico	24
7.2.	Establecimiento y evaluación del cultivo de semillas	24
7.2.1	Preparación de medio para germinación.....	24
7.2.2	Lavado y desinfestación de semillas	25
7.2.3	Siembra de semillas <i>in vitro</i>	26
7.2.4	Siembra de semillas <i>ex vitro</i>	27
7.2.5	Incubación	27
7.2.6	Evaluación de germinación	28
7.3.	Cultivo, multiplicación y evaluación de brotes o embriones	28
7.3.1	Medio para cultivo de explantes.....	28
7.3.2	Cultivo de explantes.....	29

7.3.3	Evaluación de morfología de producción de brotes	30
7.4.	Enraizamiento	30
7.4.1	Medio para enraizamiento.....	30
7.4.2	Evaluación de morfología de producción de raíces	31
7.5.	Aclimatización de las plántulas	31
7.5.1	Preparación de sustrato para aclimatización.....	31
7.5.2	Aclimatización	32
7.5.3	Evaluación de sobrevivencia	34
7.6.	Análisis estadístico	34
8.	Resultados y análisis.....	35
8.1.	Establecimiento <i>in vitro</i> y germinación.....	35
8.1.1	Lavado y desinfección de semillas	35
8.1.2	Germinación	36
8.2.	Desarrollo y multiplicación.....	39
8.2.1	Activación areolar en medio MS al 50%.....	39
8.2.2	Activación areolar en medio MS al 100%.....	41
8.3.	Enraizamiento	44
8.4.	Aclimatización	48
9.	Conclusiones.....	49
10.	Referencias.....	51
11.	Anexos	56
11.1.	Protocolo de propagación a partir de cultivo de semillas <i>in vitro</i> de <i>Turbinicarpus heliae</i>	56
11.2.	Composición del medio de cultivo Murashige y skoog.....	58
11.3.	ANDEVA de tratamientos en medio MS al 50% para activación de areolas	60
11.4.	ANDEVA de tratamientos en medio al 100% para activación de areolas	62
11.5.	ANDEVA de tratamientos en medio al 100% para inducción de raíces	64
11.6.	Abreviaturas	67

1. Resumen

Turbinicarpus heliae es una especie recientemente descrita (2015) y poco estudiada. Se han encontrado pequeñas poblaciones y contabilizado menos de 500 plantas, por lo que se considera una especie en riesgo, aunque, aún no se ha agregado a la **NOM-059-SEMARNAT-2010** en su más reciente actualización en 2019. El objetivo del presente trabajo fue proponer un protocolo para la propagación de esta especie. Se realizó el experimento en cuatro fases: 1) La germinación y el establecimiento del cultivo, 2) el desarrollo y multiplicación de brotes, 3) el enraizamiento *in vitro* y, 4) aclimatización de las plántulas obtenidas.

En la primera fase, para el establecimiento aséptico del cultivo se lavaron las semillas con una solución de cloro al 15% v/v, más una gota de jabón. El porcentaje de asepsia fue de 85% al 100% en los tres cultivos realizados. En el caso de la germinación, se realizó en medio MS al 50% adicionado con 30 g/L de sacarosa, más 6 g/L de agar gel y en sustrato mineral y tierra comercial al 60/30 v/v. Esta fue exitosa en los cultivos realizados al mes después de la colecta de semillas, obteniendo una germinación del 80% en la prueba *in vitro* y del 93.3% en la prueba en sustrato, pero no fue exitosa en la prueba *in vitro* a los 5 meses posteriores de la colecta, teniendo 2 % de germinación.

En la fase de multiplicación, los brotes se cortaron transversalmente y fueron subcultivados en los siguientes tratamientos. Se inició con un cultivo en medio MS al 50% suplementado con compuestos orgánicos como tiamina, piridoxina, 2 g/L de carbón activado, 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar gel adicionado con las citocininas BAP y KIN en las concentraciones de 1, 2 y 3 mg/L de cada una y un control sin fitohormonas, obteniendo en el tratamiento con 1 mg/L de BAP de brotes media más alta con 9.38 y un total de 28 brotes. Se realizó una segunda prueba con medio MS al 100% suplementado igual que el medio anterior probando cinco concentraciones de BAP 3, 4, 5, 6 y 8 mg/L y un tratamiento control. La media más alta fue de 45.41 y un total de 66 brotes en el tratamiento con 4 mg/L BAP.

Para el enraizamiento, los brotes resultantes de los tratamientos anteriores, se subcultivaron en seis nuevos tratamientos en medio MS al 100% adicionado de la misma manera que los tratamientos anteriores y, con las auxinas ANA, AIA, AIB a 3 y 5 mg/L de cada una en diferentes tratamientos y un control sin fitohormonas. En el tratamiento con 3mg/L ANA se obtuvo la media más alta de raíces con 21.25 y con 20 raíces, pero al finalizar el tiempo de prueba de 12 semanas, el tratamiento con más raíces fue 5mg/L de AIB con 21 raíces y una media de 12.5. El enraizamiento fue exitoso teniendo un porcentaje de 73% de brotes con raíz.

Para la aclimatización, los brotes con raíz se pasaron a sustrato meramente mineral y estéril en autoclave. Se regaron con fertilizante y fungicida mensualmente durante tres meses. La aclimatización fue exitosa con un 90.79 % de sobrevivencia después de tres meses.

2. Introducción

La diversidad biológica representa la riqueza natural de nuestro planeta y constituye un recurso de gran importancia para el bienestar social y económico de la humanidad y de las generaciones futuras. El territorio mexicano está situado en la confluencia de dos grandes regiones biogeográficas: la Neártica y la Neotropical, donde la diversidad biológica y ecosistémica alcanzan grados verdaderamente inusitados, colocando a México como uno de los doce países megadiversos, al albergar entre 10 y 15% de las especies de flora y fauna silvestre a nivel mundial. Además de la riqueza biológica que posee, México se caracteriza por el número de endemismos, es decir, por la presencia de especies que no existen en ningún otro lugar del planeta, teniendo que alrededor del 63% de la flora mexicana endémica. La riqueza biológica de México ha propiciado que el comercio y utilización de la vida silvestre sea y haya sido una actividad cotidiana desde la presencia de las primeras culturas en nuestro continente. Aunque la flora ha sido siempre una parte integral de la cultura mexicana, como puede observarse en las expresiones artísticas y religiosas de las diversas etnias desde la época prehispánica hasta nuestros días, prevalece entre los diversos sectores de la población un desconocimiento sobre su estatus actual y las amenazas que enfrentan, el marco legal al que están sujetas, y los beneficios ecológicos y socioeconómicos que pueden proveer si se conservan y manejan de manera sostenible (Nadal Urías, Carmona Omana, & Trouyet Starr, 2013; Reuter & Mosig, 2010; Schroeder, Medellín, Ramírez Flores, & Rojo Curiel, 2009).

México se caracteriza como el país con la mayor cantidad de especies de la familia Cactaceae. Destaca por su amplia representatividad en el nivel genérico y específico. Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal por factores de perturbación, principalmente por la destrucción de sus hábitats naturales, depredación y recolecta ilegal de las poblaciones silvestres (Hernández & Godinez, 1994; Quiala, Montalvo & Matos, 2004).

3. Antecedentes

3.1. Problemas de conservación de la vegetación en México

La vegetación natural de México se encuentra altamente afectada por la influencia humana, y este proceso de devastación data, sin duda, desde la llegada del hombre al territorio de la República. Los factores de destrucción de la vegetación más importantes han sido: La colonización progresiva del país, el origen y la expansión de la agricultura, así como el desarrollo de la ganadería, la explotación forestal y en buena parte también de la minería y el saqueo ilegal de especies (Rzedowski & Huerta, 1994).

Los factores que propician las actividades devastadoras causadas por el hombre en México son las mismas que operan en otras regiones del mundo, entre estas se pueden mencionar los siguientes: I) El aumento de la población (la población de México aumentó de 25.8 millones a 119.5 millones de 1950 a 2015), con todos los efectos consiguientes en cuanto al incremento de consumo de alimentos y de materias primas vegetales, así como las necesidades de espacio para viviendas, industrias, caminos y áreas de recreo. II) El uso inadecuado y muchas veces anárquico de la tierra, que prevalece en grandes extensiones del país, provoca con frecuencia la desaparición innecesaria de la vegetación natural o bien la mantiene a niveles degradados. III) El exceso de población rural en relación con las escasas tierras laborables a su disposición y la falta de otras fuentes de trabajo son la causa de que muchos campesinos tengan que dedicarse a actividades que les proporcionan ingresos ridículamente bajos y al mismo tiempo deterioran profundamente los recursos naturales de la región. Entre estas actividades destacan los desmontes y cultivos en terrenos impropios para la agricultura, la tala indebida y el pastoreo mal organizado y orientado. IV) La agricultura nómada o seminómada se practica en muchas partes del país y las zonas que afecta han ido rápidamente en aumento. Se trata principalmente de áreas boscosas, o al menos primitivamente boscosas, que al someterse a este tipo de aprovechamiento se mantienen en forma permanente a nivel de vegetación secundaria. V) La falta de organización y de previsión en la explotación forestal causan la pérdida, a menudo difícilmente reparable, de vastas superficies boscosas en virtud de la tala desmedida y del desinterés por preservar el recurso. VI) El empleo del fuego como instrumento de manejo

de la vegetación es muy habitual en México (García, Muñoz & de Oliveira, 2018; Rzedowski & Huerta, 1994).

3.2. Daño a la vegetación árida

Las zonas áridas y semiáridas ocupan más de la mitad del territorio mexicano y están cubiertas en su mayor parte por diversos tipos de comunidades arbustivas que, de acuerdo con Rzedowski, reciben el nombre genérico de matorral xerófilo, que alternan con pastizales y con algunos manchones aislados de vegetación arbórea. A pesar de esta gran extensión territorial y ser el tipo de vegetación menos afectada, las zonas áridas año con año se ven afectadas por cambios en el uso del suelo, los cuales son el resultado de actividades humanas como el desarrollo de vías de comunicación y la expansión urbana, agrícola, ganadera, minera y turística. Estos cambios de uso de suelo irrumpen el ambiente físico y biológico, erosionando el suelo, modificando el hábitat, las interacciones biológicas de sus poblaciones silvestres, el comportamiento animal y los procesos ecosistémicos; asimismo, aceleran la introducción de especies invasoras e incrementan la fragmentación de zonas silvestres en las áreas cercanas a caminos y desarrollo rurales y urbanos. De manera simultánea se inicia o se acelera la sobreexplotación selectiva de algunas especies de plantas, propias del matorral xerófilo tales como la lechuguilla, la candelilla, y muchas especies de cactáceas alterando la estructura y diversidad de sus comunidades (Arriaga, 2009; Cervantes Ramírez, 2005).

3.3. Problemas con la conservación de cactáceas

Las cactáceas son plantas originarias y endémicas del continente americano, distribuidas principalmente en las zonas áridas y semiáridas; las características ecológicas sobre la base de clima, topografía y suelos peculiares existentes de México, lo ubican como el país que alberga la mayor cantidad de especies de esta familia. Son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal, por lo que se requiere de estrategias que permitan un conocimiento total de dichas especies vegetales para su propagación, conservación y usos a corto tiempo. Es importante señalar que es una familia muy demandada por su uso como

plantas ornamentales (Alanís Flores & Velazco Macías, 2008; Hernández & Godinez, 1994; Quiala et al., 2004).

Dentro de los acuerdos y convenios internacionales la familia completa está incluida en el Apéndice II de la Convención de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (CITES) y un gran número de sus especies está comprendido en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN). Lo cual indica que no deben comercializarse internacionalmente, a menos que sean producto de propagación artificial (por ejemplo propagación *in vitro*). Dentro de la legislación mexicana alrededor de un 30% de las especies mexicanas de cactáceas están catalogadas bajo un nivel de riesgo dentro de la “**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” de la “Ley General de Vida Silvestre” (LGVS) (Alanís Flores & Velazco Macías, 2008; Cruz Angón, 2014; Pérez Molphe Balch & Davila Figueroa, 2002).

Generalmente las especies de cactáceas más amenazadas son de crecimiento lento, de difícil propagación y baja producción de semillas. Estas suelen ser saqueadas de su hábitat natural ilegalmente para la venta a coleccionistas privados principalmente de otros países, lo mismo pasa con las especies propagadas artificialmente que actualmente están disponibles en mercados extranjeros que son producto de la recolecta ilegal que se ha llevado a cabo por generaciones. Esta práctica ha causado algunas modificaciones en la vegetación, es el caso de *Turbinicarpus heliae*, cuya abundancia ha disminuido alarmantemente en su microhábitat, debido a su explotación para uso ornamental además de ganadería de la región y este es el mismo caso de otras cactáceas y plantas suculentas mexicanas (Badalament, Carra, Oddo, Francesco, & Sajeve, 2016; Garcia-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015; Robbins, 2003).

3.4. Cultivo *in vitro* como herramienta de conservación

La propagación de plantas por medio de semillas es de gran importancia debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies,

contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa, sin embargo, el método de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento y mantenimiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo. Lo que a su vez disminuye la presión de colecta en poblaciones que se encuentren muy dañadas por esta, y nos podrá dar material que con los estudios ecológicos y genéticos pertinentes se pueden reintroducir a su ambiente natural (Rosa Carrillo, Dominguez Rosales, Pérez Reyes, & Pérez Molphe Balch, 2012).

Permite la propagación masiva de varios taxones vegetales a partir de una pequeña cantidad de material vegetal y con bajo impacto en las poblaciones. Uno de los límites de la micropropagación es el requisito específico de la especie de los reguladores del crecimiento de las plantas (RCP) para cada taxón y a veces incluso para diferentes genotipos, además de la variación somaclonal que puede inducirse cuando está presente una fase de callo. Por lo que para cada especie de interés es necesaria la optimización de los medios de multiplicación y enraizamiento, así como un refinamiento de la transición de aclimatización.

En varios estudios también se ha demostrado que el desarrollo *in vitro* de plántulas de cactáceas puede ser extremadamente rápido en comparación con plántulas cultivadas *ex vitro*. Este hecho confiere una ventaja adicional a esta tecnología cuando se aplica a especies de crecimiento muy lento. Malda y colaboradores en 1999 reportan que las plantas cultivadas *in vitro* de *Coryphantha minima* crecieron siete veces más que las plantas cultivadas en condiciones similares *ex vitro*. Esto se debió a los reguladores de crecimiento de las plantas, alta humedad relativa y alta concentración de azúcar en los medios de cultivo, y un aumento de la tasa fotosintética. Después de haber desarrollado la metodología específica para la micropropagación de una especie en particular, a menudo es más rápida y barata que el cultivo tradicional y, por lo tanto, ha ido ganando popularidad dentro de la industria hortícola (Badalament et al., 2016; Hubstenberger, Clayton, & Phillips, 1992; Lema-Ruminska & Kulus, 2014; Pérez Molphe Balch & Davila Figueroa, 2002)

3.5. Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* es un conjunto de técnicas mediante las cuales un explante (Parte separada de un vegetal, puede ser: un protoplasto, célula, tejido, u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Objetivos del cultivo *in vitro*: I) Estudios básicos de fisiología genética, bioquímica y ciencias afines; II) Bioconversión y producción de compuestos útiles; III) Obtención de plantas libres de patógenos; IV) Propagación de plantas; V) Conservación e intercambio de germoplasma. De estas aplicaciones surge que el establecimiento del cultivo de tejidos (los explantes y las operaciones de incubación *in vitro*) dependerá del tipo de explante y el sistema de cultivo que se emplee (Mroginski & Roca, 1993).

Es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas nuevas y embriogénesis somática. Dentro de esta técnica es muy importante mantener la asepsia en todos los procedimientos aún que tendremos especial cuidado en la asepsia de los tejidos a cultivar ya que una técnica no adecuada de desinfección puede causar la muerte del tejido vegetal o la contaminación de este (Roca & Mroginski, 1993).

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinar y radicular. En algunos casos tiene importancia

considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2010).

3.6. Cultivo *in vitro* en cactáceas

Los métodos de propagación *in vitro* en cactáceas se han desarrollado durante más de 50 años. Éstos se han logrado usando tres vías de regeneración diferentes: embriogénesis, regeneración por organogénesis y activación de areolas. En el caso de las dos primeras vías mencionadas resultan sistemas de regeneración muy eficientes tomando en cuenta el número de plantas que podemos generar en un lapso de tiempo más corto, sin embargo, cuando se pasa por una etapa de tejido calloso (embriogénesis somática u organogénesis indirecta) no se garantiza la integridad genética (se puede producir variación somoclonal) del material generado. Estos métodos se han utilizado con muchos géneros de cactus, tales como *Astrophytum*, *Aztekium*, *Cephalocereus*, *Cereus*, *Copiapoa*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Ferocactus*, *Gymnocalycus* (Lema-Ruminska & Kulus, 2014; Rosa Carrillo et al., 2012).

En cactáceas los brotes se obtienen de yemas axilares; estas estructuras están contenidas en areolas que forman parte de las costillas o mamilas y su procedencia pueden ser segmentos de plantas de vivero, campo o de plántulas germinadas *in vitro*. Algunos autores señalan que en el cultivo de yemas axilares aún existen varias incógnitas por resolver; sin embargo, este método de clonación resulta eficiente en especies útiles como es el caso de *T. knuthianus*. La activación de areolas requiere la adición de citocininas al medio de cultivo, siendo la más usada la bencilaminopurina (BAP) o también llamada benciladenina (BA), y 6-(y.y-dimetilalilamino) purina (2ip), en dosis que deben ser determinadas para cada especie (Hubstenberger et al., 1992; Rosa Carrillo et al., 2012).

Algunas especies amenazadas se han propagado con éxito utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. Ejemplos de esto son *Mammillaria san-angelensis*, *Aztekium ritteri*, *Pelecypora aselliformis*, *P. strobiliformis* y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Dávila-Figueroa, Lourdes de

la Rosa-Carrillo, & Pérez-Molphe-Balch, 2005; Mata Rosas, Monroy de la Rosa, Moebis Goldammer, & Chávez Avila, 2001).

3.7. Trabajos de cultivo *in vitro* en el género *Turbinicarpus*

Mata Rosas y colaboradores en 2001 trabajaron con *T. Laui* Glass & R. Foster utilizando una combinación de BAP y ácido naftalenacético (ANA) en diferentes concentraciones (Mata Rosas et al., 2001).

Dávila Figueroa y colaboradores en 2005 lograron propagar exitosamente 8 especies del género *Tubinicarpus* a partir de semillas, la especies y subespecies utilizadas fueron las siguientes; *T. laui* Glass & R. Foster, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus* (, *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, *T. subterraneus* y *T. valdezianus*. Más adelante Rosa Carrillo y colaboradores en 2012 trabajaron con 14 especies y subespecies del género complementando los trabajos de su compañero utilizando diferentes especies, *T. bonatzii*, *T. hoferi*, *T. jauernigii*, *T. pseudomacrochele* subsp. *lausseri*, *T. pseudomacrochele* subsp. *pseudomacrochele*, *T. rioverdensis*, *T. roseiflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *dickisoniae*, *T. schmiedickeanus* subsp. *gracilis*, *T. schmiedickeanus* subsp. *macrochele*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii*, *T. swobodae*, *T. valdezianus* subsp. *albiflorus* y *T. ysabelae*. En este trabajo logran llevar a cabo la propagación de estas especies exitosamente. En ambos casos utilizan BAP y 2iP como activador areolar y como inductor de raíces Carbón activado y ácido indolbutírico (AIB) con sus diferentes variaciones en cada trabajo (Dávila-Figueroa et al., 2005; Rosa Carrillo et al., 2012).

Se realizó una revisión bibliográfica en las principales bases de datos y no se encontraron investigaciones para la especie incluida en el presente trabajo. Esto adquiere relevancia, ya que en repetidas ocasiones se ha observado que cada especie, o incluso subespecie responde de diferente manera a las condiciones *in vitro*, lo que hace necesario conocer las respuestas de cada una ellas y desarrollar sistemas de cultivo y propagación masiva *in vitro* particular para cada taxón (Hubstenberger et al., 1992; Lema-Ruminska & Kulus, 2014).

3.8. *Turbinicarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb.

El género *Turbinicarpus* es endémico de las regiones centro y sur del Desierto Chihuahuense, que se extiende desde la Meseta Central de México hasta el Suroeste de los EEUU. Este género incluye varias especies y subespecies de cactus de tamaño relativamente pequeño que son muy apreciadas por los coleccionistas debido a su belleza, a la facilidad con la que producen flores y a su talla reducida lo que permite el mantenimiento de grandes colecciones en espacios mínimos (Rosa Carrillo et al., 2012).

Lo anterior ha traído como resultado una intensa colecta ilegal que ha afectado a las poblaciones silvestres. Este fenómeno se agrava debido a que muchas de las especies del género tienen áreas de distribución muy restringidas y son muy sensibles a los disturbios ecológicos, por lo que su hábitat está siendo constantemente degradado. Algunas actividades humanas que se desarrollan en estas áreas de distribución, tal como la extracción de materiales pétreos, han afectado y producido importantes disturbios de los hábitats naturales de algunas especies del género (Hernández Oria, Chávez Martínez, & Sánchez Martínez, 2007; Rosa Carrillo et al., 2012).

La conservación de los individuos del género *Turbinicarpus* se complica debido a su lento crecimiento y la reducida capacidad para activar sus areolas y producir re-brotes en condiciones ambientales naturales, lo cual da como resultado una pobre capacidad de recuperación de las poblaciones. Esta situación empeora si se considera que varias especies tienen problemas de autoincompatibilidad. Por lo que manifiestan una muy baja producción de semillas y una baja tasa de germinación, que sólo llega a ser del 8 % en algunas ocasiones. Esto último se debe tanto a la pérdida de viabilidad como a la existencia de diversos mecanismos de latencia. (Flores, Arredondo, & Jurado, 2005; Flores, Jurado, & Jiménez-Bremont, 2008).

Desde el punto de vista fitoquímico el género resulta interesante por la presencia de alcaloides, los cuales pueden tener importancia farmacológica. Sin embargo, ha sido poco estudiado debido a la gran dificultad para obtener tejido suficiente para la extracción de estos compuestos, a su talla reducida, su baja tasa de crecimiento y a su nivel de amenaza de extinción (Rosa Carrillo et al., 2012; Štarha, Chybidziurová, & Lacný, 1999).

3.9. *Turbinicarpus heliae* García-Mor., Díaz-Salim & Gonz.-Bot.

Taxonomía:

Reino- Plantae

Filo- Tracheophyta

Subfilo-Agiospermae

Clase-Clase Magnoliopsida

Orden- Caryophyllales

Familia- Cactaceae

Subfamilia- Cactoideae

Tribu- Cactoideae

Género- *Turbinicarpus*

Especie- *Turbinicarpus heliae*

Descripción: En su forma juvenil el tallo es alargado y claviforme, con 16-20 espinas cortas, pectinadas, blancas y radiales. En su etapa adulta el tallo es simple de hasta 6 cm de alto y 2 centímetros de diámetro, claramente separado de la raíz por un cuello. Los tubérculos cónicos-piramidales, de color verde oscuro con áreas glaucas, dispuestos en serie espiral 9-10, su raíz principal es tuberosa de hasta 7 cm de largo y 2 cm de diámetro, con raíces secundarias fasciculadas irregulares. Espinas 10-18, radiales, 2-3 mm de largo, de color blanco; 3 o 4 espinas superiores largas y tortuosas, formando un montón, de color blanco a grisáceo con puntas más oscuras. Aréolas ovales, con fieltro blanco en el piso superior cuando son jóvenes. Flores en forma de embudo de hasta 2 cm de largo y diámetro de color blanco con rosa o amarillo intercalado. Fruto seco, ovoide, teñido de verde con púrpura. Semilla piliforme, negras, constreñida en la región micropilar (Figura 1) (García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015).

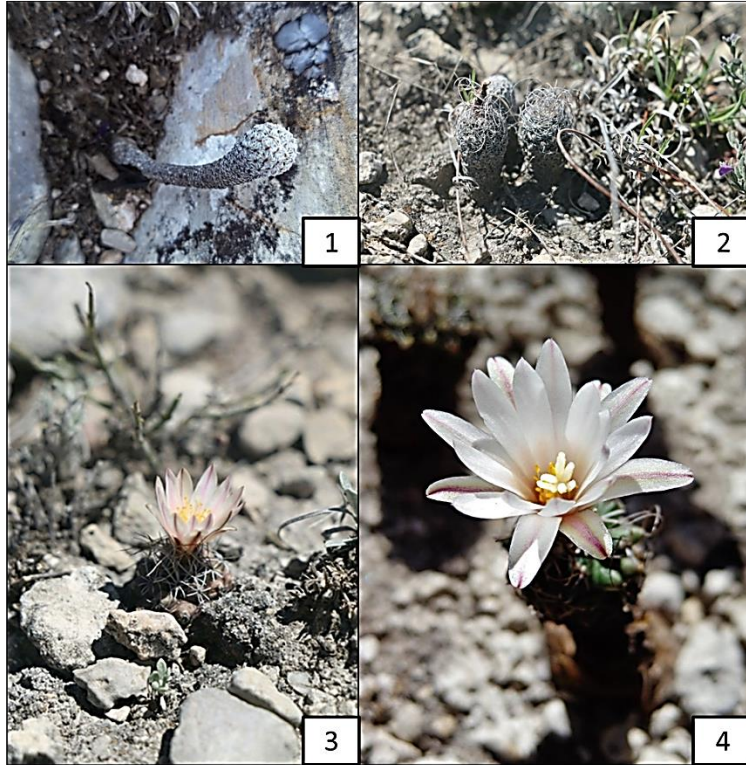


Figura 1. Fotografías de ejemplares en campo 1) planta juvenil. 2) planta adulta en etapa vegetativa. 3) y 4) Planta en etapa reproductiva (NaturaLista, 2018).

Etimología: Esta nueva especie está dedicada a la vida y el legado de la Dra. Helia Bravo Hollis, por su gran contribución al conocimiento de las cactáceas de México (García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015).

Distribución y conservación: Esta especie del género *Turbinicarpus* tiene la distribución más sureña, encontrándose en el estado de Hidalgo en los alrededores del municipio Santiago Anaya. Hasta la fecha se conocen pocas poblaciones, que comprende menos de 500 plantas. El hábitat de esta nueva planta corresponde a un matorral xerófilo, asociado con algunas especies de cactáceas, agaves y leguminosas arbustivas. El suelo en el área es piedra caliza oscura, con muchas fracciones de roca. El intervalo de distribución de esta planta es de aproximadamente 6 km² en laderas superiores de pequeñas colinas entre los 2200 y los 2300 m de altitud (García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015).

La principal amenaza para *Turbinicarpus heliae* es el pastoreo de ganado, ya que el hábitat no es adecuado para actividades agrícolas. Se propone el estado de conservación de esta

especie como “**En peligro de extinción**”, a la vista de su estrecha distribución y el bajo número de plantas conocidas en todo su rango de distribución y a su ya activo comercio y distribución como planta ornamental en el ámbito de los coleccionistas de cactáceas mexicanos y extranjeros (García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015; Rosa Carrillo et al., 2012).

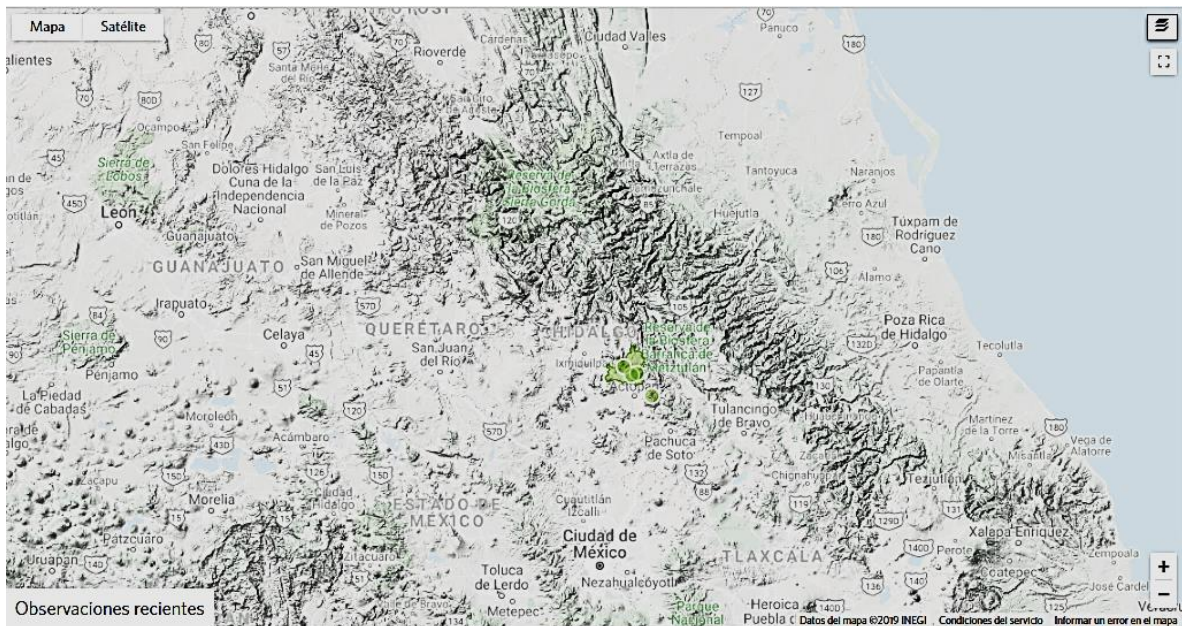


Figura 2. Mapa de distribución, en verde los avistamientos recientes. (NaturaLista, 2018)

Fenología: *Turbinicarpus heliae* es un taxón de floración temprana. Floración a partir de finales de enero y se extiende irregularmente a principios de abril, la fructificación se produce 6-8 semanas después de la polinización. Se observaron en el campo sin polinizadores, pero las flores dañadas por las hormigas estaban presentes (García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, 2015; NaturaLista, 2018).

4. Justificación

Para *Turbinicarpus heliae* se ha registrado un bajo número de ejemplares en un rango corto de distribución, además, está amenazada por el pastoreo y el saqueo ilegal para su comercio como ornamental. El uso de técnicas alternativas al cultivo tradicional podría producir un mayor número de ejemplares en un menor tiempo, lo que generaría material suficiente para satisfacer las necesidades del mercado y continuar con su estudio sin afectar a la población natural. La descripción de esta especie es reciente y son escasos los trabajos sobre ella, por lo que es necesario continuar con su estudio para generar información.

5. Hipótesis

El uso de los reguladores de crecimiento vegetal (citocininas y auxinas) en el medio de cultivo modifican las respuestas morfogénicas en tejidos vegetales. Por lo que se espera que al emplear estas fitohormonas, los inóculos de plántulas obtenidas *in vitro* presenten activación areolar lo que permitirá proponer un protocolo para su propagación masiva.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *Turbinicarpus heliae* a partir de semillas.

6.2. Objetivos particulares

Determinar el método adecuado para la desinfestación de semillas para el cultivo *in vitro*.

Comparar los métodos de cultivo tradicional e *in vitro* de semillas para la propagación de *T. heliae*.

Evaluar la respuesta morfogénica a diferentes concentraciones de medio Murashige & Skoog (MS) y, citocininas, BAP (6-benzilamino-purina) y KIN (kinetina) para el desarrollo de brotes.

Evaluar la respuesta morfogénica con las auxinas **ANA** (Ácido 1-naftalenacético), **AIA** (Ácido indol-3-acético) y **AIB** (Ácido indol-3-butírico) para el desarrollo de raíces.

Establecer un proceso de adaptación a suelo (aclimatización) de plántulas obtenidas *in vitro* para su establecimiento *ex vitro*.

7. Material y Métodos

7.1. Material Biológico

Se utilizaron 145 semillas de *Turbinicarpus heliae* donadas por el Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (Jardín botánico FESC, UNAM). Las semillas provenían de frutos frescos (fructificación 2017) con solo 15 días de haberse retirado del fruto.

7.2. Establecimiento y evaluación del cultivo de semillas

7.2.1 Preparación de medio para germinación



Figura 3. Compuestos para la preparación del medio MS.

El medio de cultivo para la germinación fue MS al 50% (Anexo 1 composición de medio MS), adicionado con 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar gel (Figura 3). Se vertió el medio en recipientes de vidrio, 25 mL por frasco, para ser esterilizados en autoclave por 15 minutos, a presión de 1kg/cm^2 y una temperatura de $120\text{-}121^\circ\text{C}$ (Figura 4). Una vez estéril se colocaron los frascos en bolsas de plásticas para su enfriamiento y almacenamiento hasta la siembra.



Figura 4. Esterilización del medio en autoclave.

7.2.2 Lavado y desinfestación de semillas

Las semillas se introdujeron en sobres de papel filtro para facilitar su manejo, los cuales se aseguraron con un clip, los sobres se realizaron como indica la figura 5 de la siguiente manera:

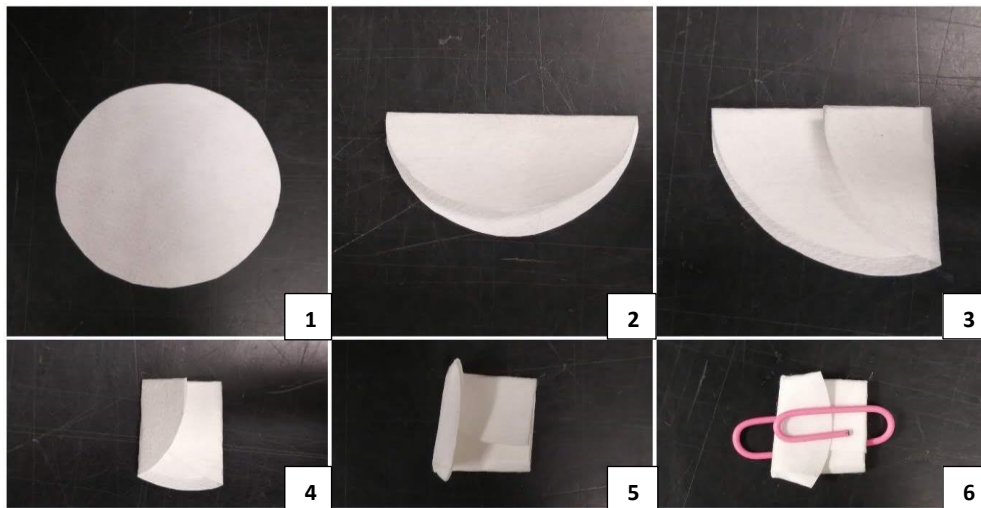


Figura 5. Elaboración de sobres de papel filtro para desinfestación y siembra de semillas.

Para la primera prueba de lavado y desinfestación se usaron 30 semillas sin almacenamiento (3 semillas por sobre y un sobre por frasco). Los sobres se mantuvieron en agitación suave en una solución de agua destilada estéril y cloro comercial a 5:1 v/v, más una gota de jabón por 15 min, para luego ser enjuagadas 3 veces en agua destilada estéril y para posteriormente ser cultivados en los recipientes con medio de cultivo para la germinación. (Figura 6). Todo esto se realizó bajo condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar.

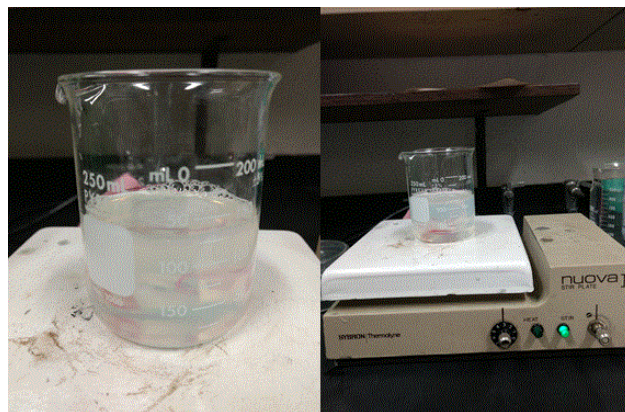


Figura 6. Desinfestación de sobres de la primera prueba con semillas de *Turbinicarpus heliae*.

En la segunda prueba se utilizaron 100 semillas almacenadas durante cinco meses (5 semillas por frasco), las semillas se mantuvieron en agitación directa (sin sobre) en agua estéril con 3 gotas de Tween 20 por 15 min, luego fueron pasadas a una solución de agua estéril con cloro comercial a 5:1 v/v y una gota de jabón líquido por 15 min para finalizar con tres enjuagues de agua estéril (Figura 7). La elaboración y esterilización del medio y, desinfestación de las semillas la fue basada en trabajos realizados dentro de UIBV y de su manual (Luna Rosales & Barba-Álvarez, 2017).

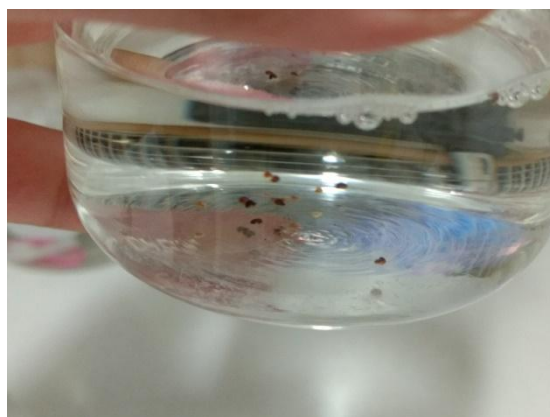


Figura 7. Lavado y desinfestación de segunda prueba.

7.2.3 Siembra de semillas *in vitro*

Una vez desinfestadas las semillas, de ambas pruebas, se procedió a la siembra. Con ayuda de unas pinzas, se les retiró el clip de los sobres y se introdujeron en el frasco a manera que quede abierto el sobre en el medio, con las semillas en la parte superior del papel (Figura 8).

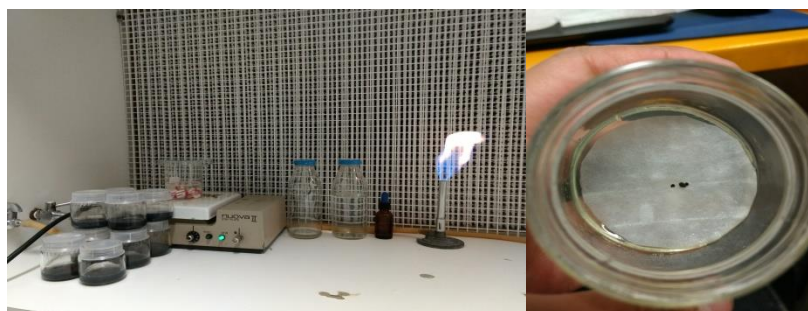


Figura 8. Siembra de sobres con semillas de *Turbinicarpus heliae*.

La siembra de la segunda prueba se llevó de la misma manera con la diferencia de que las semillas se sembraron individualmente directamente sobre el medio de cultivo.

7.2.4 Siembra de semillas *ex vitro*

El sustrato se preparó con tepojal y tezontle (con 5 mm de diámetro de partícula), más tierra negra comercial en proporciones iguales de cada elemento. Se le adicionó agua para ser esterilizado en microondas por 15 min. El sustrato se enfrió y se colocó dentro de un envase Pet previamente lavado con jabón y, enjuagado con una solución de agua y cloro 5:1 v/v. El envase se cortó transversalmente a la mitad dejando una pequeña zona sin cortar para facilitar su cerrado.

Las semillas se lavaron con el mismo procedimiento para la siembra *in vitro* del primer tratamiento. Se procedió a colocar 15 semillas ya lavadas sobre el sustrato con ayuda de unas pinzas y se procedió a cerrar el envase y sellarlo con plástico autoadherente (Figura 9), estas incubaron en la mismas condiciones de todos los tratamientos *in vitro*.



Figura 9. Envase ya sellado después de la siembra, listo para incubarse.

7.2.5 Incubación

Esta se llevó a cabo bajo 16/8 horas luz-oscuridad a una intensidad de 1076.39 lux y a una temperatura de 25°C \pm 5°C (Figura 10). Estas condiciones se utilizaron en todos los tratamientos y subcultivos realizados en este proyecto (Hurtado & Merino, 2014).



Figura 10. Sala de incubación de la UIBV e imágenes de las temperaturas de la sala.

7.2.6 Evaluación de germinación

La evaluación de la germinación se llevó a cabo contando las semillas germinadas durante 30 días, al transcurrir estos se contabilizó el número de plántulas sobrevivientes, y las semillas contaminadas. Se realizó una curva de germinación con estos datos y se obtuvo el porcentaje de germinación utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{Número total de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

7.3. Cultivo, multiplicación y evaluación de brotes o embriones

7.3.1 Medio para cultivo de explantes

Fueron utilizados dos medios con distinta concentración en sales basales: MS al 50% y MS al 100%, ambos medios fueron adicionados con 30 gramos de sacarosa, 6 g/L de agar gel y, 2 g/L de carbón activado (Figura 11).



Figura 11. Elementos para preparación de Medio MS para cultivo de explantes.

Para la concentración de MS 50% se manejaron los siete tratamientos con el fin de inducir la activación areolar: un control sin fitohormonas y seis con las siguientes concentraciones: 1, 2, 3 mg/L de BAP y 1, 2, 3 mg/L de KIN en tratamientos separados con 3 repeticiones cada uno (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos en medio MS al 50% para la activación areolar de <i>Turbinicarpus heliae</i>			
+ 30 g/L de Sacarosa + 6 g/L de Agar Gel + 2 g/L de CA + 0.1 mg de Piridoxina + 0.4 mg de Tiamina			
+ BAP (6-Bencilaminopurina)			
Control (0 mg/L)	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L
Nombre del tratamiento	BAP 1	BAP 2	BAP 3
+ KIN (kinetina)			
	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L
Nombre del tratamiento	KIN 1	KIN 2	KIN 3

En el medio MS 100% se utilizaron los siguientes seis tratamientos: Control (Sin fitohormonas), 3, 4, 5, 6 y 8 mg/L de BAP con 6 repeticiones por tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos en medio MS al 100% para la activación areolar de <i>Turbinicarpus heliae</i>					
+ 30 g/L de Sacarosa + 6 g/L de Agar Gel + 2 g/L de CA + 0.1 mg de Piridoxina + 0.4 mg de Tiamina					
+ BAP (6-Bencilaminopurina)					
0mg /L	3mg /L	4mg /L	5mg /L	6mg /L	8mg /L
Nombre del tratamiento	BAP 3	BAP 4	BAP 5	BAP 6	BAP 8

7.3.2 Cultivo de explantes



Figura 12. Siembra de explantes en campana de flujo

El protocolo para el cultivo fue el mismo sin importar el medio al que fueron sembrados los explantes. Bajo condiciones de asepsia las plántulas *in vitro* se pasaron a una caja Petri y se sumergieron en una solución estéril de ácido cítrico y ácido ascórbico con 3g/L de cada uno. Se hicieron cortes transversales en la plántula con 2 a 3 mm de grosor, para finalizar con tres o cuatro cortes por brote (como se muestra en la figura 13), se colocaron todos los cortes del brote por frasco.

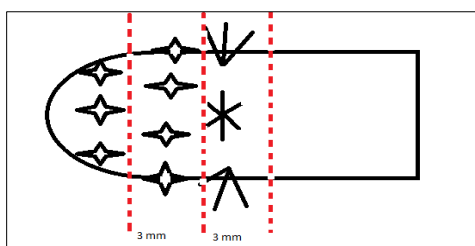


Figura 13. Cortes transversales en brote.

7.3.3 Evaluación de morfología de producción de brotes

La evaluación del desarrollo morfológico se hizo una vez por semana durante 12 semanas. Los elementos que se evaluaron fueron los siguientes:

Elementos a evaluar	Abreviaturas
Porcentaje de callo	PDC
Brotes nuevos	BN
Número de raíces	NR
Oxidación	O
Contaminación	C

7.4. Enraizamiento

7.4.1 Medio para enraizamiento

Se utilizó medio MS al 100% adicionado con 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de agar gel, 2g/L de carbón activado y como tratamientos se usaron seis con fitohormonas, 3 y 5 mg/L de AIB,

3 y 5 mg/L AIA y 3 y 5 mg/L de ANA y un tratamiento control de cada tratamiento, con 6 repeticiones.

7.4.2 Evaluación de morfología de producción de raíces

Los aspectos a evaluar se registraron una vez por semana durante 12 semanas. Los elementos a evaluar fueron los siguientes:

Elementos a evaluar	Abreviaturas
Porcentaje de callo	PDC
Número de brotes	NB
Brotes nuevos	BN
Número de raíces	NR
Oxidación	O
Contaminación	C

7.5. Aclimatización de las plántulas

7.5.1 Preparación de sustrato para aclimatización

El sustrato se preparó con tepojal de una medida de 5 mm de diámetro aproximadamente, se lavó quitándole todas las arcillas que pudiera tener y se colocó dentro de envases de cristal, y se agregó agua, se sellaron con papel aluminio con ayuda de ligas y esterilizó en autoclave por 15 minutos (Figura 14).



Figura 14. Lavado y esterilización de sustrato para aclimatización.

7.5.2 Aclimatización

Preparación de recipientes para plantado: Se utilizaron recipientes de plástico lavados con agua y jabón, y desinfectados con una solución de agua y cloro al 5:1 v/v. Se vertió el sustrato agregando solo el material mineral y se colocó el recipiente en una bolsa plástica hasta su uso (Figura 15).



Figura 15. Recipiente con sustrato estéril listo para la siembra.

Preparación de brotes para plantado: Para extraer los brotes de las condiciones *in vitro* primero se les agregó agua potable ligeramente tibia para liberarlos del agar gel, con ayuda de una pinzas se extrajeron uno por uno los brotes y se sumergieron en una solución agua potable con fungicida Manzate 200 conjunto con fertilizante Peters 10-30-20 (1g/L de cada uno), se mantuvieron en la solución por 20 min con agitación frecuente para limpiar bien

los rastros del medio, al transcurrir este tiempo fueron colocaron sobre charolas con papel absorbente y se cubiertos con papel absorbente y plástico para evitar con contaminación, este proceso se llevó fuera de la campana de flujo laminar (Figura 16).

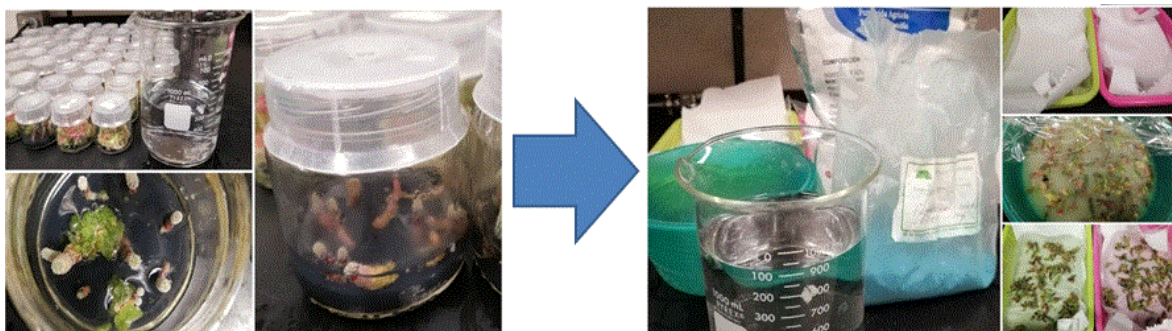


Figura 16. Preparación de plántulas para trasplante *ex vitro*.

Plantado: Con ayuda de la pinzas se hizo un orificio en el sustrato, se extrajo cada brote y plantó en este. Al finalizar de plantar todos los brotes por charola se regó con la solución de Manzate y Peters usada anteriormente (Figura 17), se cerraron las charolas, se colocaron en las bolsas de plástico y, la bolsa se selló con cinta adhesiva. Los recipientes ya sellados se colocaron en incubación.



Figura 17. Plantado de plántulas en charola para aclimatización.

Aclimatización: En la primera semana se realizaron unas pequeñas perforaciones en la bolsa con ayuda de una aguja de disección, a la segunda semana se realizaron más perforaciones, para la tercera semana se retiró la bolsa, a la cuarta semana se comenzó a abrir la tapa del recipiente, cada semana se abrió más la tapa del recipiente, hasta finalizar por retirarla completamente a la sexta semana. El riego se mantuvo semanalmente con agua potable y una vez al mes con solución Manzate y Peters (1 g/L de cada uno).

7.5.3 Evaluación de sobrevivencia

Para la evaluación de sobrevivencia se contaron los sobrevivientes a los tres meses y se dividieron con el número de plantas totales que se cultivaron, para sacar un promedio.

$$\text{Porcentaje de sobrevivencia} = \frac{\text{total de brotes sobrevivientes}}{\text{Total de brotes plantados}} \times 100$$

7.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en las pruebas de activación de areolas y producción de raíces. Se realizó un ANDEVA para comparar las medias de los diferentes tratamientos y determinar si existe diferencia significativa entre ellos, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS centurión 16.1, el análisis fue propuesto por el M en C Armando Cervantes Sandoval maestro de FESZ UNAM.

8. Resultados y análisis

8.1. Establecimiento *in vitro* y germinación

8.1.1 Lavado y desinfestación de semillas

La técnica de desinfestación y la siembra *in vitro* para el primer tratamiento resultó adecuada obteniendo el 93.33% de semillas asépticas. La contaminación fue de 6.67, esta se debió a la proliferación de un hongo como se muestra en la figura 18.



Figura 18. Plántula y semillas contaminadas por hongo a simple vista en la imagen central y desde un microscopio en imágenes laterales.

En el segundo tratamiento el porcentaje de asepsia fue del 85%, teniendo una respuesta muy similar al primer tratamiento. A diferencia del primer tratamiento este también presentó contaminación bacteriana, posiblemente por fallo en el proceso, la contaminación fue visible a partir de la primera semana. En la figura 19 se muestra los tratamientos en la tercera semana contaminados por bacterias y hongos en el orden correspondiente.



Figura 19. Frascos con semillas contaminadas de la segunda siembra.

Para la siembra de semillas *ex vitro* la contaminación fue nula en el primer mes, obteniendo un total de 100% de asepsia; por lo que, podemos decir que el proceso de lavado y desinfestación de semillas fue exitoso, Sin embargo al empezar el proceso de

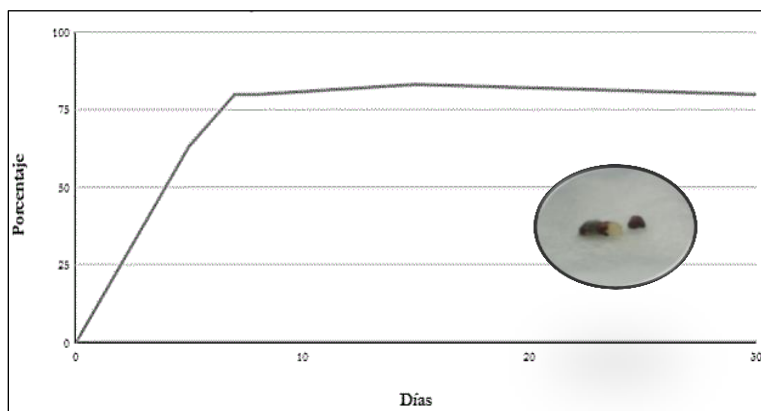
aclimatización en invernadero en condiciones no asépticas esta prueba se contaminó por hongos debido a la humedad presente en el sustrato y a los agentes patógenos presentes en el ambiente, se perdieron casi en su totalidad las plántulas obtenidas, quedando dos plántulas que fueron insuficientes para realizar la comparación de desarrollo del método *in vitro* - *ex vitro*.

Esta etapa es la más crítica y de mayor importancia en el proceso de regeneración *in vitro*, determina el éxito en la asepsia que se podría ver afectada por la contaminación endógena o exógena causada por bacterias y hongos (Papafotiou, Balotis, Louka, & Chronopoulos, 2001).

8.1.2 Germinación

En la primera prueba *in vitro*, la germinación observó desde el tercer día, el porcentaje máximo de germinación se obtuvo el día 15 con un 83.3%, pero algunas plántulas se murieron así teniendo a los 30 días una sobrevivencia total 80% de plántulas sobrevivió, resultando un total de 24 plántulas, las cuales fueron las utilizadas para los tratamientos posteriores.

En la segunda prueba *in vitro*, la germinación no fue exitosa, se obtuvo únicamente el 2 % de germinación, a partir del día 20 y, cinco días después las plántulas murieron. Durante el cultivo solo se logró apreciar el aumento en el tamaño de las semillas, ésto debido al proceso de imbibición.



Grafica 1. Porcentaje de germinación de *Turbinicarpus heliae* *in vitro* en medio MS al 50% + 30 g/L de sacarosa + 6 g/L de agar.

La germinación en sustrato también comenzó a partir del tercer día, y a los 15 días se obtuvo su máxima germinación con 93.3%, de las que resultaron 14 plántulas (Figura 21).



Figura 21. Plántulas de *T. heliae* sembradas sobre sustrato.

En diversos trabajos se ha comprobado que la combinación de factores en ambiente controlado (temperatura +/- 25°C y un fotoperiodo 16/8 horas luz oscuridad) y un medio MS en una concentración de sales al 50% favorece la germinación *in vitro*. La reducción de la fuerza iónica del medio de cultivo al bajar la concentración de las sales al 50% se ha realizado en otras cactáceas, (*Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Mora y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britto & Rose, para favorecer el metabolismo celular de la semilla, activar el crecimiento del embrión y el proceso enzimático de los tegumentos (Villavicencio et al., 2011).

Además de acuerdo con Maiti et al., (1994) especies con semillas de cactáceas tienen una testa delgada y sólo requieren de condiciones ambientales favorables para su germinación, ya que existe una fuerte relación entre la estructura externa de la semilla y el proceso germinativo, en donde los componentes del medio son importantes, para que la cubierta se rompa y emerja una nueva plántula. También se ha registrado que algunas especies en el género *Turbinicarpus* tienen latencia en semillas y otras no. Esto implica que hay dos grupos de especies en este género: especies con la capacidad de formar bancos de semillas y especies que no forman bancos de semillas (Flores et al., 2008; Villavicencio et al., 2011). Por lo que con los resultados obtenidos podemos concluir que la utilización de semillas frescas y la combinación utilizada en este trabajo, resultan adecuados para la germinación de *T. heliae*.

Los resultados de la primera siembra *in vitro* y la siembra en sustrato las cuales se realizaron aproximadamente al mes de ser recolectadas muestran porcentajes de germinación alto, considerando que algunas de las especies del género solo alcanzan el 8% de germinación. Esto se puede deber a que aún no habían entrado a un proceso/mecanismo de latencia o pérdida de viabilidad. En el caso de la segunda prueba que se llevó a cabo aproximadamente 5 meses después de la recolección la germinación fue muy baja o casi nula, lo que se puede deber a alguno de los procesos mencionados, ya que los factores ambientales y el medio de estas siembras fueron los mismos. Para comprobarlo Recomienda realizar más pruebas (Flores et al., 2008).

Debido a la baja germinación en la segunda prueba *in vitro* sería importante hacer pruebas con auxinas, según Villavicencio y colaboradores (2011) mencionan que, para favorecer la germinación en semillas en proceso de latencia comprobaron que la interacción del medio base para la germinación con ácido giberélico (AG^3), presentó un efecto positivo en proporciones diferentes. El medio MBG compuesto con las sales del medio MS al 50 % adicionado con AG^3 duplica la emergencia de las plántulas, con respecto al medio sin AG^3 , obteniendo un porcentaje de germinación superior al que puede obtenerse en condiciones naturales.

8.2. Desarrollo y multiplicación

8.2.1 Activación areolar en medio MS al 50%

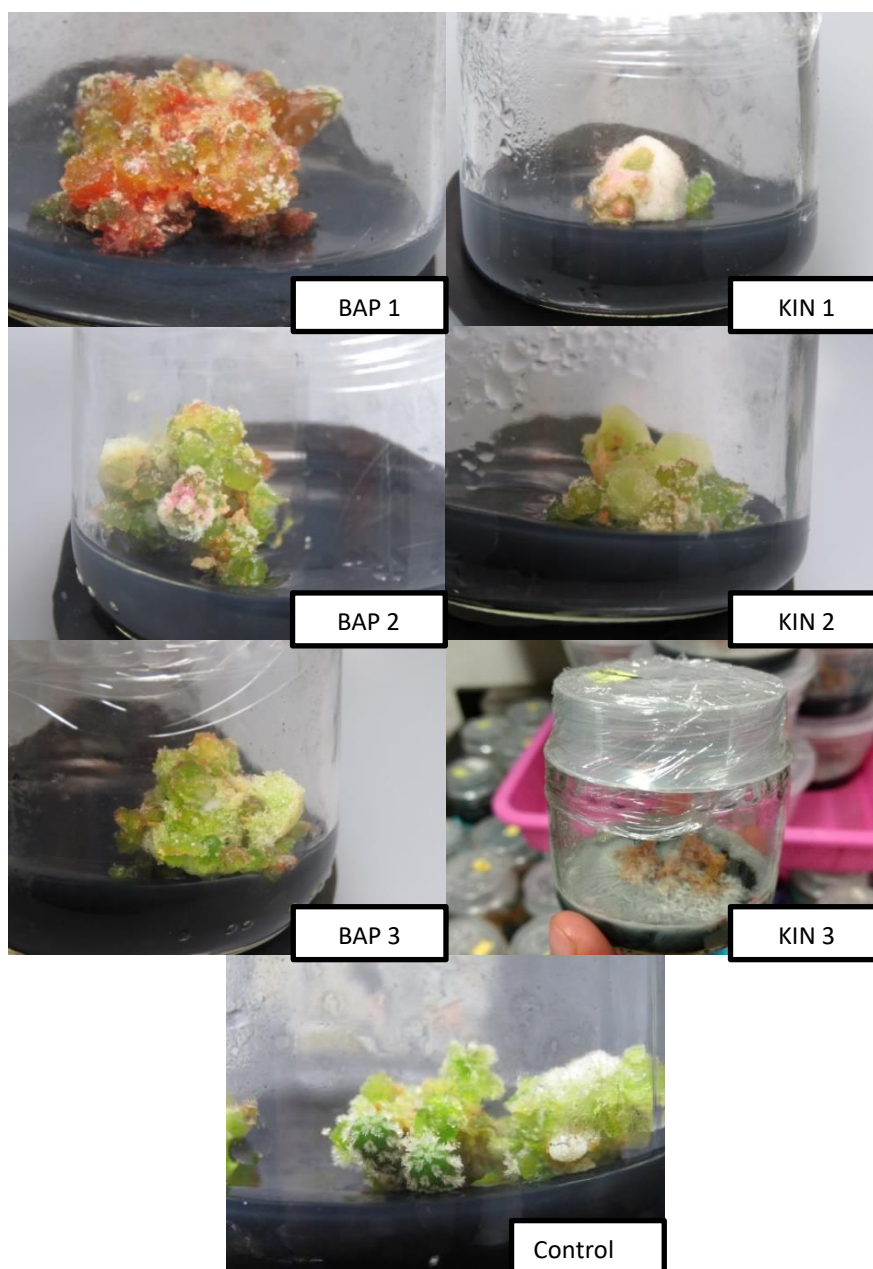
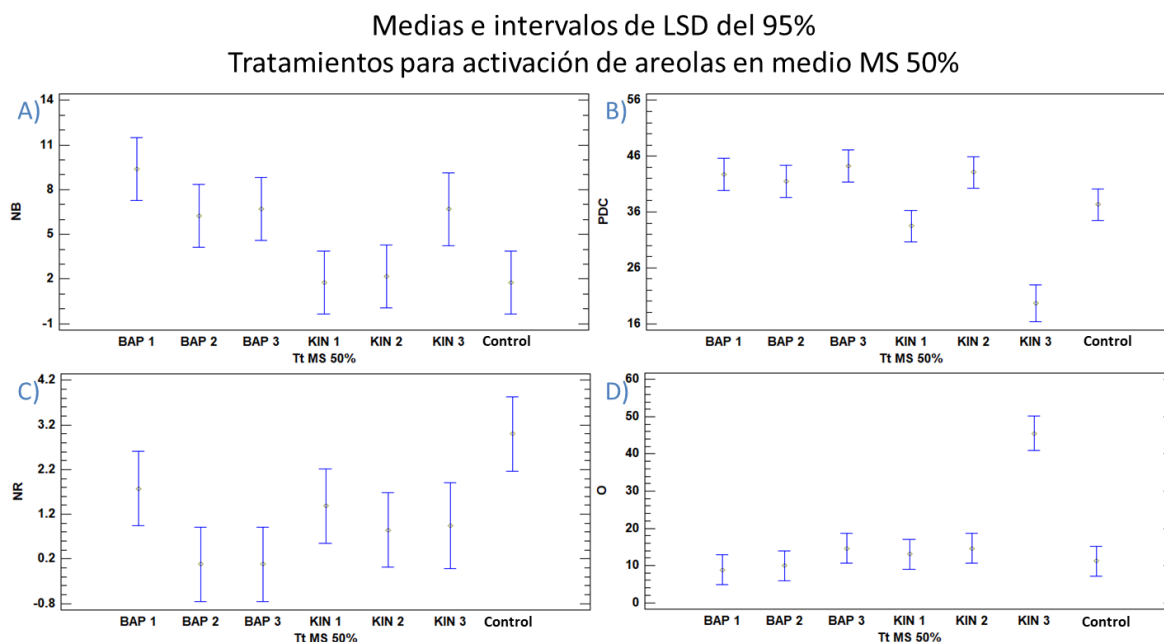


Figura 22. Fotos de tratamientos MS al 50% para activación de areolas.

La activación areolar se pudo observar desde la segunda semana en el tratamiento **BAP 2** y **BAP 3**, a la quinta semana esta se observó en todos los tratamientos. Los tratamientos que estadísticamente presentan mejor resultado de acuerdo a la ANDEVA realizada a las 12 semanas son **BAP 2**, **BAP 3**, **KIN 3** y **BAP 1** los cuales no presentan una diferencia

significativa entre ellos, teniendo al tratamiento **BAP 1** con el mayor número de brotes, con 28 brotes al transcurrir como se muestra en el esquema 1, A).

Los explantes generaron producción de callo (**PDC**), en todos los tratamientos desde la segunda semana en zonas de corte, el callo se caracterizó por ser de color blanco, y al continuar su crecimiento la tonalidades fueron más verde claro y rosa (posibles betalainas, según lo señala Santos Díaz, Vélasquez García, & Gonzáles Chávez (2005)), con consistencia suave. El mayor porcentaje de callo, con una media de 60%, se obtuvo en los tratamientos **BAP 3**, **KIN 1**, **BAP 1** y **BAP 2** al finalizar las 12 semanas de cultivo, inciso B) del esquema 1.



Esquema 1. Medias e intervalos de LSD (Least significant difference) de las diferentes respuestas morfológicas en los tratamientos para activación de areolas en medio MS 50% en la semana 12. A) Número de brotes (NB). B) Porcentaje de callo (PDC). C) Número de raíces (NR). D) oxidación (O) .

En algunos explantes se pudo observar que en las zonas basales que se empezaron a formar raíces, principalmente en la zona de corte del corte apical. Las medias más altas en formación de raíz fueron en los tratamientos **Control**, **BAP 1** y **KIN 1** sin presentar diferencias significativas entre ellos como se muestra en el esquema 1, inciso C), sin

embargo en el tratamiento control se obtuvo mayor generación de raíces, con 12 raíces al finalizar el tiempo de evaluación de evaluación. En los tratamientos **BAP 2**, **BAP 3** y **KIN 3** no tuvimos respuesta.

La oxidación (**O**) de los explantes se tomó en cuenta por ser un síntoma de una respuesta negativa al tratamiento. Los explantes en la mayoría de los tratamientos presentaron una oxidación muy baja, que no pasó del 10%, esta respuesta de O se observó principalmente en zonas de corte. El valor de la media más alta de O se presentó en el tratamiento **KIN 3** (esquema 1, D).

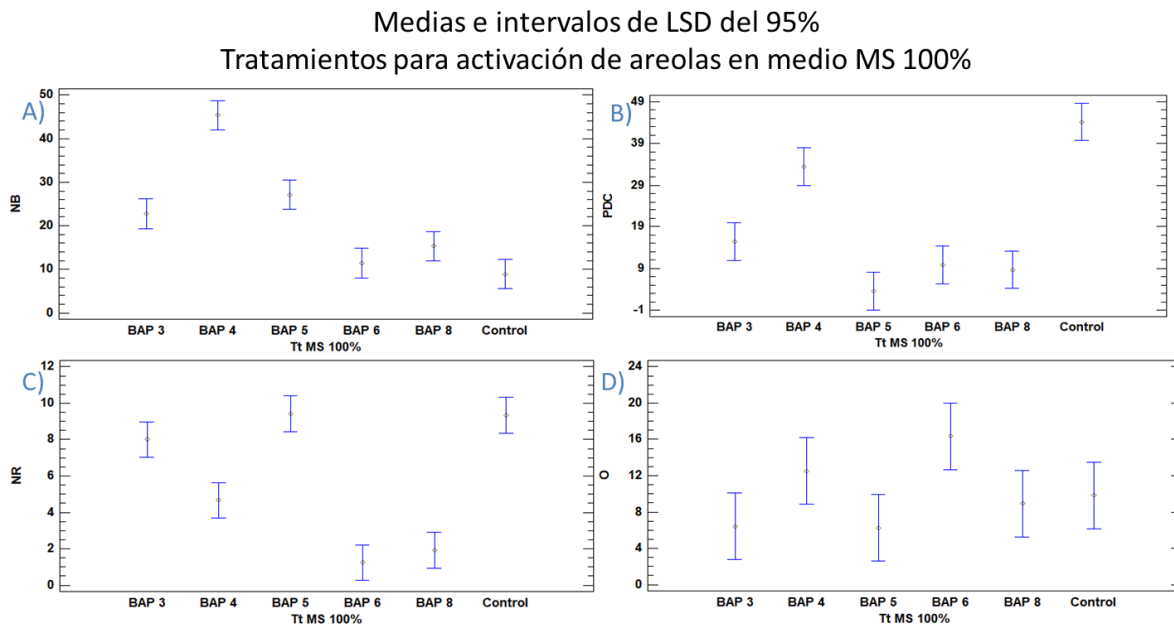
8.2.2 Activación areolar en medio MS al 100%

La brotación en los explantes se observó a partir de la tercera semana en todos los tratamientos. Al finalizar el periodo de las 12 semanas de evaluación como se muestra en la esquema 2, A), se obtuvieron 66 brotes y una media de 45.41 en el tratamiento **BAP 4**, seguidos de los tratamientos **BAP 3** y **BAP 5** que no presentaron una diferencia significativa entre ellos, donde se obtuvieron 33 y 41 brotes respectivamente.

La producción de callo se generó en explantes cultivados en todos los tratamientos a partir de la tercera semana, los porcentajes obtenidos variaron entre los tratamientos obteniendo las medias más bajas en los tratamientos **BAP 5**, **BAP 8** y **BAP 6** una media menor de 10%, en la gráfica B) del esquema 2 se puede visualizar las medias con respecto a la producción de callo en estos tratamientos, El objetivo de utilizar la citocinina en estos tratamientos es evitar la producción de tejido calloso , así como la menor pérdida de explantes por vitrificación, resultando en el tratamiento control una media más alta de PDC y una pérdida del 47.6% de los explantes.

El desarrollo de raíces no se generó en todos los tratamientos y en aquellos en los que se generaron se observaron desde la primera semana. Al igual que los tratamientos en el medio MS al 50% las raíces se generaron principalmente en el corte apical del brote. La cantidad de raíces generadas en los tratamientos **BAP 3**, **BAP 5** y el **Control** no presentaron diferencias significativas (ANEXO) siendo las medias más altas como se puede apreciar en la gráfica C), teniendo 8, 12 y 7 raíces correspondientemente al finalizar el tiempo de evaluación, como se pueden apreciar en algunas fotografías de la imagen .

La oxidación de los explantes, se mantuvo baja, menos del 16% en todos los tratamientos esquema 2, D).



Esquema 2. Medias e intervalos de LSD (Least significant difference) de tratamientos para activación de areolas en medio MS 100%. A las 12 semanas A) Número de brotes (NB). B) Porcentaje de callo (PDC). C) Número de raíces (NR). D) oxidación (O).

Debido a que la generación de plantas a partir de la activación areolas (estructuras meristemáticas) se consideran genéticamente más estables, se tiene una preferencia en desarrollar sistemas de proliferación basados en esta, aunque, la producción es menor, pero, sirve como una gran herramienta para estudiar y hacer planes de conservación de una especie. (Dávila-Figueroa et al., 2005).

La proliferación de brotes secundarios (producción de nuevos brotes a partir de las areolas de los brotes generados en primer término) se logró apreciar en mucho de estos tratamientos, principalmente en los tratamientos con medio MS al 50% pero estos no se tomaron en cuenta para el análisis, este tipo de brotación ya se ha reportado para otras cactáceas, logrando así una proliferación mayor en un tiempo prolongado de cultivo (Pérez Molphe Balch & Davila Figueroa, 2002; Rosa Carrillo et al., 2012).

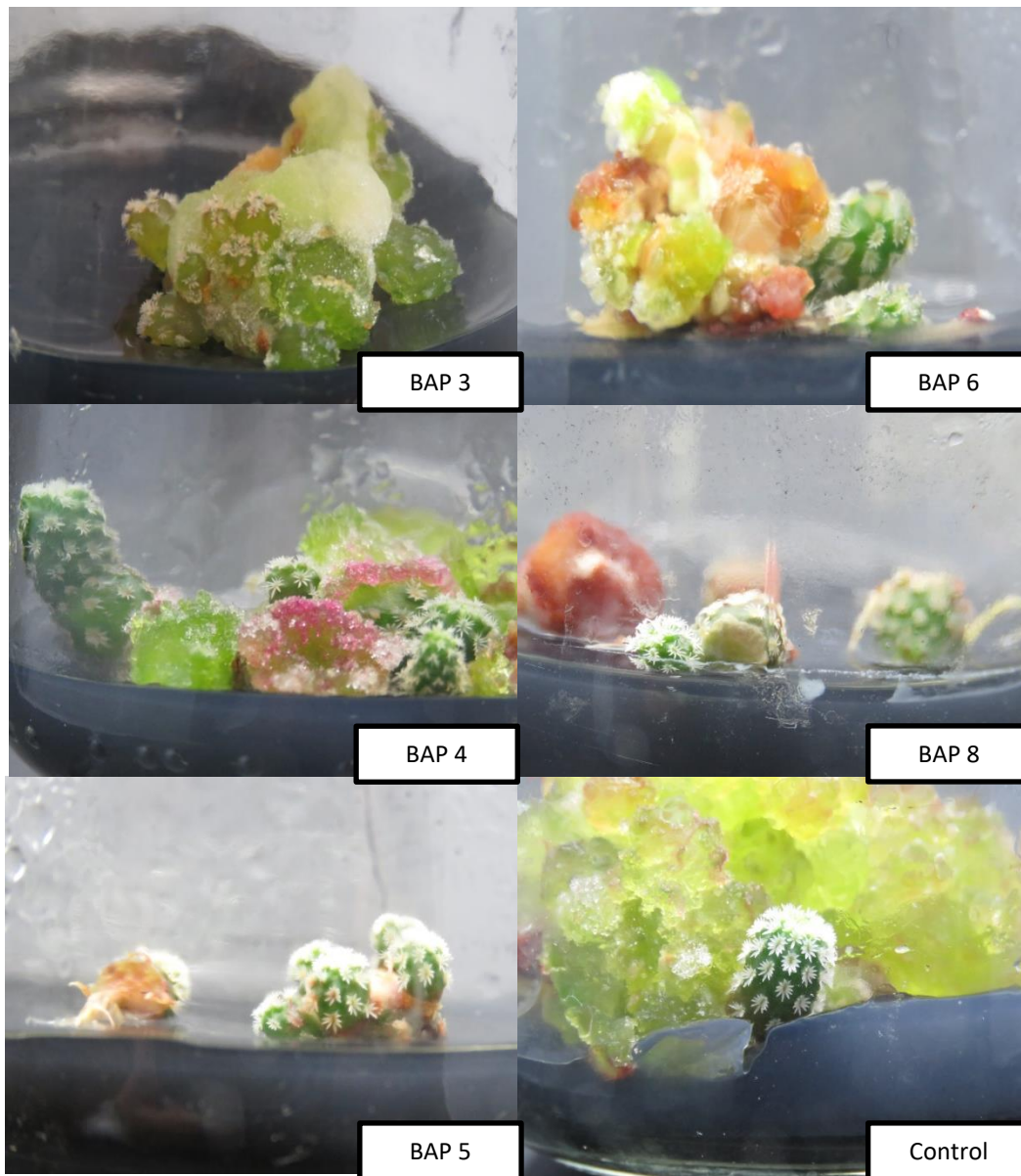


Figura 23. Fotos de tratamientos con medio MS al 100% para la activación de areolas

De acuerdo con Rosa Carrillo y colaboradores (2012) es posible llevar a cabo varios ciclos sucesivos de proliferación pasando a medio fresco los brotes generados nuevamente en el medio con BAP o KIN, multiplicando el material de forma exponencial. Sería posible obtener 9.59 brotes del tratamiento KIN 1 con medio MS al 50% que sólo obtuvo una media de 1.76 brotes (este siendo el tratamiento con respuesta más baja) , así mismo se pueden generar 4,632.5 brotes del tratamiento Control en medio MS al 100% que fueron los tratamientos con resultados más bajos en medio MS al 100% y también generar

4,252,124.84 brotes del tratamiento con mejores resultados que fue BAP 4 con medio MS al 100% con una media de 45.41 esto llevando a cabo 4 ciclos de propagación lo que sería equivalente a un año aproximadamente.

La adición de auxinas al medio de cultivo y cierto balance con las citocininas parece ser de gran importancia cuando se desea la producción de brotes, sin embargo, muchas veces esta interacción induce también una respuesta indeseable (la producción de callo). La activación areolar y la consecuente brotación directa también se ha observado en algunas especies con la sola presencia de citocininas y muy especialmente con el género *Turbinicarpus* (Sarabia, Zamudio, Estrada, & Arellano, 2016).

Arellano Perusquía y colaboradores (2013) han reportado que la adición de auxinas a los tratamientos con citoquininas a una concentración de 3 mg/L resulta adecuada para la regeneración de brotes y desarrollo de raíces. En este trabajo todos los tratamientos con citoquininas en medio MS al 100% tuvieron ambas respuestas, esto se puede deber a la concentración endógena de auxinas de estos explantes era adecuada, tal como sucede cuando se somete un brote a enraizamiento en condiciones *ex vitro* según describe Sarabia y colaboradores (2016).

8.3. Enraizamiento

La presencia de raíces se registró ver en todos los tratamientos desde la cuarta semana, aunque en los tratamientos **AIB 5** y **ANA 3** se observaron desde la primera semana. En el tratamiento **ANA 3** las raíces fueron abundantes las primeras semanas, pero estas se perdieron con el tiempo. El tratamiento con la media significativa más alta fue **ANA 3**, aunque, al finalizar el tiempo de evaluación este tratamiento tuvo un total de raíces muy similar a otros tratamientos. Los tratamientos **AIB 3**, **AIB 5**, **ANA 5** y el **Control** no presentaron diferencias significativas entre ellos, en donde se obtuvieron 14,21,20 y 9 respectivamente y fueron las medias que siguieron al tratamiento **ANA 3** (esquema 3, A)), las raíces producidas se pueden apreciar en la figura 24.



Figura 24. Explantes con raíces en la zona de corte.

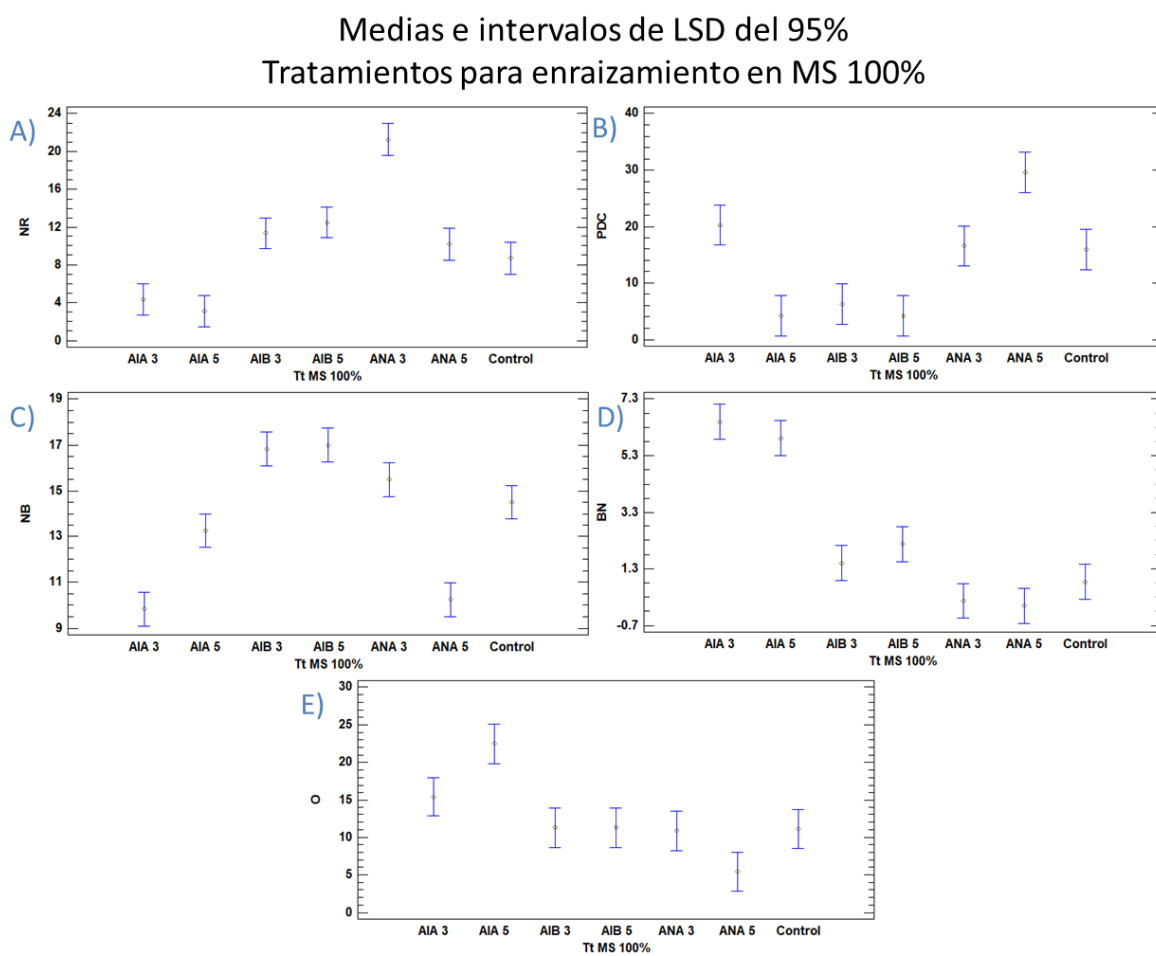
La formación de callo en estos tratamientos fue baja, con una media máxima de 30% aproximadamente. Este empezó su desarrollo en todos los tratamientos a partir de la cuarta semana. El tratamiento con media más alta es **ANA 5** aun que al finalizar el periodo de evaluación este y **AIA 3** tuvieron un porcentaje similar. Los tratamientos **AIA 5**, **AIB 3**, **AIB 5** son los que presentan menor formación de callo teniendo medias menores del 10% (Grafica B, esquema 3).

El 41% de los brotes que se pusieron a enraizar se sobrehidrataron y pasaron a ser callo. Los tratamientos más estables con medias más altas fueron **AIB 3** y **AIB 5** con una media de 17 brotes aproximadamente. Los tratamientos con mayor pérdida de brotes fueron **AIA 3** y **ANA 5**.

Una respuesta no esperada en estos tratamientos fue, la activación en areolas con la producción de nuevos brotes. No todos los tratamientos tuvieron esta respuesta, como en el caso de los tratamientos **ANA 3** y **ANA5**. La brotación fue baja a comparación de los tratamientos con citocinas, se logró obtener una media de siete brotes aproximadamente en los tratamientos **AIA 3** y **AIA 5**.

La oxidación fue baja en general, con un promedio del 15 % aproximadamente. La mayor oxidación con un poco más de 20% fue en el tratamiento **AIA 5** (gráfica C, esquema 3),

este factor se hizo evidente desde las pocas semanas de evaluación, otras de las características que también presentaron fueron la reducción del tamaño en los explantes, la coloración rojiza por estrés, la poca producción de callo y activación de areolas. Los nuevos brotes se mantuvieron muy pequeños, no hubo producción raíz y no fueron aptos para el proceso de aclimatización y enraizamiento.



Esquema 4. Medias e intervalos LSD en las diferentes respuestas morfológicas en los tratamientos de enraizamiento en medio MS 100% a las 12 semanas A) Número de raíces (NR). B) Porcentaje de callo (PDC). C) Número de brotes (NB). D) Brotes nuevos (BN). E) Oxidación (O).

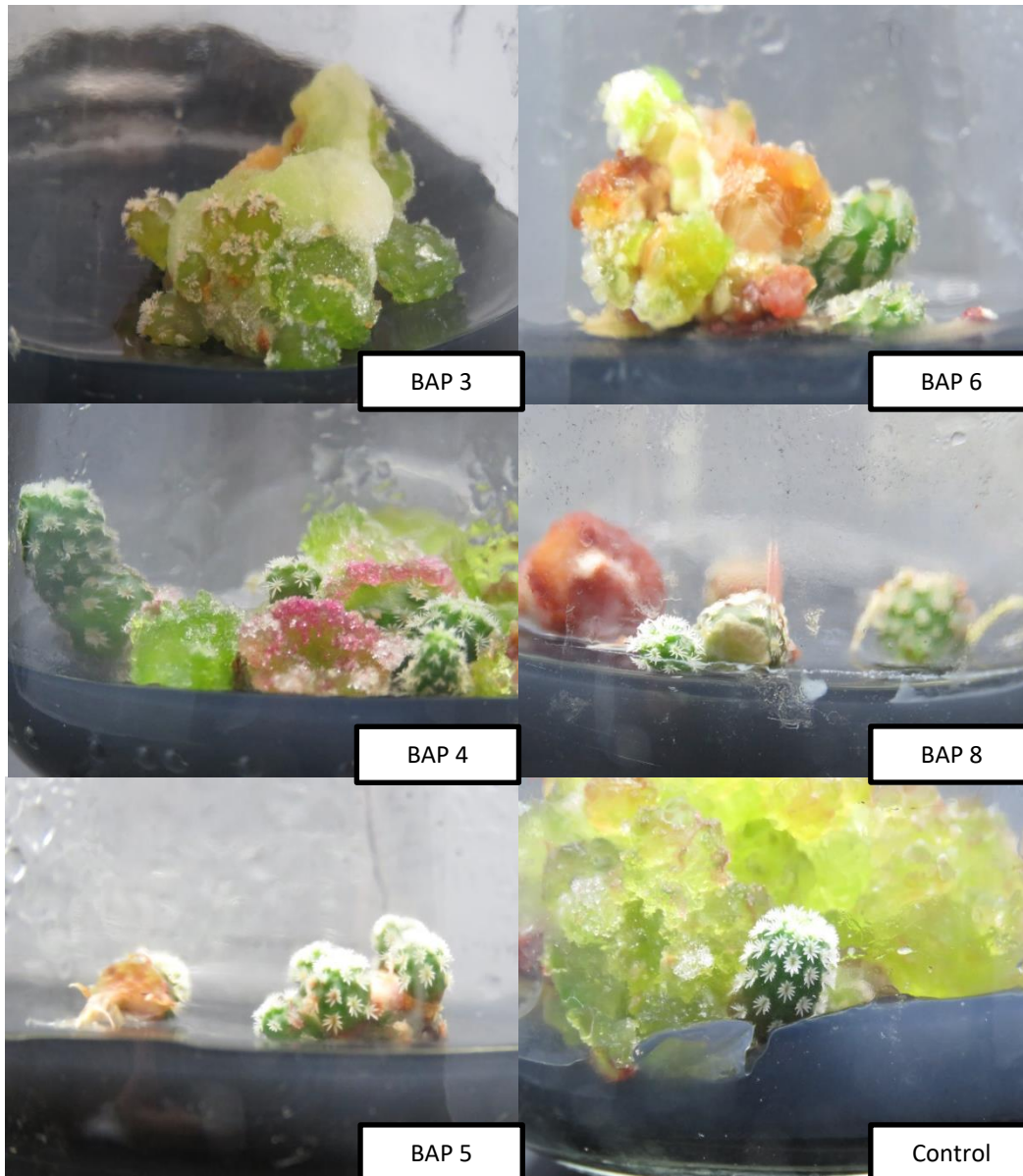


Figura 24. Fotos de tratamientos en medio MS al 100% para producción de raíz.

La vitrificación o hiperhidratación se apreció en todos los tratamientos de la fase 2 y 3 esto se debió posiblemente a la adición de únicamente 6 g/L de agar gel y no de 10 g/L como lo recomiendan Giusti y colaboradores (2002) para evitar este problema, con ello la disponibilidad de agua se reduce y evita la hiperhidratación de los explantes y brotes *in vitro*, de igual forma García Osuna y colaboradores en 2011 reporta que el uso de paclobutrazol (PBZ) y mayor cantidad de agar gel (8g/l) elimina totalmente la

hiperhidricidad en brotes y aumenta significativamente la organogénesis en *Turbincarpus valdezianus* (Rosa Carrillo et al., 2012)

8.4. Aclimatización



Figura 25. Plántulas retiradas del agar listas para el proceso de aclimatización, Posterior plantulas plantadas en sustrato estéril y al finalizar charola sellada lista para el inicio del proceso.

El proceso de aclimatización fue exitoso, con un porcentaje de sobrevivencia al mes de 90.79 %. La asepsia del cultivo se mantuvo durante todo el tiempo de evaluación ya que no se apreció ningún agente patógeno. Cabe destacar que las plántulas que se perdieron fueron plántulas que ya presentaban algún tipo de contaminación desde su frasco *in vitro*. La contaminación no se extendió a otras plántulas, se les dio ventilación desde la primera semana, hasta lograr mantener el sustrato totalmente seco por una semana y, a la semana se aplicó solución de Manzate 200 y Peters (1g/L) para así lograr erradicar posibles plagas y ayudar al desarrollo de raíces, lo que resultó exitoso. Durante este periodo no se logró apreciar un crecimiento notable en las plántulas.

En las secuencias de trabajos que presenta Dávila Figueroa en 2005 y Rosa Carrillo en 2012, utilizan una combinación de arena y tierra negra para la aclimatización, mantienen a las plántulas en una maceta dentro de una bolsa de plástico en condiciones de invernadero y reportan una sobrevivencia del 40 al 98.3% en las 22 especies de *Turbincarpus* que trabajan. Mata Rosas en 2000 reporta una sobrevivencia del 94 al 100% utilizando tierra volcánica y tierra negra para *Turbincarpus laui*. La utilización de tierra negra al sustrato muestra resultados, de igual forma con esta se podría evitar el uso de fertilizante.

9. Conclusiones

El establecimiento del cultivo a partir de semillas *Turbinicarpus heliae* fue exitoso.

La germinación fue exitosa para las siembras que se realizaron en fechas cercanas a la recolección de semillas; sin embargo, esta no sucedió cuando se usaron semillas almacenadas por 5 meses, lo cual pudiera atribuirse a que perdieron viabilidad.

Se logró conocer los efectos de las fitohormonas utilizadas en la regeneración *in vitro* de *T. heliae*.

El medio MS al 50% presentó un mayor desarrollo de callo y una menor regeneración de brotes a partir de areolas. Teniendo como el tratamiento con mayor media a BAP 1 con una media de 9.38 brotes y 22 brotes al finalizar el tiempo de evaluación.

La regeneración de brotes por activación areolar fue exitosa en todos los tratamientos con medio MS al 100% en donde se utilizaron citocininas. El tratamiento con mejor resultado en regeneración de brotes fue BAP 4 con una media de 45.41 brotes, y una producción final de 66 brotes.

Se observó que la adición de la citocnina BAP al medio en diferentes concentraciones logro la activación de los meristemos axilares sin la adición de auxinas.

El porcentaje de brotes enraizados total fue del 73% teniendo al tratamiento ANA3 con la media más alta, con 21.25 raíces con 20 raíces al concluir la evaluación seguidos por el tratamiento AIB 5 con 21 raíces y una media de 12.5 brotes.

La vitrificación y la producción de callo se apreciaron en todos los tratamientos de producción de brotes y enraizamiento, por lo que es importante buscar una alternativa para reducir esta respuesta.

La aclimatización se logró exitosamente utilizando únicamente material mineral y la adición de fertilizante foliar, teniendo así una sobrevivencia del 90.79%.

En resumen, el sistema de proliferación *in vitro* desarrollado para *T. heliae* puede usarse en la producción de plantas destinadas al uso sostenible, disminuyendo así las presiones

existentes sobre la población silvestre. En el futuro las plantas generadas *in vitro* podrían reintroducirse en su hábitat natural o comercializarse.

10. Referencias

- Alanís Flores, G. J., & Velazco Macías, C. G.** (2008). Importancia De Las Cactáceas Como Recurso Natural En El Noreste De México. *Ciencia Uanl*, 6(1), 5–11.
- Arellano Perusquía, A., López Peralta, M. C. G., Chablé Moreno, F., & Estrada Luna, A. A.** (2013). Effect of growth regulators on the organogenesis and multiplication of *Ortegocactus macdougalii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*, 13(4), 160–167. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/260312011%0AEffect>
- Arriaga, L.** (2009). Implicaciones del cambio de uso de suelo en la biodiversidad de los matorrales xerófilos : un enfoque multiescalar. *Investigación ambiental*, 1(195), 6–16.
- Badalament, O., Carra, A., Oddo, E., Francesco, C., & Sajeve, M.** (2016). Is in vitro micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? *Pelecypora aselliformis* as a case study. *Springer Plus*, 5, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1901-6>
- Cervantes Ramírez, M.** (2005). *Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. X Encuentro de Geógrafos de América Latina*. São Paulo. Recuperado de <http://www.observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal10/Procesosambientales/Usoderecursos/08.pdf>
- Cruz Angón, A.** (2014). *La biodiversidad en Chihuahua: Estudio de Estado* (1a ed.). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad* (Vol. 53). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dávila-Figueroa, C., Lourdes de la Rosa-Carrillo, M. de, & Pérez-Molphe-Balch, E.** (2005). In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(4), 540–545. <https://doi.org/10.1079/IVP2005668>
- Flores, J., Arredondo, A., & Jurado, E.** (2005). Comparative seed germination in species

of *Turbincarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal*, 25(2), 183–187.
Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/236323883>

Flores, J., Jurado, E., & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Breaking seed dormancy in specially protected *Turbincarpus lophophoroides* and *Turbincarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology*, 23(1), 43–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2008.00206.x>

García-Morales, L.; Díaz-Salim, J.; González-Botello, M.; Pérez-Badillo, C.; Flores-Lince, C. (2015). *Turbincarpus heliae* (cactaceae) a new species from Central Mexico. *Xerophilia*, 8.2(November), 2–8.

García, B., Muñoz, H., & de Oliveira, O. (2018). *Encuesta intercensal 2015. Instituto Nacional de Estadística y geografía*. Mexico. <https://doi.org/10.2307/j.ctv26d9pv.32>

García Osuna, O. H., Benavides Mendoza, A., Escobedo Bocado, L., Villarreal Quintanilla, J. A., & Cornejo Oviedo, E. (2011). Hyperhydricity control of in vitro shoots of *turbincarpus valdezianus* (Möller) GL & F. *Phyton*, 80(December), 175–179.

Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., & Tucci, M. (2002). in vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95, 319–332.

Hernández, H. M., & Godinez, A. (1994). *Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas*. *Acta Botánica Mexicana* (Vol. 26). México.
<https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5745>

Hernández Oria, J. G., Chávez Martínez, R., & Sánchez Martínez, E. (2007, noviembre). Factores de riesgo en las cactacea amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto chihuahuense, México. *Interciencia*, 32(0378–1844), 728–734.
Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/46406228>

Hubstenberger, J. F., Clayton, P. W., & Phillips, G. C. (1992). Micropropagation of cacti (Cactaceae). En *Biotechnology in agriculture and forestry* (20a ed., pp. 49–68). Berlin: High-Tech and Micropropagation IV.

- Hurtado, D. V., & Merino, M. E.** (2014). Consideraciones generales que deben tomarse en la planeación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. En *Cultivo de Tejidos Vegetales* (2014a ed., p. 35_43). Distrito Federal: 1987.
- Lema-Ruminska, J., & Kulus, D.** (2014). Micropropagation of Cacti — a Review. *Haseltonia*, 19, 46–63. <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>
- Luna Rosales, B., & Barba-Álvarez, A.** (2017). *Manual de procedimientos: Técnicas de estudio de las orquideas en campo y laboratorio*. (FEsZ, Ed.). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mata Rosas, M., Monroy de la Rosa, M. A., Moebis Goldammer, K., & Chávez Avila, V. M.** (2001). Micropropagation of *turbiniacarpus laui* Glass Et Foster, an Endemic and Endangered Species. *Society for in vitro biology*, 37(1054–5476), 400–404. <https://doi.org/10.1079/IVP2000156>
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M.** (1993). Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales in vitro. En W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (1a ed., pp. 19–40). Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Nadal Urías, L., Carmona Omana, A., & Trouyet Starr, M.** (2013). *Cuadernos de divulgación ambiental: Tráfico ilegal de vida silvestre* (1a ed.). México: SEMARNAT. Recuperado de <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/CD001601.pdf>
- Naturalista.** (2018). *Turbiniacarpus heliae*. Recuperado el 20 de marzo de 2019, de <https://www.naturalista.mx/taxa/525908-Turbiniacarpus-heliae>
- Olmos, S. E., Luciani, G., & Galdeano, E.** (2010). IV . Capítulo 1 Micropropagación. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, H. Esteban, & L. Mroginski (Eds.), *Biología y mejoramiento vegetal II* (1a ed., pp. 353–361). Argentina: ArgenBio.
- Papafotiou, M., Balotis, G. N., Louka, P. T., & Chronopoulos, J.** (2001). In vitro plant

regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(2), 163–167. <https://doi.org/10.1023/A:1010601328667>

Pérez Molphe Balch, E., & Davila Figueroa, C. A. (2002). In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(1054-5476/02), 73–78. <https://doi.org/10.1079/IVP2001248>

Quiala, E., Montalvo, G., & Matos, J. (2004). Empleo de la Biotecnología Vegetal para la Propagación de Cactáceas Amenazadas. *Biotecnología vegetal*, 4(4), 195–199. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/426/394>

Reuter, A., & Mosig, P. (2010). *Comercio y aprovechamiento de especies silvestres en México: observaciones sobre la gestión, tendencias y retos relacionados*. *Traffic Norteamérica*. Mexico. Recuperado de <https://www.traffic.org/site/assets/files/10139/comercio-y-aprovechamiento-de-especies-silvestres-en-mexico.pdf>

Robbins, C. S. (2003). *Prickly Trade: Trade and Conservation of Chihuahuan Desert Cacti*. (C. S. Robbins, Ed.). Washington DC: TRAFFIC North America. Recuperado de <https://earthmind.org/sites/default/files/2003-PricklyTrade.pdf>

Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1993). Establecimiento de un Laboratorio para el Cultivo de Tejidos Vegetales. En W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones* (1a ed., pp. 1–18). Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=EXijYNw55DUC&pg=PP1&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Rosa Carrillo, ma. de L., Dominguez Rosales, M. S., Pérez Reyes, M. E., & Pérez Molphe Balch, E. (2012). Cultivo y propagación in vitro de cactáceas amenazadas del genero *Turbincarpus*. *Interciencia*, 37(0378–1844), 114–120. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33922717006>

Rzedowski, J., & Huerta, L. (1994). *vegetación de México*. Recuperado de

http://www.academia.edu/download/35429785/VEGETACION_DE_MEXICO_-_Jerzy_Rzedowski.pdf

Santos Díaz, M. S., Vélasquez García, Y., & Gonzáles Chávez, M. (2005). Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria Candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia*, 39(1405–3195), 619–626. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/28097022>

Sarabia, G., Zamudio, A., Estrada, A., & Arellano, A. (2016). Efecto de las fitohormonas en la regeneración in vitro de *Turbincarpus gielsdorfianus* (Werderm.) V. John & Ríha, una cactácea endémica de San Luis Potosí en vía de extinción. GEORGINA. En *Memorias del concurso Lasallista de investigación, desarrollo e innovación* (Vol. 3, pp. 9–14).

Schroeder, R. L., Medellín, R. A., Ramírez Flores, O., & Rojo Curiel, A. (2009). La importancia de los objetivos de habitat en los planes de manejo de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA). *Investigación Ambiental. Ciencia y Política Pública*, 1(2), 136–142.

Štarha, R., Chybidziurová, A., & Lacný, Z. (1999). Alkaloids of the genus *Turbincarpus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(8), 839–841. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00019-8)

Villavicencio, E., González Cortes, A., Arredondo Gómez, A., Iracheta Donjuan, L., Comparan Sánchez, S., & Casique Valdés, R. (2011). Micropropagación de *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactacea ornamental del desierto chihuahuense, en estatus de riesgo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(6), 37–54. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63438961004>

11. Anexos

11.1. Protocolo de propagación a partir de cultivo de semillas *in vitro* de *Turbinicarpus heliae*

SELECCIÓN DE SEMILLAS

Las semillas seleccionadas deben de ser frescas, es decir no tiene que pasar mucho tiempo desde la maduración del fruto y la siembra.

DESINFESTACIÓN DE SEMILLAS

Contener las semillas en sobres de papel filtro.

Agregar los sobres a una solución de agua estéril y cloro 5:1 v/v, más 1 gota de jabón, mantener en agitación por 15 minutos.

Una vez terminado el tiempo de agitación, se debe de enjuagar con agua estéril 3 veces.

MEDIO DE GERMINACIÓN

EL medio para la germinación recomendado es, medio MS 50% + 30 g/L Sacarosa + 6 g/L agar gel.

MEDIO DE ACTIVACIÓN DE AREOLAS

Medio MS 100% + 30 g/L Sacarosa + 6 g/L agar gel + 2 g/L de Carbón Activado + 0.1 mg Piridoxina + 0.4 mg Tiamina.

CULTIVO DE BROTES

Para evitar la oxidación en los explantes, es necesario cortar los brotes dentro de una solución con ácido ascórbico y ácido cítrico 2g/L de cada uno.

MEDIO DE PARA ENRAIZAMIENTO

Medio MS 100% + 30 g/L Sacarosa + 6 g/L agar gel + 2 g/L de Carbón Activado + 0.1 mg Piridoxina + 0.4 mg Tiamina.

INCUBACIÓN

Para la incubación en todas las etapas: germinación, producción de brotes, enraizamiento y la primera etapa de aclimatización. Se lleva a cabo bajo la condiciones de: horas luz 16/8 horas luz, oscuridad, intensidad lumínica 1076.39 Lux y temperatura 25 °C \pm 5

ACLIMATIZACIÓN

El sustrato de la aclimatización: tepojal con 5 mm de diámetro, estéril, el transplante de plántulas se debe de llevar a cabo con ayuda de pinzas estériles usando ambos polos de estas, una vez plantada las plántulas, las chaloras se debn de sellar e incubar.

11.2. Composición del medio de cultivo Murashige y skoog

Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)		
NOMBRE	FORMULA	mg/l
CONSTITUYENTES INORGANICOS		
Macronutrientes para MS sin Ca		
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	825
Fosfato ácido de potasio	KH_2PO_4	85
Nitrato de potasio	KNO_3	950
Solución de Ca		
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220
Micronutrientes sin Fe		
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4.3
Ácido bórico	H_3BO_3	3.1
Sulfato de manganeso	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.15
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.125
Yoduro de potasio	KI	0.41.5
Cloruro de cobalto	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0125
Sulfato de cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0125
Solución de Fe		

EDTA sódico	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	18.65
Sulfato ferroso	FeSO ₄ · 7H ₂ O	13.9
CONSTITUYENTES ORGANICOS		
Vitaminas		
Tiamina	HCl (B1)	0.5
Niacina		0.5
Piridoxina	HCl (B6)	0.5
Carbohidratos		
Sacarosa		30,000.00

11.3. ANDEVA de tratamientos en medio MS al 50% para activación de areolas

Variable dependiente: **NB** (Número de brotes)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 50%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	1213.01	12	101.085	3.48	0.0005
B:Tt MS 50%	710.31	6	118.385	4.07	0.0015
RESIDUAL	2005.55	69	29.0659		
TOTAL (CORREGIDO)	3893.44	87			

<i>Tt MS 50%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Blanco	13	1.76923	1.49527	X
KIN 1	13	1.76923	1.49527	X
KIN 2	13	2.15385	1.49527	XX
BAP 2	13	6.23077	1.49527	XX
BAP 3	13	6.69231	1.49527	X
KIN 3	10	6.7	1.73735	XX
BAP 1	13	9.38462	1.49527	X

Variable dependiente: **PDC** (Porcentaje de callo)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 50%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	4809.77	6	801.628	14.98	0.0000
B:Tt MS 50%	12399.7	12	1033.31	19.31	0.0000
RESIDUAL	3692.02	69	53.5075		
TOTAL (CORREGIDO)	22699.7	87			

<i>Tt MS 50%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
KIN 3	10	19.6346	2.35723	X
KIN 1	13	33.4615	2.02878	X
Blanco	13	37.3077	2.02878	XX
BAP 2	13	41.5385	2.02878	XX
BAP 1	13	42.6923	2.02878	XX
KIN 2	13	43.0769	2.02878	X
BAP 3	13	44.2308	2.02878	X

Variable dependiente: **NR** (Numero de raíces)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 50%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	266.508	12	22.209	4.91	0.0000
B:Tt MS 50%	81.728	6	13.6213	3.01	0.0114

RESIDUAL	312.415	69	4.52775		
TOTAL (CORREGIDO)	672.716	87			

<i>Tt MS 50%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BAP 2	13	0.0769231	0.59016	X
BAP 3	13	0.0769231	0.59016	X
KIN 2	13	0.846154	0.59016	XX
KIN 3	10	0.942308	0.685704	XX
KIN 1	13	1.38462	0.59016	XXX
BAP 1	13	1.76923	0.59016	XX
Blanco	13	3.0	0.59016	X

Variable dependiente: **O** (Oxidación)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 50%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	1183.82	12	98.6516	0.94	0.5176
B:Tt MS 50%	10002.6	6	1667.1	15.81	0.0000
RESIDUAL	7277.14	69	105.466		
TOTAL (CORREGIDO)	18761.1	87			

<i>Tt MS 50%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BAP 1	13	8.84615	2.84829	X
BAP 2	13	10.0	2.84829	X
Blanco	13	11.1538	2.84829	X
KIN 1	13	13.0769	2.84829	X
KIN 2	13	14.6154	2.84829	X
BAP 3	13	14.6154	2.84829	X
KIN 3	10	45.5513	3.30941	X

11.4. ANDEVA de tratamientos en medio al 100% para activación de areolas

Variable dependiente: **NB** (Número de brotes)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	11037.0	5	2207.39	32.29	0.0000
B:Tt MS 100%	8274.04	11	752.186	11.00	0.0000
RESIDUAL	3759.88	55	68.3614		
TOTAL (CORREGIDO)	23070.9	71			

Tt MS 100%	Conteo	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
Control	12	8.25	2.38679	X
BAP 6	12	11.4167	2.38679	XX
BAP 8	12	15.3333	2.38679	X
BAP 3	12	22.75	2.38679	X
BAP 5	12	27.0833	2.38679	X
BAP 4	12	45.4167	2.38679	X

Variable dependiente: **PDC** (Porcentaje de callo)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	15416.4	5	3083.29	25.73	0.0000
B:Tt MS 100%	5761.61	11	523.783	4.37	0.0001
RESIDUAL	6591.22	55	119.84		
TOTAL (CORREGIDO)	27769.3	71			

Tt MS 100%	Conteo	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
BAP 5	12	3.58333	3.16017	X
BAP 8	12	8.66667	3.16017	XX
BAP 6	12	9.83333	3.16017	XX
BAP 3	12	15.4167	3.16017	X
BAP 4	12	33.5	3.16017	X
Control	12	44.1667	3.16017	X

Variable dependiente: **NR** (Número de raíces)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	643.0	5	128.6	17.73	0.0000
B:Tt MS 100%	100.0	11	9.09091	1.25	0.2761
RESIDUAL	399.0	55	7.25455		

TOTAL (CORREGIDO)	1142.0	71			
-------------------	--------	----	--	--	--

<i>Tt MS 100%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BAP 6	12	1.25	0.777525	X
BAP 8	12	1.91667	0.777525	XX
Control	12	3.75	0.777525	XX
BAP 4	12	4.66667	0.777525	X
BAP 3	12	8.0	0.777525	X
BAP 5	12	9.41667	0.777525	X

Variable dependiente: **O** (Oxidación)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	947.278	5	189.456	2.27	0.0603
B:Tt MS 100%	939.944	11	85.4495	1.02	0.4393
RESIDUAL	4594.06	55	83.5283		
TOTAL (CORREGIDO)	6481.28	71			

<i>Tt MS 100%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BAP 5	12	6.25	2.63831	X
BAP 3	12	6.41667	2.63831	X
Control	12	7.75	2.63831	X
BAP 8	12	8.91667	2.63831	XX
BAP 4	12	12.5	2.63831	XX
BAP 6	12	16.3333	2.63831	X

11.5. ANDEVA de tratamientos en medio al 100% para inducción de raíces

Variable dependiente: **NR** (Número de raíces)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	2593.12	6	432.187	25.62	0.0000
B:Tt MS 100%	1586.38	11	144.216	8.55	0.0000
RESIDUAL	1113.45	66	16.8705		
TOTAL (CORREGIDO)	5292.95	83			

Tt MS 100%	Conteo	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
AIA 5	12	3.08333	1.1857	X
AIA 3	12	4.33333	1.1857	X
Control	12	8.66667	1.1857	X
ANA 5	12	10.1667	1.1857	XX
AIB 3	12	11.3333	1.1857	XX
AIB 5	12	12.5	1.1857	X
ANA 3	12	21.25	1.1857	X

Variable dependiente: **PDC** (Porcentaje de callo)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	6545.7	6	1090.95	14.19	0.0000
B:Tt MS 100%	5880.18	11	534.561	6.95	0.0000
RESIDUAL	5075.3	66	76.8985		
TOTAL (CORREGIDO)	17501.2	83			

Tt MS 100%	Conteo	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
AIA 5	12	4.16667	2.53144	X
AIB 5	12	4.25	2.53144	X
AIB 3	12	6.29167	2.53144	X
Control	12	15.9167	2.53144	X
ANA 3	12	16.5	2.53144	X
AIA 3	12	20.25	2.53144	X
ANA 5	12	29.6667	2.53144	X

Variable dependiente: **NB** (Número de brotes)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrado	F-Radio	Valor de P
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	616.976	6	102.829	31.40	0.0000

B:Tt MS 100%	545.667	11	49.6061	15.15	0.0000
RESIDUAL	216.167	66	3.27525		
TOTAL (CORREGIDO)	1378.81	83			

<i>Tt MS 100%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
AIA 3	12	9.83333	0.522434	X
ANA 5	12	10.25	0.522434	X
AIA 5	12	13.25	0.522434	X
Control	12	14.5	0.522434	XX
ANA 3	12	15.5	0.522434	XX
AIB 3	12	16.8333	0.522434	XX
AIB 5	12	17.0	0.522434	X

Variable dependiente: **BN** (Brotos nuevos)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	518.786	6	86.4643	37.74	0.0000
B:Tt MS 100%	66.7024	11	6.06385	2.65	0.0072
RESIDUAL	151.214	66	2.29113		
TOTAL (CORREGIDO)	736.702	83			

<i>Tt MS 100%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ANA 5	12	0	0.436952	X
ANA 3	12	0.166667	0.436952	X
Control	12	0.833333	0.436952	XX
AIB 3	12	1.5	0.436952	XX
AIB 5	12	2.16667	0.436952	X
AIA 5	12	5.91667	0.436952	X
AIA 3	12	6.5	0.436952	X

Variable dependiente: **O** (Oxidación)

Factores: Tiempo (semanas)

Tratamiento MS 100%

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media de cuadrado</i>	<i>F-Radio</i>	<i>Valor de P</i>
Efectos principales					
A:Tiempo (semanas)	1998.98	6	333.163	8.08	0.0000
B:Tt MS 100%	619.75	11	56.3409	1.37	0.2096
RESIDUAL	2720.17	66	41.2146		
TOTAL (CORREGIDO)	5338.89	83			

<i>Tt MS 100%</i>	<i>Conteo</i>	<i>LS Media</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ANA 5	12	5.41667	1.85325	X
ANA 3	12	10.8333	1.85325	X
Control	12	11.0833	1.85325	X
AIB 3	12	11.25	1.85325	X

AIB 5	12	11.25	1.85325	X
AIA 3	12	15.4167	1.85325	X
AIA 5	12	22.5	1.85325	X

11.6. Abreviaturas

Convención de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (**CITES**)

6-(y.y-dimetilalilamino) purina (**2ip**)

Ácido indol-3-acético (**AIA**)

Ácido indolbutírico (**AIB**)

Ácido naftalenacético (**ANA**)

Benciladenina (**BA**)

Bencilaminopurina (**BAP**)

Cinetina (**KIN**)

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (**FESC**)

Ley General de Vida Silvestre (**LGVS**)

Murashige & Skoog (**MS**)

Reguladores del crecimiento de las plantas (**RCP**)

Unidad de investigación en biología vegetal (**UIBV**)

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (**IUCN**)

Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**)