



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN, MICROPROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *in vitro* DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO *Mammillaria*

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

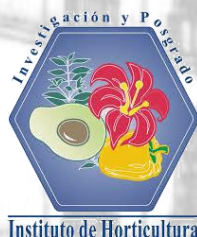
GABRIEL RAMÍREZ GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de:

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O, DOCTOR



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, Junio de 2019

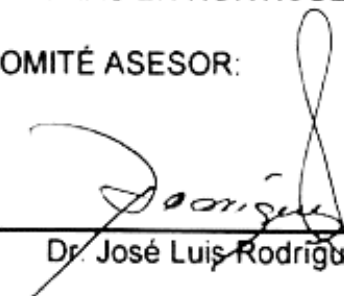
**PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN, MICROPROPAGACIÓN Y
CONSERVACIÓN *in vitro* DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO *Mammillaria***

Tesis realizada por el C. Gabriel Ramírez González, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

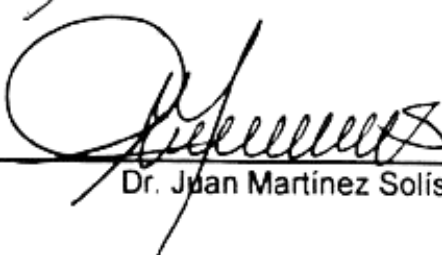
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:


Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR:


Ph.D. María Teresa Beryl Colinas León

LECTOR EXTERNO:


Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.3. HIPÓTESIS	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. METAS DE AICHI PARA MÉXICO	6
2.2. LA PROTECCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD EN MÉXICO.....	7
2.3. CACTÁCEAS: PLANTAS EN PELIGRO	7
2.4. EL GÉNERO <i>Mammillaria</i>	8
2.5. ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACIÓN	9
2.6. GERMINACIÓN POR SEMILLA	9
2.7. EL CULTIVO DE TEJIDOS COMO ESTRATEGIA DE PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN	10
2.8. FASES DEL CULTIVO <i>in vitro</i>	11
2.9 CONSERVACIÓN <i>in vitro</i>	12
LITERATURA CITADA	13
3. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO <i>ex vitro</i> E <i>in vitro</i> DE CINCO ESPECIES DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO <i>Mammillaria</i>	16
RESUMEN	17

ABSTRACT	18
3.1. INTRODUCCIÓN.....	19
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.4. CONCLUSIONES	31
3.5. AGRADECIMIENTOS.....	31
3.6. LITERATURA CITADA	32
 4. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE DOS ESPECIES AMENAZADAS DEL GÉNERO <i>Mammillaria</i> (CACTACEAE)	36
RESUMEN	37
ABSTRACT	38
4.1. INTRODUCCIÓN.....	39
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.3. RESULTADOS	42
4.4. DISCUSIÓN	46
4.5. CONCLUSIONES.....	49
4.6. AGRADECIMIENTOS.....	49
4.7. LITERATURA CITADA	50
 5. CONSERVACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Mammillaria haageana</i> EN MEDIOS DE MÍNIMO CRECIMIENTO	52
RESUMEN	53
ABSTRACT	54
5.1. INTRODUCCIÓN.....	55
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
5.4. CONCLUSIONES.....	62

5.5. AGRADECIMIENTOS.....	62
5.6. LITERATURA CITADA	63
6. DISCUSIÓN GENERAL	65
7. CONCLUSIÓN GENERAL	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de germinación, velocidad de germinación e índice de germinación (30 dds).24

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de BA y AIA en la formación de brotes y altura a partir de tres diferentes tipos de explantes de *M. albilanata* y *M. haageana* después de 112 días de incubación.43

Cuadro 3.Efecto de diferentes concentraciones de AIA en el enraizamiento de brotes de *M. albilanata* y *M. haageana*.45

Cuadro 4.Tasa de crecimiento relativo (RGR) en mg. d-1 después de 245 días de incubación.59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de efectos principales para PGt. Especie: <i>M. albilanata</i> , <i>M. bocasana</i> , <i>M. columbiana</i> , <i>M. rhodantha</i> , <i>M. spinosissima</i> , (30 dds).....	23
Figura 2. Efecto en el valor de RGR de altura bajo tratamientos <i>in vitro</i> con tres dosis de sacarosa vs tratamiento <i>ex vitro</i> , después de 280 días de incubación.	28
Figura 3. Efecto en el valor de RGR de diámetro bajo tratamientos <i>in vitro</i> con tres dosis de sacarosa vs tratamiento <i>ex vitro</i> , después de 280 días de incubación.	29
Figura 4. Efecto en el valor de RGR de longitud de raíz bajo tratamientos <i>in vitro</i> con tres dosis de sacarosa vs tratamiento <i>ex vitro</i> , después de 280 días de incubación.....	30
Figura 5. Días necesarios para la formación de brotes y porcentaje de respuesta organogénica según tipo de explante.....	42
Figura 6. Brotes de <i>M. albilanata</i> a partir de explante intermedio en tratamiento testigo a) y b) suplementado con 1.0 mg.L ⁻¹ de BA y 1.0 mg.L ⁻¹ de AIA; Brotes de <i>M. haageana</i> a partir de explante basal en tratamiento testigo c) y d) suplementado con 1.0 mg.L ⁻¹ de BA y 1.0 mg.L ⁻¹ de AIA. Desarrollo de raíces de <i>M. albilanata</i> en tratamiento testigo e) , 0.5 mg.L ⁻¹ de AIA f) y 1.0 mg.L ⁻¹ de AIA g) ; Desarrollo de raíces de <i>M. haageana</i> en tratamiento testigo h) , 0.5 mg.L ⁻¹ de AIA i) y 1.0 mg.L ⁻¹ de AIA j) . Formación de brotes a las 16 semanas. Enraizamiento a las 6 semanas. Barra= 5 mm.....	46
Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia luego de 245 días de incubación.	58
Figura 8. Incubación a 4 °C con A) Sacarosa, B) Manitol y C) Sorbitol con 30 g.L ⁻¹ . Incubación a 25 °C con D) Sacarosa, E) Manitol y F) Sorbitol con 30 g.L ⁻¹ ; G) Incubación a 25 °C y H) 4° C con Manitol a 45 g.L ⁻¹ ; I). Recuperación y multiplicación de los brotes. Tamaño de barra = 5 mm	61

DEDICATORIA

A mi madre, la señora Adelina González Medina

A mi tía, la señora Olga González Medina

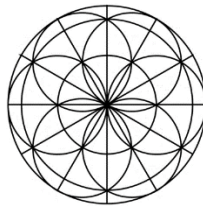
Ejemplos de fe, trabajo y sacrificio
que nunca se doblegan, que nunca se rinden.

A mi familia

A mis amigos

A los que siguen

A los que se fueron



Como es arriba, es abajo

AGRADECIMIENTOS

A la vida y las circunstancias que han guiado mi camino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia por brindarme la oportunidad de superarme académicamente.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su confianza, amistad, enseñanzas y dirección en este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Martínez Solís por su contribución en la realización de este trabajo y por el apoyo que como Coordinador de posgrado siempre resultó positivo.

A la Dra. María Teresa Colinas de León por sus aportes, contribuciones y sugerencias para la realización de este trabajo. Siempre mis agradecimientos y respetos a usted.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por sus contribuciones, apoyo incondicional, disponibilidad, y amabilidad al sumarse como Lector Externo en la conformación del comité asesor.

A la M.C.H. Julieta Rodríguez Licona y al L.H. David De la Rosa por su aporte de material vegetal para la realización de esta investigación.

A la señora Gisela De la Rosa y todos mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales que de alguna u otra manera contribuyeron con sus observaciones y sugerencias a la culminación de este trabajo.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre: Gabriel Ramírez González
Fecha de nacimiento: 02 de Octubre de 1979
Lugar de nacimiento: Concepción Pápalo, Oaxaca
CURP: RAGG791002HOCMNB07
Profesión: Maestro en Ciencias Forestales
Cédula Profesional: 10952398

Desarrollo académico

1996-1999	Bachillerato Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Oriente Universidad Nacional Autónoma de México
2000-2005	Biólogo Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Universidad Nacional Autónoma de México Iztapalapa, Ciudad de México
2010-2013	Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales División de Ciencias Forestales Universidad Autónoma Chapingo Texcoco, Estado de México

RESUMEN GENERAL

PROTOCOLOS DE GERMINACIÓN, MICROPROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *in vitro* DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO *Mammillaria*

Dentro de la familia Cactaceae, el género *Mammillaria* es el que presenta el mayor número de especies a nivel mundial, se estima que cerca del 85 % de las especies de este género son endémicas de México. Por su naturaleza, distribución geográfica y aprovechamiento clandestino como recurso ornamental, 79 especies se encuentran categorizadas dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010. A nivel internacional cerca del 50% de las mamilarias registradas en la Red List de la International Union for Conservation of Nature corresponden a especies mexicanas. Ante tal situación, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general la generación de protocolos de micropropagación y conservación *in vitro* para seis especies del género *Mammillaria* como estrategia para la propagación de plantas que puedan conservarse tanto a nivel *ex situ* como *in vitro*. En el primer experimento se evaluaron de manera comparativa diversas variables relacionadas con la germinación de semilla cigótica, así como la tasa de crecimiento relativa en condiciones *ex vitro* e *in vitro* para *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima*. En el segundo experimento se evaluó la respuesta *in vitro* a partir de tres explantes de *M. albilanata* y *M. haageana* en medios suplementados con diferentes dosis de reguladores de crecimiento vegetal. En el tercer experimento, se evaluó el efecto de tres osmolitos y dos niveles de temperatura en la conservación de *M. haageana* como estrategia de conservación *in vitro* a corto plazo. Las mejores respuestas en germinación y tasa de crecimiento se obtuvieron en condiciones *in vitro*. Existió una respuesta diferencial en el número y tamaño de brotes generados a partir de distintos explantes bajo diferentes tratamientos. Finalmente la adición de manitol en dosis de 30 y 45 g.L⁻¹ y la incubación a 24± 1°C fue efectivo como medio de mínimo crecimiento.

Palabras clave: especies amenazadas, explante, *Mammillaria*, mínimo crecimiento, reguladores de crecimiento vegetal.

Tesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Ramírez González

Director: José Luis Rodríguez de la O.

GENERAL ABSTRACT

PROTOCOLS OF GERMINATION, MICROPROPAGATION AND *in vitro* CONSERVATION OF CACTI OF *Mammillaria* GENUS

The genus *Mammillaria*, from the Cactaceae family, is the one that presents the highest number of species worldwide, it is estimated that about 85% of the species of this genus are endemic to Mexico. Due to its nature, geographical distribution and clandestine use as an ornamental resource, 79 species are categorized within the NOM-059-SEMARNAT-2010. Internationally, about 50% of the mammillaries registered in the Red List of the International Union for Conservation of Nature correspond to Mexican species. In view of this situation, the general objective of this research was the generation of micropropagation and *in vitro* conservation protocols for six species of the genus *Mammillaria* as a strategy for the propagation of plants that may be conserved both *ex situ* and *in vitro*. In the first experiment, several variables related to zygotic seed germination were evaluated in a comparative manner, as well as the relative growth rate in *ex vitro* and *in vitro* conditions for *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha* and *M. spinosissima*. In the second experiment, the *in vitro* response was evaluated from three explants of *M. albilanata* and *M. haageana* in media supplemented with different doses of plant growth regulators. In the third experiment, the effect of three osmolytes and two temperature levels on the conservation of *M. haageana* were evaluated as a short-term *in vitro* conservation strategy. The best responses in germination and growth rate were obtained under *in vitro* conditions. There was a differential response in the number and size of shoots generated from different explants under different treatments. Finally, the addition of mannitol at doses of 30 and 45 g.L⁻¹ and incubation at 24 ± 1 ° C was effective as a minimal growth medium.

Key words: threatened species, explant, *Mammillaria*, minimal growth, plant growth regulators.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Ramírez González

Advisor: José Luis Rodríguez de la O.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El constante deterioro de los ecosistemas por sobreexplotación de los recursos naturales, cambios en el uso de suelo, crecimiento demográfico, calentamiento global y demás actividades en donde el ser humano es el principal responsable, ha acarreado entre otros problemas la disminución y en algunos casos, la pérdida de especies de flora y fauna a nivel mundial.

México ha suscrito acuerdos nacionales e internacionales para la protección de la biodiversidad, entre ellos podemos destacar la Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal 2012-2030 (CONABIO, 2012), la Estrategia Nacional sobre Biodiversidad en México 2016-2030 (CONABIO, 2016), el Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 (CONANP, 2016) y el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CONANP, 2016), este último vigente desde su firma en Río de Janeiro en 1992. Al mismo tiempo y tras la firma de este convenio se han implementado medidas regulatorias cuya finalidad primordial es reducir el impacto negativo que el ser humano causa al medio ambiente, así como la ejecución de planes de manejo y conservación *in situ* de especies sujetas a protección a través de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010). Pese a la suma de estos esfuerzos, el número de especies vegetales bajo categorías de riesgos lejos de disminuir se ha elevado significativamente.

En el caso de las cactáceas, en 2001 se registraba un total de 255 especies protegidas por la NOM-059-ECOL-2001 (Jiménez, 2011), ya para 2010 esta cifra alcanzaba un valor de 324 especies (Royo, Melgoza y Quintana, 2014) de las cuales 110 corresponden al género *Mammillaria*. Ante tal escenario, diversas instituciones tanto gubernamentales como no gubernamentales implementan diferentes estrategias de conservación de estos recursos. Desde el almacenamiento de germoplasma en Bancos de Semillas de CONAFOR y el Centro de Recursos Genéticos del INIFAP, hasta el establecimiento de viveros de producción de cactáceas para reforestación de áreas que han sido perturbadas. A nivel de investigación, decenas de protocolos de micropropagación *in vitro* han sido desarrollados por investigadores de

instituciones tales como la UNAM, UDG, COLPOS y CHAPINGO, entre otras. No obstante la existencia de tales protocolos, su aplicación a veces es solo eficaz para una especie, razón por la cual es necesario desarrollar protocolos para cada una de ellas, además de que como en todas las cosas, éstos pueden ser perfectibles.

En este sentido, el objetivo general de este trabajo de investigación fue generar protocolos de germinación, micropropagación y/o conservación *in vitro* tomando como modelo biológico seis especies del género *Mammillaria* (*M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. haageana*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima*) que actualmente se encuentran categorizadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Red List (IUCN,2018) y con ello aportar dentro de los esquemas para su propagación y conservación.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Generar protocolos de germinación, micropropagación y/o conservación *in vitro* para *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. haageana*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los porcentajes, velocidad de germinación, germinación media y tasa de crecimiento en condiciones *in vitro* y *ex vitro* de cinco especies del género *Mammillaria*.
2. Establecer un protocolo para la producción *in vitro* de plantas de *M. albilanata* y *M. haageana* a partir de distintos tipos de explante.
3. Establecer un protocolo de conservación a corto plazo que contribuya a los esfuerzos por salvaguardar a la especie *Mammillaria haageana*

1.3. HIPÓTESIS

1. Las condiciones *in vitro* favorecerán la germinación, y las distintas dosis de sacarosa incorporadas al medio de cultivo generan diferentes valores en la tasa de crecimiento, las cuales se asume serán mayores a las generadas bajo condiciones *ex vitro*.
2. Existirá una respuesta diferencial dependiendo de la combinación de factores tratamiento-explante.
3. La interacción osmolito-temperatura de incubación presentará efectos más significativos en la tasa de crecimiento relativo de las plantas en comparación al efecto de los factores aislados.

En las siguientes páginas se presentan cada uno de los experimentos realizados para la verificación de hipótesis y cumplimiento de objetivos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. METAS DE AICHI PARA MÉXICO

Durante décadas hemos escuchado una y otra vez que nuestro país (México) es una de las naciones con mayor riqueza biológica del planeta. La fauna y la flora de nuestro país no solo es ampliamente diversa, también resulta única para muchas de las especies que solo se encuentran de manera natural presentes en este territorio.

Desde 1993, luego de la firma del Convenio sobre la Diversidad Biológica en Río de Janeiro, México se ha comprometido constantemente con el desarrollo e implementación de políticas públicas, reglamentos, leyes y planes estratégicos que salvaguarden la biodiversidad presente en las áreas naturales protegidas (ANP's).

A finales de 2010, en la COP (Conference Of Parts) en la ciudad de Nagoya, Japón se establecieron las metas de Aichi en donde nuestro país se comprometió a que en el año 2020 el 17 % del territorio terrestre y aguas dulces se encontraría dentro de superficies de conservación en diferentes categorías (CONANP, 2016).

De acuerdo al informe dado a conocer por REDPARQUES, Pronatura México (2018), hasta ese año México tenía un avance del 76.47 % hacia el cumplimiento de tales metas. La perspectiva de los expertos si bien era positiva en lo referente al cumplimiento de los compromisos establecidos, también señalaba como una de las problemáticas de los países de la región latinoamericana, los problemas que siguen afectando a las ANP's como lo son, el cambio climático, la deforestación y la sobreexplotación de los recursos naturales.

Por otro lado también señalaba la importancia en la integración de los pueblos indígenas y comunidades locales para no solo alcanzar las metas fijadas, sino también para mejorar sustancialmente el proceso mediante el cual se logran.

2.2. LA PROTECCIÓN DE LA BIODIVERSIDAD EN MÉXICO

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) es la principal herramienta jurídica para la elaboración de regulaciones que permiten la protección del ambiente y la biodiversidad, y al mismo tiempo establecen los lineamientos, normas y leyes que regulan el aprovechamiento racional de los recursos.

Desde 1998 hasta la fecha actual existen 12 leyes federales y 13 reglamentos relacionadas directa o indirectamente con la regulación del uso, aprovechamiento, bioseguridad, sanidad y demás aspectos relacionados con la biodiversidad vegetal (CONABIO,2012).

En temas de protección, uso y conservación de especies vegetales, son 32 las normas que actualmente se encuentran vigentes, 3 de ellas como Normas Mexicanas (recomendaciones) y 29 como Normas Oficiales Mexicanas de carácter obligatorio (NOM).

Dentro de estas normas, una de las más conocidas en temas de protección y conservación es la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF.2010) que enlista bajo diferentes categorías de riesgo/protección a las especies de flora y fauna que se encuentran en peligro debido a la disminución de ejemplares a consecuencia de sobreexplotación, cambios de uso de suelo, perturbación de ambientes naturales, entre otras causas.

2.3. CACTÁCEAS: PLANTAS EN PELIGRO

Distribuidos en la mayor parte de América, desde el sur de Canadá hasta la Patagonia Argentina, los cactus constituyen un grupo de plantas vasculares cuyas adaptaciones biológicas les han permitido adaptarse a diversos ecosistemas, desde los bosques templados y tropicales, hasta las dunas costeras y zonas áridas y semiáridas del continente (Edwards, Nyffeler y Donoghue, 2005; Torres, Méndez, Dorantes y Durán, 2010; Lema y Kulus, 2014).

Dentro de la familia Cactaceae se reconoce la existencia de 1453 especies (Barthlott et al., 2015; cf. 1500 especies, Ramírez, et al., 2007). Un alto porcentaje de ellas se distribuyen a lo largo y ancho del territorio mexicano. Hunt (2016) reporta un total de 50 géneros con presencia en México, mientras que Villaseñor (2016) refiere un total de 69.

De acuerdo a lo señalado por Royo et al. (2014), cerca de 324 especies de cactáceas se encontraban en 2010 dentro de alguna de las categorías de protección de la NOM-059, 110 de ellas corresponden al género *Mammillaria*, el grupo más grande dentro de la familia Cactaceae y el de mayor endemismo en nuestro país.

El lento crecimiento, la baja tasa de reclutamiento de nuevos individuos, las zonas de distribución restringidas, y las perturbaciones ambientales a las que están sujetas debido a actividades antropogénicas han provocado un aumento cada vez mayor en el número de especies que se han ido añadiendo al listado desde sus orígenes como la NOM-059- ECOL-1994 (DOF,1994).

2.4. EL GÉNERO *Mammillaria*

Caracterizado por sus formas cilíndricas y globosas, además de la belleza de sus coloridas flores, el género *Mammillaria* ha sido y sigue siendo actualmente el grupo de cactáceas más vulnerable.

De las 110 especies listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010, 24 de ellas se encuentran listadas bajo la categoría de “Amenazada”, 10 en la categoría “Peligro de Extinción” y el resto en “Protección Especial”.

Por su parte la Red List reporta un total de 160 especies, de las cuales 84 se encuentran en la categoría “Lest Concern”, 20 en “Endangered” , 18 en la categoría “Vulnerable”, 15 en “Critically Endangered” , 5 en “Near Threatened” y 22 en “Data Deficient”.

2.5. ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACIÓN

Las diferentes estrategias de conservación para la biodiversidad establecidas dentro del Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 (CONANP, 2016) y la Estrategia Nacional sobre Biodiversidad en México 2016-2030 (CONABIO, 2016) contemplan esquemas de conservación tanto *in situ* como *ex situ*. Sin embargo, al igual que estrategias anteriores, se ha priorizado la actividad de conservación en los ambientes de distribución natural, debido entre otros factores a que con ello propician la conservación de los ecosistemas y la transmisión entre generaciones del conocimiento que en esta materia se puede desarrollar en las comunidades locales. No obstante también se contempla la conservación *ex situ* como estrategia complementaria a la anterior, bajo las siguientes especificaciones:

“ Mejorar la coordinación entre programas de conservación *ex situ*, *inter situ* e *in situ*.

- Fortalecer y operar programas de reproducción para intercambio de organismos de especies bajo conservación *ex situ*.
- Establecer normas y procedimientos técnicos con estándares y criterios bioéticos para la operación de centros de conservación *ex situ*, p. ej. jardines botánicos “ (CONABIO,2016).

2.6. GERMINACIÓN POR SEMILLA

Las semillas de las mamilarias se caracterizan por ser de tamaño muy pequeño (0.7 a 1.5 mm), sus formas varían desde ovaladas, periformes y reniformes (Arias, Gama y Gúzman, 1997).

La producción de plantas vía semilla es factible en la mayoría de las especies, sin embargo la presencia de mecanismos de latencia en algunas de ellas, además de los requerimientos de almacenamiento postcosecha suelen alterar las tasas de germinación cuando esta es llevada a cabo de manera artificial (Flores

y Manzanero, 2003; Martínez, Flores, López y Manzanero, 2004; Flores, Manzanero, Rojas y Mandujano, 2008).

De manera natural, la germinación de semillas puede ser muy baja, debido a que las condiciones propias del ambiente en que estas plantas prosperan pocas veces son favorables. Las altas temperaturas pueden inducir un período de latencia secundaria conocida comúnmente como termolatenencia. De igual manera, para que las semillas germinen requieren enterrarse en profundidades que además de proporcionar la humedad suficiente, permita el paso de luz para desencadenar los procesos fisiológicos en semillas del tipo fotoblástico positivo (Rojas y Mandujano, 2017), no así en aquellas que son fotoblasticas de tipo indiferente, las cuales requieren mayormente humedad.

2.7. EL CULTIVO DE TEJIDOS COMO ESTRATEGIA DE PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN

Mediante las diversas técnicas de cultivo *in vitro* ha sido posible obtener gran número de plantas a partir de pequeños fragmentos con capacidad meristemática. El cultivo aséptico de este tipo de tejidos bajo condiciones controladas y medios de cultivo con reguladores de crecimiento vegetal, ha sido una de las herramientas biotecnológicas más utilizadas a nivel comercial para la producción de plantas de interés agrícola.

Por otro lado, el cultivo de células y órganos ha sido aplicado de manera eficiente en investigaciones dirigidas a la propagación y conservación de recursos vegetales que se encuentran amenazados. Se ha logrado la propagación exitosa de especies en riesgo tales como *Mammillaria geminispina*, *Mammillaria magnimamma*, *Mammillaria marcosii*, *Mammillaria mercadensis* y *Mammillaria petterssonii* (Ramírez y Salazar, 2016), así como *Mammillaria mathildae* (García y Malda, 2010) y *Mammillaria plumosa* (Téllez et al., 2017). De igual manera, los métodos de conservación a corto plazo han sido especialmente exitosos en especies cuyo uso primordial es ornamental, como *Ranunculus asiaticus* (Benelli, Ozudrogu, Lambardi, y Dradi, 2012); *Turbinicarpus* spp. (Balch, Pérez y De La

Rosa, 2012); *Nandina domestica* (Ozudogru et al., 2013); *Castanea sativa* (Capuana y Di Lonardo, 2013).

2.8. FASES DEL CULTIVO *in vitro*

De acuerdo a lo reportado por Mroginski y Roca (1993), las fases del cultivo *in vitro* se dividen en las siguientes:

FASE 0: Selección y preparación de la planta madre. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Es por ello que resulta necesario seleccionar plantas saludables y vigorosas . La preparación depende de la procedencia de la planta, si proviene de vida silvestre es necesario mantenerla bajo condiciones de vivero y aplicarle fungicidas y bactericidas a fin de eliminar o bien disminuir la presencia de microorganismos patógenos.

Fase 1: Desinfección del material vegetal. Consiste en la aplicación de un método de desinfección (desinfestación) mediante el cual se eliminan microorganismos patógenos que continúen presentes aún después de la fase 0. Existen diversas metodologías que pueden aplicarse pero la más común consiste en una serie de lavados y enjuagues con detergente, emulsificante, alcohol e hipoclorito de sodio bajo diferentes concentraciones y tiempos de inmersión.

FASE 2: Establecimiento *in vitro* (bioensayo). Una vez desinfestados los explantes, se incuban en un medio básico MS simple, a fin de observar el comportamiento del tejido vegetal. En esta fase pueden evaluarse (de ser necesario) la adición de antioxidantes al medio de cultivo.

FASE 3: Multiplicación. En la fase de multiplicación una vez determinadas las condiciones básicas para el cultivo *in vitro* de la especie de interés se evalúan los

efectos de reguladores de crecimiento vegetal (RGV) en la generación de nuevos brotes.

FASE 4: Enraizamiento. En esta fase, los brotes generados de manera previa son individualizados y sembrados en medios de cultivo con la presencia de RGV que promuevan el desarrollo de raíces.

FASE 5: Aclimatización. Finalmente las plántulas generadas deben pasar por un proceso de aclimatización mediante el cual se vayan adaptando paulatinamente a las condiciones *ex vitro* a nivel de vivero y posteriormente a nivel de campo.

2.9 CONSERVACIÓN *in vitro*

La conservación *in vitro* se ha desarrollado como una estrategia para la conservación y el intercambio de recursos fitogenéticos. Una de sus principales ventajas es que a través de este tipo de conservación se puede almacenar una gran cantidad de muestras en espacios sumamente reducidos.

Existen diferentes tipos de conservación *in vitro*, dependiendo del tipo de metodología y períodos de almacenamiento requeridos. Para períodos de almacenamiento a corto plazo (6 a 8 meses) y mediano plazo (+12), el objetivo es reducir el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos. Esto se logra modificando las condiciones de cultivo, principalmente reduciendo la temperatura de cultivo. Para almacenamiento a largo plazo (teóricamente indefinido) el material vegetal se puede almacenar sin alteración o modificación, bajo condiciones de nitrógeno líquido (-196°C), mediante un tratamiento previo con sustancias criopreservadoras (Engelmann, 1991).

Para la conservación a corto plazo (estrategia de interés en este trabajo), se deben considerar diferentes factores, entre los cuales destacan la temperatura, la reducción de nutrientes en el medio de cultivo, la incorporación de osmolitos

(García, Feria y Acosta, 2007), el tamaño del envase de cultivo y la reducción de la intensidad de luz durante la incubación.

LITERATURA CITADA

- Arias, M. S., Gama, L. S. y Guzmán, C. L. U. (1997). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 14, *Cactaceae* A. L. Juss. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Amador, A. K. A., Díaz, G. J., Loza, C. S. y Bivián, C. E. Y. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, (35), 109-131.
- Balch, E., Pérez, R. M. E. y De La Rosa, C. Ma. (2012). *In Vitro* Conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) Under Slow Growth Conditions. *Haseltonia*. 17. 10.2985/1070-0048-17.1.6.
- Barthlott, W., Burstedde, K., Geffert, J.L., Ibisch, P.L., Korotkova, N., Miebach, A., Rafiqpoor, M.D., Stein, A. y Mutke, J. (2015). Biogeography and Biodiversity of Cacti. *Schumannia* 7. 205 pg.
- Benelli, C., Ozudrogu, E.A., Lambardi, M. y Dradi, G. (2012). *In vitro* conservation of ornamental plants by slow growth storage. *Acta Horticulturae*, v. 961, p.89-93.
- Capuana, M., Di Lonardo, S. (2013). "Front Matter." *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* Vol. 49, No., pp. 605-610.
- 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.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2016). Estrategia Nacional sobre Biodiversidad de México (ENBioMex) y Plan de Acción 2016 - 2030. CONABIO, México.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2016). México hacia el cumplimiento del Convenio para la Diversidad Biológica. CONANP, México.
- DOF, Diario Oficial de la Federación (1994). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México deflora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

- DOF, Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM059-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. Diario Oficial de la Federación. (Segunda sección). 30 de diciembre de 2010. 70 p.
- Edwards, E.J., Nyffeler, R. y Donoghue, M. J. (2005). Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form, *American Journal of Botany* , vol. 92 (pg. 1177-1188).
- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm — a review. *Euphytica*. 57. 227-243.
- Flores, M. A. y Manzanero, M.G.I. (2003). Germinación comparativa de especies del género *Mammillaria* endémicas de Oaxaca, México. *Cact Suc Mex* 48:36-51.
- Flores, M. A., Manzanero, M.G.I., Rojas, A. M. y Mandujano, M.C. (2008). Seed age germination responses and seedling survival of an endangered cactus that inhabits cliffs. *Nat Areas J* 28:51- 57
- García, R. O. y Malda, B. G.(2010). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *Hortscience* 45:934–938.
- García, L., Fera, M. y Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*. 7 (2): 67 - 79.
- Hunt, D. (2016) CITES Cactaceae Checklist. 3rd Edition. Royal Botanic Gardens & International Organization for Succulent Plant Study, Kew, 174 pp.
- IUCN, Red List of Threatened Species (2018). Version 2018. www.iucnredlist.org. (Enero, 2018).
- Jiménez, C. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*, pp. 2–23.
- Lema, R., J. y Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti-a review. *Haseltonia*.19:46–63.
- Mroginski, L. A. y Roca, W.M. (1993). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. Cultivo de Tejidos en la agricultura, Cali: CIAT, p. 19-40.
- Ozudrogu, E.A., Silva, D.P.C., Kaya, E., Dradi, G. Paiva, R. y Lambardi, M. (2013). *In vitro* conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*, an outdoor ornamental shrub. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v.41, p.638-645
- Pérez, M. B. E., Santos, D. M. S., Ramírez, M. R. y Ochoa, A. N. (2015) Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, 72(6), 540-561.

- Ramírez, M. R., Aguilar, R. I., Borodanenko, A., Pérez, M. L., Barrera, G. J., Nuñez, P. H. y Ochoa, A. N. (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Plant* 43:660–665.
- Ramírez, M. R. y Salazar, S. E. (2016). Propagación y conservación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 26 (2), 78-82.
- REDPARQUES, Pronatura México (2018). Progreso de cumplimiento de la 11 de Aichi en los países de la Redparques: resultados y perspectivas al 2020. CDB, Proyecto IAPA, Unión Europea, WWF, FAO, UICN, ONU Medio Ambiente. Bogotá, Colombia. 46p.
- Rojas, A. M. y Mandujano, S. M.C. (2017). Latencia secundaria en especies de la tribu Cacteeae (Cactaceae). *Polibotánica*, (44), 137-145.
- Royo, M. M. H., Melgoza, C. A. y Quintana, M. G. (2014). Especies vegetales en peligro, su distribución y estatus de conservación de los ecosistemas donde se presentan. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5(22).
- Téllez, R. J., López, P. M., Hernández, M. E., Estrada, L. A. A., Zavaleta, M. H. A. y Livera, M. M. (2017). Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 863-876.
- Torres, W., Méndez, M., Dorantes, A. y Durán R. (2010) Estructura, composición y diversidad del matorral de duna costera en el litoral yucateco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 86:37-51.
- Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559–902.

**3. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO *ex vitro* E *in vitro* DE CINCO
ESPECIES DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO *Mammillaria***

GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO *ex vitro* E *in vitro* DE CINCO ESPECIES DE CACTÁCEAS DEL GÉNERO *Mammillaria*

RESUMEN

Se comparó la germinación y tasa de crecimiento (RGR) de *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima* bajo condiciones *ex vitro* e *in vitro*. En el primer caso se evaluaron porcentajes de germinación (PG), velocidad de germinación (VG) y germinación media (G_{50}). En el segundo, se evaluó el RGR luego de 40 semanas de cultivo. El tratamiento *in vitro* consistió de medio Murashige-Skoog (MS) al 25% para germinación, y MS al 50% con dosis de sacarosa (3, 6 y 9%) para crecimiento, mientras que el tratamiento *ex vitro* fue a partir de una mezcla de tierra de hoja y tezontle (1:1). El análisis de varianza y las pruebas de Tukey evidenciaron diferencias significativas entre las respuestas generadas a nivel de tratamientos y especies ($p < 0.05$), obteniéndose mejores resultados en el tratamiento *in vitro*. Por otro lado, la incorporación de sacarosa al 6% y 9% generó una mayor tasa de crecimiento en la parte aérea, mientras que al utilizar 3% se presentó una tasa de crecimiento mayor en raíces, en ambos casos superiores al tratamiento *ex vitro*. La tasa de sobrevivencia de plantas obtenidas en ambas condiciones fue del 100%.

Palabras clave: *Mammillaria albilanata*, *Mammillaria bocasana*, *Mammillaria columbiana*, *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria spinosissima*.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Doctorado en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Ramírez González
Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O.

Germination and growth *ex vitro* and *in vitro* of five species of cacti of the genus *Mammillaria*

ABSTRACT

The germination and growth rate (RGR) of *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha* and *M. spinosissima* were compared under *ex vitro* and *in vitro* conditions. In the first case, the percentages of germination (PG), germination speed (VG) and medium germination (G50) were evaluated. In the second, the RGR was evaluated after 40 weeks of culture. The *in vitro* treatment consisted of 25% Murashige y Skoog (MS) medium for germination, and 50% MS with sucrose dose (3.6 and 9%) for growth, while the *ex vitro* treatment was from a mixture of leaf soil and tezontle (1: 1). The analysis of variance and the Tukey tests showed significant differences between the responses generated at the level of treatments and species ($p < 0.05$), obtaining better results in the *in vitro* treatment. On the other hand, 6% and 9% sucrose supplementation generated a higher growth rate in the aerial part, while with 3% sucrose a higher growth rate was found in roots, in both cases superior to the *ex vitro* treatment. The survival rate of plants obtained in both conditions was 100%.

Key words: *Mammillaria albilanata*, *Mammillaria bocasana*, *Mammillaria columbiana*, *Mammillaria rhodantha*, *Mammillaria spinosissima*.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Ramírez González
Advisor: José Luis Rodríguez de la O.

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Mammillaria* comprende el grupo con mayor número de representantes dentro de la familia Cactaceae con 171 especies (Novoa, Le Roux, Robertson, Wilson y Richardson, 2015; cf. 200 especies, Navarro y Demeneghi, 2007) . El 85 % de ellas son endémicas de México, razón por la cual se considera como el centro de diversificación del género (Arias, Gama y Guzmán, 1997; Martínez, Ramos, Arroyo, Mandujano, y Golubov, 2016). Su mayor presencia se registra en zonas áridas y semiáridas, pero también existen ejemplares que se distribuyen en dunas costeras, bosque tropical caducifolio y bosque templado (Godínez, Álvarez, Valverde y Ortega, 2003; Rzedowski, 2006; Torres, Méndez, Dorantes y Durán, 2010). Desafortunadamente, desde hace casi una década 110 de las mamilarias mexicanas se encuentran listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010 bajo diferentes categorías de riesgo (DOF, 2010), a nivel internacional el número de ejemplares mexicanos en riesgo alcanza niveles cercanos al 50 % de un total de 164 especies reportadas por la International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2018).

Existen diversas razones que han desencadenado y en algunos casos agravado dicha problemática. Aunque como género se distribuye en toda la República, a nivel de especies, su distribución suele ser restringida a regiones y zonas con características ambientales específicas (Santos, Velásquez y González, 2005). La extracción de ejemplares adultos, el cambio de uso de suelo y la explotación de recursos del ambiente provocan una notable disminución en el tamaño de las poblaciones (Sotomayor, Arredondo, Sánchez, Méndez, 2004) más aún cuando por condiciones geográficas se encuentran aisladas (Gómez y Hernández, 2000; Ferrer, Durán, Méndez, Dorantes y Dzib, 2011; Martínez et al., 2016). Por otro lado, las mamilarias comparten las características típicas de la familia Cactaceae: ciclo biológico prolongado y un ritmo de lento crecimiento. Ello conlleva a que en los primeros estadios de su desarrollo presenten altas tasas de mortalidad y como consecuencia la población se estanca en individuos ya adaptados, mayoritariamente adultos (Godínez et al., 2003). De manera previa a este periodo

de sobrevivencia y adaptación, el reclutamiento de nuevos individuos por medio de la germinación de semillas, resulta más bien un hecho esporádico que depende en gran medida de una serie de condiciones ambientales que raramente se presentan (Ferrer et al., 2011), traducándose en una disminución sustancial del éxito reproductivo (Martínez, Molina, Golubov, Vázquez, y Mandujano, 2014).

A nivel experimental se han analizado factores tales como la temperatura, fotoperíodo y promotores de germinación y sustratos que al ser modificados incrementan los porcentajes y velocidad de germinación (Navarro, Demeneghi, 2007; Sánchez, Reyes, García, y Terrazas, 2010; Flores y jurado, 2011). La mayor parte de estos trabajos se han realizado en condiciones de invernadero, aunque también existen otros desarrollados bajo condiciones *in vitro* (Salas, Foroughbackch, Díaz, Cárdenas, y Flores, 2011; Rodríguez, Poot, Rangel, Vaquera, González, y Treviño, 2018).

Bajo este marco, la presente investigación tuvo como objetivos comparar los porcentajes, velocidad de germinación, germinación media y tasa de crecimiento en condiciones *in vitro* y *ex vitro* de cinco especies del género *Mammillaria* listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las especies en estudio fueron: *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha* y *M. spinosissima*, cuatro de ellas catalogadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010) bajo la categoría Protección especial (Pr), mientras que *M. rhodantha* se encuentra categorizada como Amenazada (A). El material vegetal fue donado por la Asociación de Productores de Cactáceas y Suculentas de México (APC A.C.). Las semillas recién recolectadas se empaquetaron en sobres de papel Kraft y almacenadas durante un mes a una temperatura promedio de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en completa oscuridad y en un ambiente seco.

Desinfestación de semillas

Las semillas se seleccionaron para cada especie bajo criterios de homogeneidad en tamaño, color y forma. Posteriormente se desinfestaron mediante una serie de lavados con agua corriente más detergente y Tween 20[®] ; inmersión en etanol al 70% durante 5 minutos; inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos y finalmente dos lavados consecutivos con agua estéril.

Germinación

Para evaluar la germinación de las semillas se compararon dos tipos de tratamientos: *in vitro* y *ex vitro*. En el primer caso, la preparación del medio de cultivo *in vitro* estuvo basada en las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25 %, suplementadas con 0.40 mg.L⁻¹ de Tiamina, 100 mg.L⁻¹ de Myo-inositol, 3 % de sacarosa con un pH 5.7±0.1 y 3% de Gelrite Gellan Gum (Sigma[®]) como agente gelificante. Para el tratamiento *ex vitro* se empleó una mezcla estéril de tierra de hoja y tezontle (1:1), ligeramente humedecida y colocada dentro de contenedores plásticos transparentes a modo de invernadero.

Las semillas de cada especie se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar en cada uno de los tratamientos experimentales con un total de cinco repeticiones con 12 semillas por repetición.

La incubación de los tratamientos fue bajo condiciones controladas de luz y temperatura: 16 horas luz/8h oscuridad con una intensidad lumínica de 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24± 1°C, durante un período de 30 días después de la siembra (dds).

El criterio para definir una semilla como germinada fue la emergencia de la radícula. Las variables respuesta fueron: porcentaje final de germinación (PG), velocidad de germinación (VG) mediante el método propuesto por Maguirre (1962) y germinación media (G_{50}) correspondiente al número de días transcurridos después de la incubación, para alcanzar el 50% del porcentaje final de germinación.

Tasa de crecimiento

En una segunda fase experimental, las plantas obtenidas *in vitro* se conservaron en sus medios respectivos durante un período de dos meses posteriores a la germinación. Luego de ello, se seleccionó de manera aleatoria una muestra de 36 plantas de cada especie, salvo el caso de *M. spinosissima* donde el tamaño de muestra fue de 33 plantas. Bajo un diseño completamente al azar, se distribuyeron 12 y 11 repeticiones respectivamente en tres medios de cultivo. Para este experimento, se emplearon medios MS al 50% suplementados con 0.40 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 3 %, 6% y 9% de sacarosa respectivamente, gelificados con 2.5 % de Gelrite Gellan Gum (Sigma®) y ajustados a pH 5.7±0.1. Se registraron las diferencias entre valores iniciales y finales de altura, diámetro medio, y longitud de raíz (tomando en consideración únicamente la raíz principal), para estimar la tasa de crecimiento relativo (RGR, por sus siglas en inglés) bajo la fórmula: $(V_f - V_i)/(V_i/S)$ donde: V_f = valor final, V_i = valor inicial y S = número de semanas con base en lo reportado por Sumaryono, Wirdhatul y Ratnadewi (2012). El período de incubación fue de 280 días bajo condiciones de ambiente controlado: 16 horas luz/8h oscuridad con una intensidad lumínica de 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24± 1°C. En el caso de las plantas obtenidas *ex vitro* se registraron las mismas variables bajo las mismas condiciones ambientales durante el mismo periodo de tiempo, con un riego por semana.

Aclimatización

Finalmente las plantas obtenidas *in vitro* se aclimatizaron en la misma mezcla de sustrato que aquellas generadas *ex vitro* y se evaluó la sobrevivencia luego de 60 días.

Análisis estadístico

En la parte de germinación, se realizó una transformación de los datos obtenidos en porcentaje a fin de normalizarlos mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada de PG, denotada por la fórmula: $\text{PG}_t = \arcsen(\sqrt{\text{PG}})$, donde PG_t es el

porcentaje de germinación transformado y PG es el porcentaje a transformar dado en un rango de 0 a 1 (Rodríguez, Valdés, y Rodríguez, 2012). Para analizar los datos de PG_t, VG y G₅₀ se realizó un ANDEVA de dos factores: (tratamiento/especie) y una prueba de medias de Tukey con una $p= 0.05$. Con respecto a la estimulación de crecimiento, los datos obtenidos fueron sometidos a un ANDEVA de dos factores: Tratamiento/Especie seguidos de una prueba de medias de Tukey con una $p= 0.05$. Todos los procedimientos estadísticos se procesaron con el software Minitab® v.18 (Minitab, State College, PA, USA).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación

Se presentó una respuesta diferencial en la germinación promovida en los diferentes niveles de los factores tratamiento y especie. En el tratamiento *in vitro* presentó un efecto positivo sobre el valor de PG_t de mayor tamaño en comparación con el que se obtuvo a nivel *ex vitro* (Figura 1). De manera global, se observó un incremento promedio del 25 % sobre los valores de PG_t, lo cual se tradujo en una mayor germinación para las cinco especies (Cuadro 1).

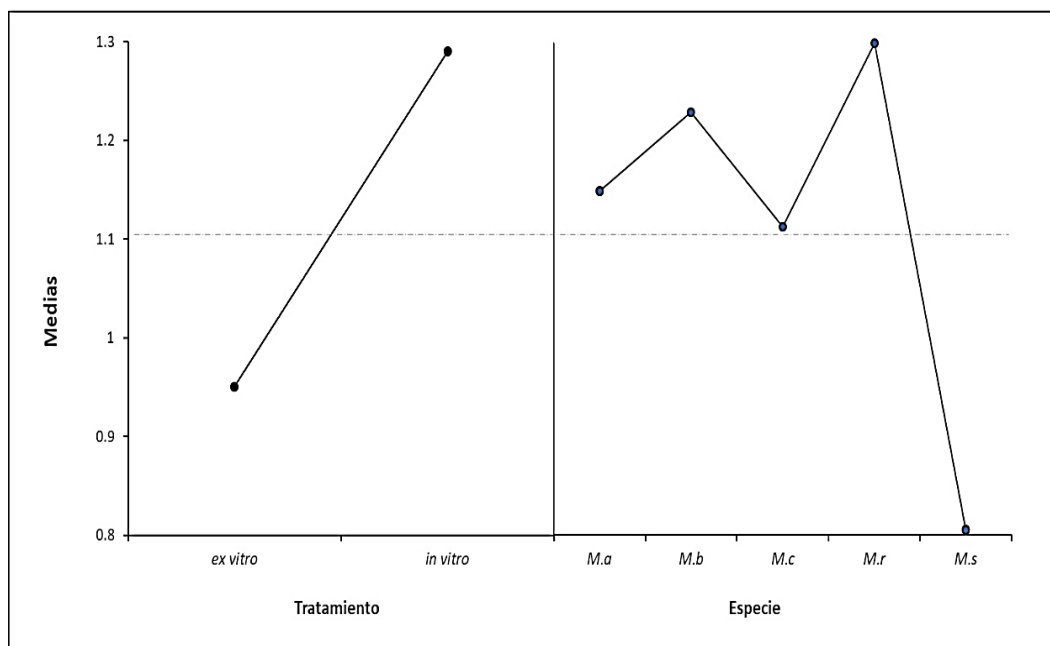


Figura 1. Gráfica de efectos principales para PG_t. Especie: *M. albilanata*, *M. bocasana*, *M. columbiana*, *M. rhodantha*, *M. spinosissima*, (30 dds).

Porcentajes de Germinación (PG)

El análisis de varianza y la prueba de Tukey evidenciaron diferencias significativas en los valores generados por los distintos niveles de tratamiento germinativo sobre las variable respuesta ($p=0.012$). Los valores más altos de PG bajo condiciones *ex vitro* se obtuvieron en *M. bocasana* y *M. rhodantha*, sin embargo bajo condiciones *in vitro* ambas especies compartieron valores de PG con *M. columbiana* y *M. rhodantha* que estadísticamente solo fueron diferentes de los obtenidos en *M. spinosissima* ($p=0.023$), la cual fue en ambos casos la especie con menor PG.

Cuadro 1. Porcentaje de germinación, velocidad de germinación e índice de germinación (30 dds).

Especie	PG <i>ex vitro</i>	PG <i>in vitro</i>	VG <i>ex vitro</i>	VG <i>in vitro</i>	G ₅₀ <i>ex vitro</i>	G ₅₀ <i>in vitro</i>
<i>M. albilanata</i>	60.6 b	92.6 a	1.59 b	2.73 b	12.50 b	10.1 b
<i>M. bocasana</i>	85.2 a	93.3 a	2.40 a	3.50 a	15.20 a	9.70 b
<i>M. columbiana</i>	59.9 bc	93.9 a	1.44 b	2.85 ab	16.40 a	12.60 a
<i>M. rhodantha</i>	76.3 a	99.0 a	2.26 ab	2.80 ab	13.20 ab	11.80 a
<i>M. spinosissima</i>	48.6 c	55.1 b	1.16 b	1.83 b	14.80 a	12.50 a

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre los valores promedio de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron porcentajes de germinación similares a los reportados para el género *Mammillaria* bajo condiciones *ex vitro*. Flores et al. (2006) reportaron porcentajes de germinación de diversas especies de cactáceas utilizando arena como sustrato y un fotoperíodo de 14 horas luz/10h oscuridad a 25°C . Para *M. bocasana* reportaron porcentajes de germinación del 83 %, valor ligeramente inferior al obtenido en este trabajo (85.2%), mientras que para otras especies del mismo género (*M. aurelianata*, *M. plumosa*, *M. orcutti* y *M. longimamma*) el intervalo de porcentajes reportado fue de entre el 42 % al 75% coincidentes con los registrados para las

especies consideradas en este experimento. Considerando las condiciones de germinación naturales como condiciones *ex vitro*, se observó un mayor contraste con lo reportado para *M. gaumeri*, especie para la cual se reportan porcentajes de germinación de apenas el 2.9% de una siembra total de 1500 semillas (Ferrer, Durán, Méndez, Dorantes y Dzib, 2011).

Con respecto a la germinación *in vitro* se obtuvo valores que en general sobrepasaron el 90% coincidiendo con lo reportado por Ruedas, Valverde y Castillo (2000) para especies como *M. magnimamma* (95%) y fueron también superiores a lo señalado para *M. haageana* y *M. carnea* cuyos máximos fueron de 76.71 y 72.87% (Benítez, Orozco, y Rojas, 2004). Por otra parte, Salas et al. (2011) reportaron porcentajes de germinación en medio MS al 50% para *Mammillaria prolifera* cercanos al 23%, mientras que para *M. pectinifera* los valores máximos reportados por Villanueva, Navarro y Eliosa (2016) fueron ligeramente superiores al 35%. Ambos casos presentan valores mucho menores al porcentaje de germinación más bajo observado en esta investigación (51.1% para *M. spinosissima*).

Como se pudo advertir en las dos condiciones germinativas, *M. spinosissima* presentó los menores porcentajes de germinación, esto pudo deberse a que tal y como señalan Trejo y Garza (1993) existen algunas cactáceas cuyas semillas pese a ser recién recolectadas, no siempre tienen la mejor viabilidad en los primeros meses tras la cosecha, y mejoran su viabilidad al cabo de un par de años.

Velocidad de germinación (VG)

Para la variable VG, el mayor valor se obtuvo en *M. bocasana* bajo ambas condiciones de germinación, las cuales al ser comparadas entre sí resultaron ser estadísticamente diferentes ($p=0.016$). Las especies restantes también presentaron incrementos en cuanto a la VG en el tratamiento *in vitro*, pero en el caso de *M. spinosissima* este incremento no fue significativo entre tratamientos ($p=0.062$).

Para condiciones *ex vitro* Flores y Jurado (2011) reportaron valores de 1.25 para *A. myriostigma*, mientras que para otras cactáceas como *Pilosocereus pachycladus* el valor reportado fue de 3.91 (Abud, Gonçalves, Reis, Pereira y Bezerra, 2010). Los valores obtenidos para esta variable en la presente investigación coinciden dentro de este intervalo, siendo el menor de 1.16 para *M. spinosissima* y de 2.40 el mayor en *M. bocasana*.

Respecto a la germinación *in vitro*, Salas et al. (2011) reportan valores de VG de 0.42 ± 0.08 en medios de cultivo MS al 50% gelificados y suplementados con 10% de sacarosa. Específicamente para *M. prolifera* el valor de VG fue de 0.1, valor muy por debajo de lo obtenido para las especies aquí evaluadas, donde la de menor VG (*M. spinosissima*) supera más de 18 veces dicho valor de referencia. En contraste, Santos, Martín del Campo, Arredondo y Santos (2001) reportan valores de hasta 8.98 obtenidos para *A. myriostigma* en medios MS al 50%. En este sentido deben tenerse en consideración las características propias de las semillas, así como su fisiología, ya que si bien las velocidades de germinación no rebasan el valor de 3.50, los porcentajes de germinación en cuatro de las cinco especies sobrepasan el 90%.

Germinación media (G₅₀)

Los resultados obtenidos en condiciones *ex vitro* contrastan con lo reportado por Sánchez et al. (2010) para *M. mazatlanensis* donde el valor de G₅₀ (T₅₀) fue de 6.3 días, mientras que el valor más bajo obtenido en este caso fue de 12.5 días para *M. albilanata*. Pese a ello, cabe aclarar que *M. mazatlanensis* fue incubada durante el período de germinación 5°C por arriba de la temperatura utilizada en este experimento, lo cual puede influir sustancialmente en el valor de la variable. Por su parte Navarro, Cervantes y Lázaro (2008) señalan que la germinación de *M. hamata* y *M. sphacelata* ocurrió hasta la segunda y cuarta semana respectivamente (14 y 28 días), con lo que podemos inferir que los valores para G₅₀ son mayores a algunos de los obtenidos para las cinco especies evaluadas, y que pese a pertenecer al mismo género cada especie muestra un comportamiento diferente.

La mayor reducción en días se presentó en la condición *in vitro* para *M. bocasana* con 9.7, mientras que la menor ocurrió en *M. rhodantha* (11.8 contra 13.2 días *ex vitro*). Estos resultados contrastan con lo reportado para especies de este mismo género, donde por ejemplo, *M. magnimamma* alcanzó el valor G_{50} a los 3.4 días (Ruedas, Castillo, y Valverde, 2000).

En general se observó que en la condición *in vitro* se dio una reducción significativa en el tiempo en días para alcanzar el 50% de germinación. Esto puede atribuirse principalmente a que las semillas así sembradas estuvieron expuestas a una imbibición continua lo que facilita y acelera los procesos fisiológicos previos y durante la germinación.

Tasa de crecimiento

Se presentan a continuación los valores de RGR calculados para altura, diámetro y longitud de raíz en condiciones *ex vitro* e *in vitro*. Si bien existen estudios donde se ha calculado el valor de RGR en cactáceas, en la mayoría de los casos esto se ha realizado a partir del cálculo de biomasa tanto en peso seco como en peso fresco (Ruedas et al., 2000; Martínez y Valverde, 2008; Balen et al., 2013) o bien respecto a aproximaciones geométricas del volumen de la planta (Loustalot, Malda, Suzán, Hernández y Guevara, 2014).

En consecuencia, se pretende que los resultados obtenidos en este experimento constituyan un nuevo aporte para la medición de tales variables, describiendo lo encontrado.

RGR altura

Existió diferencia estadística entre los efectos generados en RGR a nivel de tratamientos ($p=0.034$). De manera global, se puede observar que bajo condiciones *in vitro* la tasa de crecimiento es mucho mayor en todas las especies en comparación con lo que se obtuvo bajo el tratamiento *ex vitro* (Figura 2). A nivel de especies, de acuerdo a la prueba de Tukey se presentó diferencia estadística entre la tasa de crecimiento de *M. albilanata* y *M. spinosissima*, bajo todos los tratamientos.

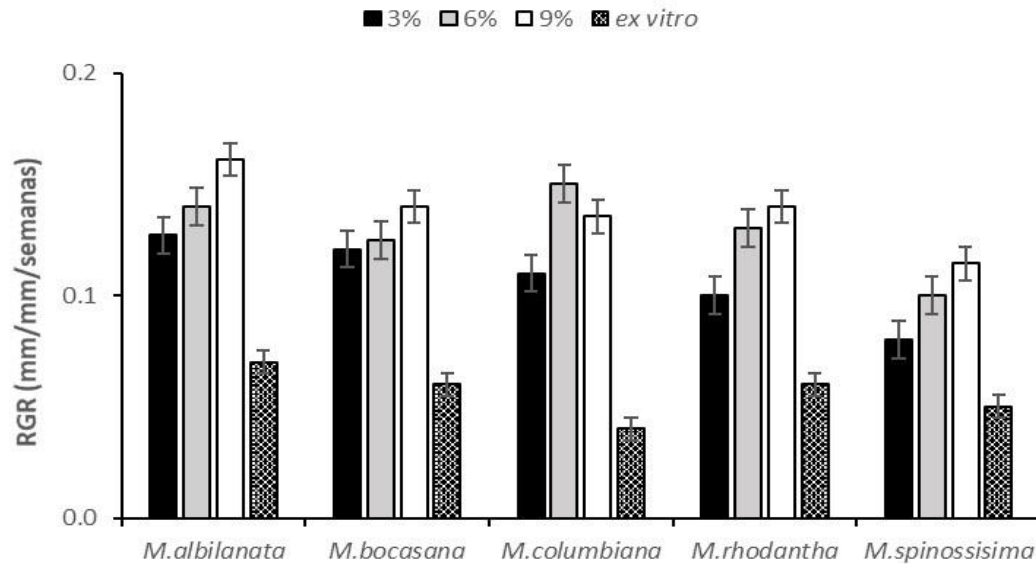


Figura 2. Efecto en el valor de RGR de altura bajo tratamientos *in vitro* con tres dosis de sacarosa vs tratamiento *ex vitro*, después de 280 días de incubación.

En todas las especies se observó un incremento en la tasa de crecimiento bajo los medios suplementados con dosis de 6% y 9%. Sin embargo no hubo diferencia estadística entre estas dos ($p=0.106$), lo cual sugiere que la adición de concentraciones mayores de sacarosa no necesariamente generó incrementos mayores a los que se obtuvieron con suplementaciones de 60 g.L⁻¹.

Las plantas más altas se presentaron en *M. albilanata* bajo el tratamiento al 9% de sacarosa con una media de 68 mm y una RGR de 0.16, mientras que para esta misma especie bajo el tratamiento *ex vitro* se alcanzó una altura promedio de 36 mm y una RGR de 0.07. El resto de las especie se distribuyó en rangos de RGR de 0.5 a 0.15 y alturas de 34 mm a 63 mm.

RGR diámetro

Al igual que en el caso anterior, el valor de RGR fue mayor en el tratamiento *in vitro* y a su vez dentro de éste en los medios de cultivo suplementados con dosis de 6% y 9% de sacarosa los cuales no fueron significativamente diferentes de

acuerdo con la prueba de medias de Tukey, generando valores de RGR muy cercanos entre sí para cada especie (Figura 3).

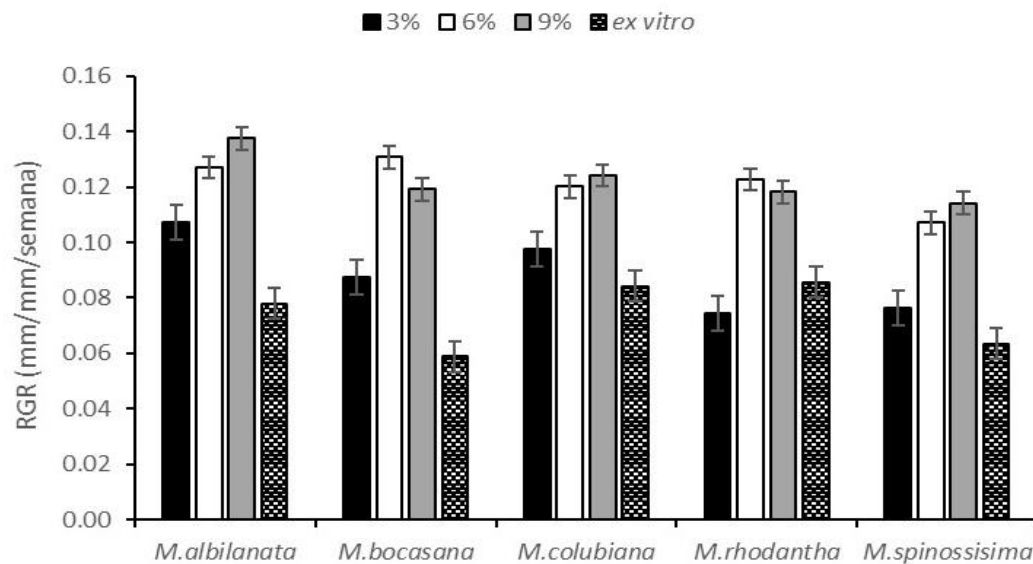


Figura 3. Efecto en el valor de RGR de diámetro bajo tratamientos *in vitro* con tres dosis de sacarosa vs tratamiento *ex vitro*, después de 280 días de incubación.

Los mayores diámetros se presentaron en *M. albilanata* con tamaños promedio de 19 mm en el mejor de los tratamientos (6%) mientras que el menor crecimiento se dio en *M. bocasana* donde el diámetro promedio fue de 10 mm.

RGR longitud de raíz

Los valores de RGR en raíz presentaron diferencias significativas entre los tratamientos *in vitro* y el tratamiento *ex vitro* ($p=0.014$). Las raíces más grandes se desarrollaron en los tratamientos suplementados con el 3% de sacarosa (Figura 4).

Los tratamientos con 6 % y 9% también incrementaron la tasa de crecimiento de manera similar y cercana a lo obtenido bajo dosis de 3% en cuatro de las cinco especies, curiosamente aquellas en las cuales el desarrollo de la parte aérea fue

mayor. Para el caso de *M. spinosissima* no hubo diferencia en el valor de RGR bajo las tres concentraciones de sacarosa ($p=0.63$).

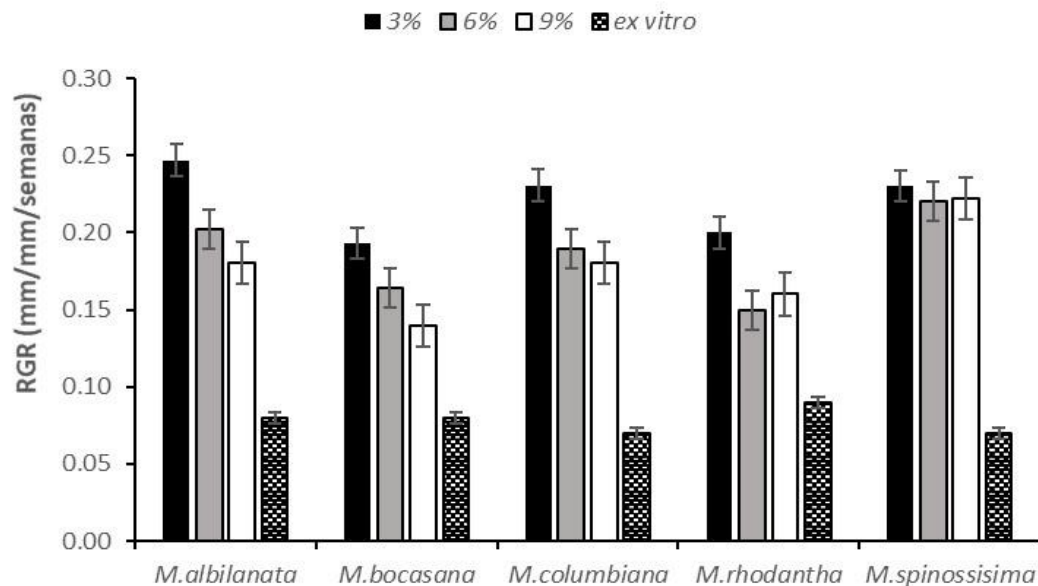


Figura 4. Efecto en el valor de RGR de longitud de raíz bajo tratamientos *in vitro* con tres dosis de sacarosa vs tratamiento *ex vitro*, después de 280 días de incubación.

La adición de carbohidratos en el medio de cultivo *in vitro* mejoró el crecimiento de las plántulas. Al encontrarse en condiciones controladas de humedad, temperatura y luz, la tasa fotosintética disminuye, sin embargo la suplementación con sacarosa compensa y estimula el crecimiento de las plantas al mantener la presión osmótica en la célula que en consecuencia aumenta su tamaño, de acuerdo con lo reportado por Kozai, Kubota, y Ryoung (1997). No obstante, se puede inferir en cuanto a los resultados obtenidos que la suplementación con dosis por encima del 6% no generó incrementos significativos en todas las especies, en algunas incluso se presentó disminución en el valor de RGR en diámetro lo cual pudo deberse al potencial hiperosmótico en el medio de cultivo tal y como señalan Martínez, Andrade, Villegas, Villegas y López (2011), mientras que en raíz, el RGR es mayor en medios con 3%, sin embargo el desarrollo de raíces secundarias fue mucho mayor en las otras dos concentraciones.

Aclimatación

Finalmente después del período de aclimatación la sobrevivencia en plantas producidas tanto a nivel *in vitro* como *ex vitro* fue del 100%.

3.4. CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de semillas de las especies evaluadas presentó mejores respuestas en comparación con el tratamiento *ex vitro* en todas las variables. Al incrementar el nivel de nutrientes *in vitro* y suplementar con dosis de sacarosa entre el 3% y 6% se promovió un mayor crecimiento en las plantas durante el mismo lapso de tiempo que de manera *ex vitro*, además de que el porcentaje de sobrevivencia final fue del 100 %.

La medición de las variables altura de planta, diámetro de planta y longitud de raíces resultaron un buen indicador para evaluar la tasa de crecimiento relativo (RGR). A diferencia de la RGR basada únicamente en biomasa, la RGR calculada bajo las variable ya mencionadas, nos permite conocer las características del desarrollo de las plantas obtenidas.

Finalmente, los resultados obtenidos se podrían implementar como una estrategia que contemple la germinación y crecimiento *in vitro*, obteniendo plantas más grandes y vigorosas en un menor tiempo para poder dirigir las a esquemas de conservación *ex situ* e *in situ* de estas especies.

3.5. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado. A la M.C.H. Julieta Rodríguez Licona y al L.H. David De la Rosa por su aporte de material vegetal para la realización de esta investigación.

3.6. LITERATURA CITADA

- Abud, H. F., Gonçalves, N. R., Reis, R. G. E., Pereira, D. S. y Bezerra, A. M. E. (2010). Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. *Revista Ciência Agronômica*, 41(3), 468-474.
- Álvarez, R., Godínez, A. H., Guzmán, U. y Dávila, P. (2004). Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (75), 7-16 .
- Arias M. S., S. Gama, L. y Guzmán, C. (1997). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95. *CACTACEAE Juss.* Instituto de Biología, UNAM. México. 146 p.
- Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Štefanić, P.P., Rončević, S. y Krsnik, R. M. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *In Vitro Cell Dev Plant* 49:21–32
- Benítez, R. L., Orozco, S. J. y Rojas, A. M. (2009). Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *The Southwestern Naturalist*. 49. 11-17.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM059-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. Diario Oficial de la Federación. (Segunda sección). 30 de diciembre de 2010. 70 p.
- Ferrer, M., Durán, R., Méndez, M., Dorantes, A. y Dzib, G. (2011) Dinámica poblacional de genets y ramets de *Mammillaria gaumeri* cactácea endémica de Yucatán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 89:83-105.
- Flores, J. y Jurado, E., (2011). Germinación de especies de cactáceas en categoría de riesgo del desierto chihuahuense. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2(8), 59-70.
- Flores, J. E., Jurado, L., Chapa, V. A., Ceroni, S. P., Dávila, A. G., Galíndez, D., Gurvich, P., León, L. C., Ordóñez, P., Ortega, B. N., Ramírez, B. A., Sandoval, C.E., Seal, T., Ulian Y. y Pritchard, H. (2011). Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti species. *Environmental and Experimental Botany* 71: 79-88.
- Godínez, A. H., Valverde, T. y Ortega, B. P. (2003). Demographic trends in the Cactaceae. *The Botanical Review* 69:173-203.

- Gómez, H. C. y Hernández, H.M. (2000). Diversity, geographical distribution and conservation of Cactaceae in the Mier and Noriega region, México. *Biodivers. Conserv.* 9:403–418
- IUCN, Red List of Threatened Species (2018). Version 2018. www.iucnredlist.org. (Enero, 2018).
- Kozai, T., Kubota, C. y Ryoung, B. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 49.
- Loustalot, E., Malda, G., Suzán, H., Hernández, S. L. y Guevara, A. (2014). Estudios de Germinación y crecimiento en semillas de *Ferocactus histrix* (De Candolle). *Cactáceas y succulentas mexicanas* 59 (3):79-95 (ISSN: 0526-717X)
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- Martínez, B. A. y Valverde, M.T. (2008). Growth response of three globose cacti to radiation and soil moisture: An experimental test of the mechanism behind the nurse effect. *Journal of Arid Environments* **72**:1766-1774.
- Martínez, P. C., Molina, F. F., Golubov, J., Vázquez, L. A. y Mandujano, M.C. (2014). A comparative study of the reproductive traits and morphology of a genus of geophytic cacti. *International Journal of Plant Sciences* 175: 663-680.
- Martínez, R. M., Arroyo, C. G., Mandujano, M. C. y Golubov, J. (2016). Population dynamics of *Mammillaria humboldtii*, an endemic cactus from Hidalgo state, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(2), 199-208.
- Martínez, Y. M., Andrade, M., Villegas, A., Alia, I., Villegas, O. G. y López, V. (2011). Cultivo *in vitro* de pitayo (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(3), 95-105.
- Minitab 18 Statistical Software (2018). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Navarro, C. y Demeneghi, A. P. (2007). Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. *Zonas Áridas*. 11: 233-239.
- Navarro, C., Cervantes, G. y Lázaro, O. (2008). Efecto de la escarificación de semillas en la germinación de dos especies de *Mammillaria*. *Zonas Áridas*. 12. 97-105.

- Novoa, A., Le Roux, J.J., Robertson, M.P., Wilson J.R.U. y Richardson, D.M. (2015). Introduced and invasive cactus species: a global review. *AoB PLANTS* 7:plu078.
- Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Rodríguez, R. E., Poot, P. W., Rangel, L. J., Vaquera, H. H., González, G. O. y Treviño, C. J. (2018). Germinación *in vitro* de biznaga cabuchera. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 9(3), 691-699.
- Rodríguez, S. J. L., Valdés, R. Y. y Rodríguez, L. R. (2012). Tratamientos a semillas para mejorar la germinación de *Colubrina ferruginosa* Brong. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(1), 27-31.
- Ruedas, M., Castillo, A. S. y Valverde, T. (2000). Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactaceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66: 25-35.
- Salas, C. L. R., Foroughbackch, P. R., Díaz, J. M. L., Cárdenas, A., M. L. y Flores, V. A. (2011). Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(spe3), 565-575.
- Sánchez-Soto, B., Reyes-Olivas, Á., García-Moya, E. y Terrazas, T. (2010). Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del noroeste de México. *Interciencia*, 35 (4), 299-305.
- Santos, D. M. S., Velásquez, G. Y. y González, C. M. M. (2005). Pigment production by callus of *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia* 39:619–626.
- Santos, M., Martín del Campo, J., Arredondo, A. y Santos, M. (2001). Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (CACTACEA) *in vitro*. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 24 (2), 133-138.
- Sotomayor, J. M., Arredondo, G. A., Sánchez, B. F. R. y Méndez, M. M. (2004) The genus *Turbinicarpus* in San Luis Potosí. Venogno, Italy: *Cactus & Co*.
- Sumaryono, W. M. y Ratnadewi, D. (2012). Effect of carbohydrate source on growth and performance of *in vitro* sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) Plantlets. *Hayati J Biosciences*.19:88-92.
- Trejo, L. y Garza, M. (1993). Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de *Mammillaria heyderi* Muchl en 4 sustratos. *BIOTAM*. 5(3):19-24.
- Torres, W., Méndez, M., Dorantes, A. y Durán, R. (2010). Estructura, composición y diversidad del matorral de duna costera en el litoral yucateco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 86:37-51.

Villanueva, R., Navarro, C. y Eliosa, H. (2016). Germinación de tres especies de cactáceas endémicas de México en condiciones asépticas. *Zonas Áridas*. 16. 1. 10.21704/za.v16i1.633.

4. PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS ESPECIES AMENAZADAS DEL GÉNERO *Mammillaria* (CACTACEAE)

PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS ESPECIES AMENAZADAS DEL GÉNERO *Mammillaria* (CACTACEAE)

RESUMEN

Se presentan los resultados para la propagación *in vitro* de *Mammillaria albilanata* y *Mammillaria haageana*; especies listadas bajo categorías de protección en normas nacionales y catálogos internacionales debido a su constante explotación como recurso ornamental. En la etapa de inducción y multiplicación de brotes se utilizaron explantes basales, intermedios y apicales provenientes de plantas germinadas *in vitro*. Se evaluó el tipo de respuesta, número y altura de brotes a partir de cada tipo de explante bajo seis combinaciones de benciladenina (BA) y ácido 3-indol acético (AIA). Las mejores respuestas se generaron bajo la combinación en relación 1:1 de BA:AIA en ambas especies, no obstante a nivel de explante para *M. albilanata* el explante intermedio resultó más eficiente, mientras que para *M. haageana* lo fue el de tipo basal. En la etapa de enraizamiento se observó desarrollo de raíces bajo todos los tratamientos evaluados, sin embargo el porcentaje de enraizamiento, longitud y biomasa de raíz mejoró significativamente en medios suplementados con 1.0 mg.L⁻¹ de AIA. Finalmente en la etapa de aclimatación la sobrevivencia de las plantas generadas de esta manera fue del 100 % para ambas especies.

Palabras clave: Especies amenazadas, *Mammillaria albilanata*, *Mammillaria haageana*, Micropropagación, Organogénesis.

⁵ Tesis de Doctorado en Ciencias, Doctorado en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

***In vitro* PROPAGATION OF TWO THREATENED SPECIES OF *Mammillaria* GENUS (CACTACEAE)**

ABSTRACT

The results for the *in vitro* propagation of *Mammillaria albilanata* and *Mammillaria haageana* are presented; species listed under protection categories in national standards and international catalogs due to their constant exploitation as an ornamental resource. In the stage of shoot induction and multiplication, basal, middle and apical explants from plants germinated *in vitro*, were used. The type of response, number and height of shoots were evaluated from each type of explant under six combinations of benzyladenine (BA) and 3-indole acetic acid (AIA). The best responses were generated under the combination in a 1:1 ratio of BA: AIA in both species, however at explant level for *M. albilanata* the intermediate explant was more efficient, while for *M. haageana* it was the basal type. In the rooting stage, root development was observed under all the treatments evaluated, however the percentage of rooting, length and root biomass improved significantly in media supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of AIA. Finally, in the acclimation stage, the survival of the plants generated in this way was 100% for both species.

Key words: Threatened species, *Mammillaria albilanata*, *Mammillaria haageana*, Micropropagation, Organogenesis.

4.1. INTRODUCCIÓN

Distribuidos en la mayor parte de América, desde el sur de Canadá hasta la Patagonia Argentina, los cactus constituyen un grupo de plantas vasculares cuyas adaptaciones biológicas les han permitido adaptarse a diversos ecosistemas, desde los bosques templado y tropical, hasta las dunas costeras y zonas áridas y semiáridas del continente (Edwards Nyffeler y Donoghue, 2005; Torres, Méndez, Dorantes y Durán, 2010; Lema, y Kulus, 2014). Dentro de la familia Cactaceae se reconoce la existencia de 1453 especies (Barthlott et al., 2015; cf. 1500 especies, Ramírez et al., 2007). Un alto porcentaje de ellas se distribuyen a lo largo y ancho del territorio mexicano. Hunt (2016) reporta un total de 50 géneros con presencia en México, mientras que Villaseñor (2016) refiere un total de 69, no obstante ambos autores coinciden en que el género *Mammillaria* resulta ser el que tiene mayor presencia y endemismo en México.

Las especies que comprenden el género *Mammillaria* se caracterizan por sus formas globosas o cilíndricas con presencia de múltiples tubérculos con espinas (mammas) a lo largo de su cuerpo. La característica más vistosa son sus flores de colores variados que rematan la planta a modo de corona. Desafortunadamente esto mismo ha propiciado la explotación y saqueo desmedido de decenas de especies que son altamente apreciadas por su carácter ornamental (Jiménez y Jiménez, 2007; Goettsch et al., 2015).

Mammillaria albilanata y *Mammillaria haageana* son dos especies que actualmente se encuentran listadas tanto en la NOM-059- SEMARNAT (DOF,2010) como en la Red List de la International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 2018). Si bien en ambos casos se les considera bajo una categoría de protección menor, el continuo saqueo y perturbación de sus zonas de distribución natural podrían derivar en un decremento del número de ejemplares silvestres y con ello impactar negativamente en la conservación de dichos recursos. Ante este panorama resulta prioritario evaluar alternativas de propagación masiva de ejemplares que

permitan tanto la conservación del recurso genético como también su aprovechamiento de manera consciente y sustentable, sin que ello afecte el desarrollo de las poblaciones naturales. Actualmente se dispone de un gran número de protocolos de cultivo de tejidos que han sido desarrollados para diversas especies de *Mammillarias* que se encuentran bajo presiones similares (Ramírez y Salazar, 2016; Téllez et al., 2017; Lázaro, Mata, González, Arias y Reverchon, 2018). No obstante, no existe un protocolo único que pueda implementarse para todas ellas puesto que su micropropagación depende de diversos factores, entre los cuales destacan las características genéticas de la propia especie, el tipo de explante utilizado y la concentración y naturaleza de los reguladores de crecimiento vegetal empleados (Kulus, 2015). Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la producción *in vitro* de plantas de *M. albilanata* y *M. haageana* a partir de distintos tipos de explante, a fin de que usarse con fines ornamentales comerciales y en esquemas de conservación *ex situ*.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *M. albilanata* y *M. haageana* de cuatro meses de edad, germinadas *in vitro*. A partir de ellas se tomaron explantes de la región basal, intermedia y apical, todos con presencia de areolas.

Etapas de inducción y multiplicación

Para esta etapa se prepararon los tratamientos basados en medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100%, suplementados con 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 0.40 mg.L⁻¹ de tiamina y 3% de sacarosa, adicionalmente se emplearon combinaciones de concentraciones de benziladenina (BA) y (AIA) en el orden de 0.0 , 1.0 y 2.0 mg L⁻¹. Los medios fueron ajustados a un pH 5.7 ± 0.1, gelificados con 7 g.L⁻¹ de agar agar y esterilizados en autoclave a 121°C y 1.5 kg cm⁻² durante 20min. Los explantes fueron sembrados en frascos de 120 ml con

20 ml de medio. En cada tratamiento se sembraron 15 repeticiones por explante para cada una de las especies. La incubación se realizó durante 112 días bajo condiciones de fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad a una intensidad lumínica de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (los primeros 14 días) y de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $24 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura durante el período restante.

Etapas de enraizamiento

Luego de la etapa de inducción, se seleccionaron brotes que presentaron un desarrollo normal y uniforme, caracterizados por presentar tejido vigoroso, estructuras definidas y sin señales de vitrificación. Los brotes se individualizaron y se sembraron en tubos de ensayo de fondo plano (120X24mm) con 10 ml de medio de cultivo, con un total de 30 repeticiones por tratamiento para cada especie.

Los medios de cultivo se prepararon con sales MS al 50 % suplementadas con 100 mg.L^{-1} de mioinositol, 0.40 mg.L^{-1} de tiamina, 3% de sacarosa, 1 g.L^{-1} de carbón activado y dos dosis de AIA (0.5 y 1.0 mg.L^{-1}) más un tratamiento testigo sin regulador de crecimiento vegetal (RCV). La incubación se realizó durante 6 semanas bajo condiciones de fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad a una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $24 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.

Aclimatización

La aclimatización de plantas enraizadas se realizó bajo condiciones de invernadero en una mezcla de sustrato de tezontle y tierra de hoja en proporción 1:1. En los primeros 42 días se realizó un riego cada tercer día, a partir de la séptima semana (49 días) el riego se redujo a dos veces por semana y finalmente a los 112 días el riego se aplicó una vez semanalmente.

Análisis estadístico

Se evaluó el tipo de respuesta morfogénica por tipo de explante y tratamiento, para ello se analizó el número de brotes y su altura mediante un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($p=0.05$). Posteriormente para la etapa de enraizamiento se determinó el porcentaje de enraizamiento en cada tratamiento,

y se aplicó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p=0.05$) para las variables longitud de raíz y biomasa en peso fresco con una submuestra destructiva de 10 repeticiones por tratamiento. Por último, para la etapa de aclimatación solo se registró el porcentaje de sobrevivencia de las plantas. Los análisis de datos se realizaron con el software estadístico Minitab® v.18 (Minitab, State College, PA, USA).

4.3. RESULTADOS

Todos los tratamientos indujeron la formación de brotes tanto en *M. albilanata* como en *M. haageana*. A nivel de explantes, se presentó una respuesta de tipo organogénico superior al 90% en las dos especies; solo en algunos casos el explante generó callo de tipo compacto. En general en ambas especies hubo variación respecto al número de días de incubación necesarios para generar los primeros brotes (Figura 5), obteniéndose en primer término a partir del explante basal, no obstante se observó una formación de brotes más temprana en los explantes de *M. haageana*.

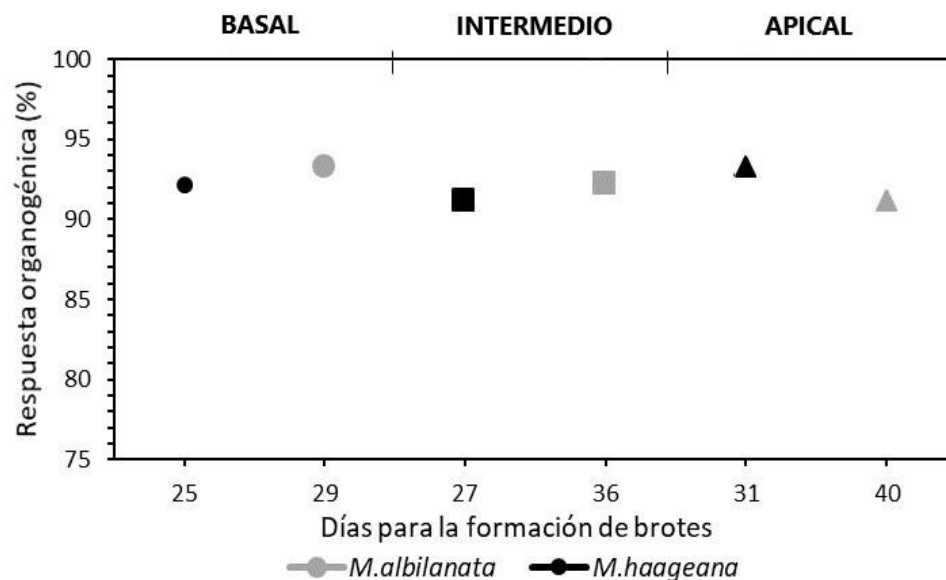


Figura 5. Días necesarios para la formación de brotes y porcentaje de respuesta organogénica según tipo de explante.

Proliferación de brotes

Se generaron brotes en los tres tipos de explantes para cada especie, en algunos casos el número de brotes se incrementó en un mismo tipo de explante al cambiar el tratamiento (Figura 6a-d) observándose interacción entre ambos factores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de BA y AIA en la formación de brotes y altura a partir de tres diferentes tipos de explantes de *M. albilanata* y *M. haageana* después de 112 días de incubación.

Especie	Explante	BA (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)	Número de brotes*	Tamaño de brotes* (mm)
<i>M. albilanata</i>	Basal	----	----	0.66 ± 0.15 c	7.16 ± 0.23 a
		----	1.0	0.73 ± 0.18 bc	6.94 ± 0.16 ab
		1.0	----	2.40 ± 0.30 a	7.04 ± 0.02 a
		1.0	1.0	1.86 ± 0.30 ab	6.64 ± 0.16 b
		1.0	2.0	1.66 ± 0.18 a	5.03 ± 0.08 c
		2.0	1.0	1.73 ± 0.22 a	6.14 ± 0.21 b
	Intermedio	----	----	1.20 ± 0.22 d	6.86 ± 0.33 ab
		----	1.0	2.00 ± 0.25 cd	7.04 ± 0.41 a
		1.0	----	3.66 ± 0.34 b	5.44 ± 0.02 c
		1.0	1.0	7.40 ± 0.49 a	5.66 ± 0.09 c
		1.0	2.0	3.40 ± 0.30 bc	6.31 ± 0.11 b
		2.0	1.0	3.00 ± 0.32 bc	5.81 ± 0.17 bc
	Apical	----	----	2.13 ± 0.25 b	5.60 ± 0.23 a
		----	1.0	1.86 ± 0.19 b	5.49 ± 0.31 a
		1.0	----	3.86 ± 0.32 a	5.58 ± 0.45 a
		1.0	1.0	4.46 ± 0.37 a	4.96 ± 0.38 a
		1.0	2.0	3.56 ± 0.43 a	5.11 ± 0.39 a
		2.0	1.0	1.46 ± 0.25 b	5.13 ± 0.35 a
<i>M. haageana</i>	Basal	----	----	1.66 ± 0.18 b	4.72 ± 0.11 a
		----	1.0	1.73 ± 0.20 b	5.02 ± 0.36 a
		1.0	----	1.86 ± 0.53 b	5.04 ± 0.12 a
		1.0	1.0	9.63 ± 0.60 a	4.64 ± 0.66 ab
		1.0	2.0	8.53 ± 0.47 a	3.96 ± 0.38 b
		2.0	1.0	8.02 ± 0.23 a	5.11 ± 0.19 a
	Intermedio	----	----	1.40 ± 0.21 c	5.66 ± 0.53 b
		----	1.0	1.80 ± 0.14 c	7.01 ± 0.14 a
		1.0	----	5.26 ± 0.31 b	5.41 ± 0.22 b
		1.0	1.0	6.63 ± 0.79 b	5.67 ± 0.15 b
		1.0	2.0	8.05 ± 0.53 a	5.27 ± 0.14 b
		2.0	1.0	8.72 ± 0.18 a	6.79 ± 0.11 a
	Apical	----	----	2.03 ± 0.24 c	6.40 ± 0.16 a
		----	1.0	2.43 ± 0.23 c	5.19 ± 0.22 b

1.0	----	2.56 ± 0.28 c	5.32 ± 0.18 b
1.0	1.0	7.02 ± 0.49 b	6.11 ± 0.25 a
1.0	2.0	7.86 ± 0.36 a	6.24 ± 0.27 a
2.0	1.0	7.12 ± 0.04 b	5.83 ± 0.25 a

*medias ± SE de explantes de cada tipo por tratamiento. Las medias seguidas por la misma letra en cada columna no difieren significativamente a un nivel del 5% por la prueba de Tukey.

La suplementación con RCV potencializó la proliferación de brotes que en algunos casos mostró diferencias estadísticas, sin embargo existió una dosis a partir de la cual la respuesta (dependiendo del tipo de explante) lejos de incrementarse, disminuyó, tal y como ocurrió en las combinaciones de relación 2:1 de AIA:BA y BA:AIA para los explantes basal e intermedio de *M. albilanata*. En cambio para *M. haageana* la respuesta se incrementó en los explantes intermedio y apical cuando la proporción de RCV sobrepasó la relación 1:1.

Altura de brotes

En general, salvo casos específicos (Cuadro 2) la mayoría de los brotes generados presentaron un mayor tamaño en medios con dosis bajas o nulas de RCV. En *M. albilanata* los mayores tamaños de brote se generaron a partir de explantes basal e intermedio, mientras que en *M. haageana* estos se presentaron en el explante de tipo basal.

Cuando el número de brotes aumentó el tamaño de los brotes disminuyó y viceversa, sin embargo en aquellos tratamientos donde se obtuvo explantes grandes (>10 mm), un porcentaje cercano al 25% presentó hiperhidratación de tejido lo cual no es una característica deseable para la micropropagación de este tipo de especies, debido a que requieren de un proceso de recuperación que involucra la aplicación de otros medios de cultivo.

Porcentaje de enraizamiento

En todos los tratamientos se indujo la formación de raíces para ambas especies aproximadamente a los 30 días de incubación. Mientras que para *M. albilanata* no hubo una diferencia significativa respecto al efecto de la suplementación con

AIA frente al testigo, en *M. haageana* si se presentó un aumento en relación al porcentaje de enraizamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de AIA en el enraizamiento de brotes de *M. albilanata* y *M. haageana*.

Especie	AIA mg.L ⁻¹	Porcentaje de enraizamiento	Longitud de raíz* (mm)	Biomasa de raíz* (mg)
<i>M. albilanata</i>	----	80.0	19.4 ± 0.45 b	17.4 ± 0.23 b
	0.5	93.3	21.3 ± 0.52 b	18.3 ± 0.16 b
	1.0	86.6	34.5 ± 0.33 a	27.1 ± 0.02 a
	----	76.6	16.7 ± 0.36 b	10.5 ± 0.13 c
<i>M. haageana</i>	0.5	96.6	28.5 ± 0.77 a	21.4 ± 0.26 b
	1.0	93.3	30.2 ± 0.64 a	26.3 ± 0.39 a

*medias ± SE de explantes de cada tipo por tratamiento. Las medias seguidas por la misma letra en cada columna no difieren significativamente a un nivel del 5% por la prueba de Tukey.

Longitud de raíz

Las raíces más largas se generaron en tratamientos que contenían AIA (Figura 6e-j). En el caso de *M. albilanata* el aumento en la concentración de la auxina incrementó sustancialmente la longitud de la raíz, en tanto que para *M. haageana* la longitud de la raíz mostró independencia con respecto a la dosis del RCV (cuadro 3).

Biomasa de raíz

Por otra parte, el desarrollo de raíces secundarias fue mayor tanto para *M. albilanata* como para *M. haageana* cuando se incrementó la dosis de AIA (Figura 6e-i), lo cual impactó de manera significativa en los registros promedio de dicha variable resumidos en el cuadro 3.

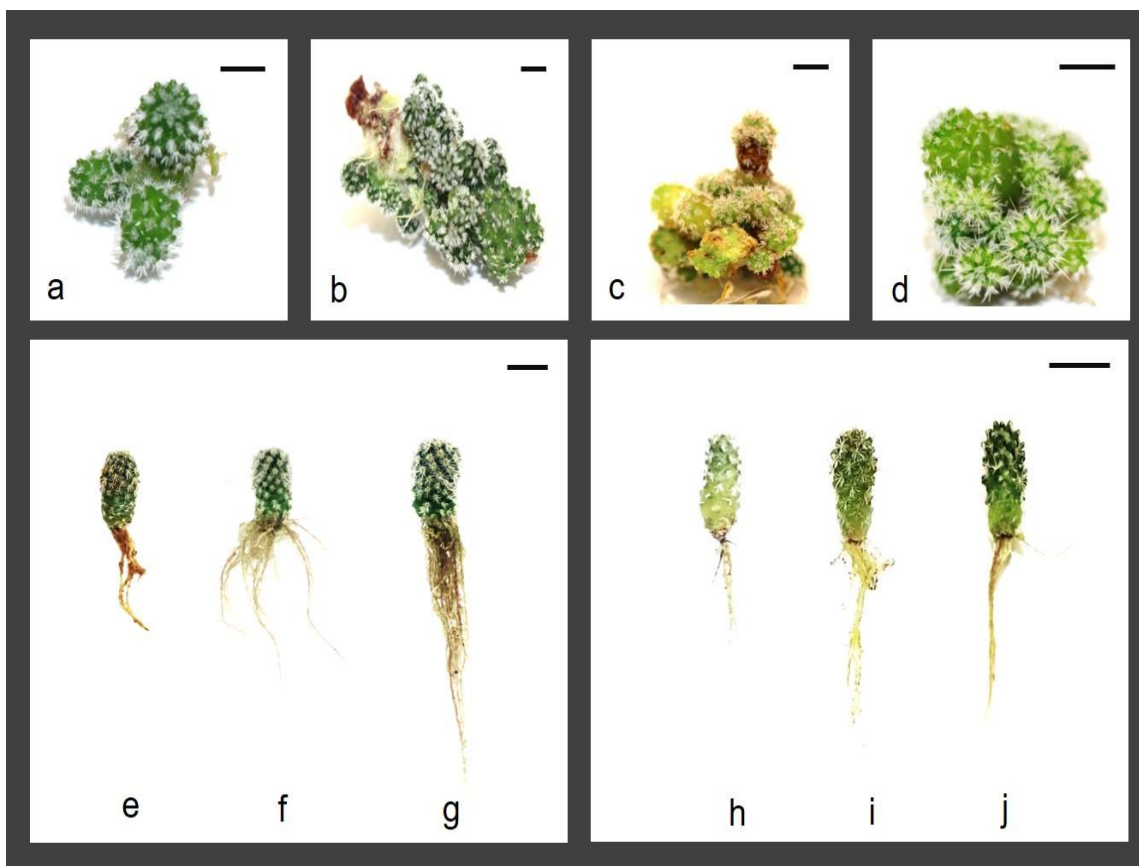


Figura 6. Brotes de *M. albilanata* a partir de explante intermedio en tratamiento testigo **a)** y **b)** suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de BA y 1.0 mg.L^{-1} de AIA; Brotes de *M. haageana* a partir de explante basal en tratamiento testigo **c)** y **d)** suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de BA y 1.0 mg.L^{-1} de AIA. Desarrollo de raíces de *M. albilanata* en tratamiento testigo **e)**, 0.5 mg.L^{-1} de AIA **f)** y 1.0 mg.L^{-1} de AIA **g)**; Desarrollo de raíces de *M. haageana* en tratamiento testigo **h)**, 0.5 mg.L^{-1} de AIA **i)** y 1.0 mg.L^{-1} de AIA **j)**. Formación de brotes a las 16 semanas. Enraizamiento a las 6 semanas. Barra= 5 mm.

4.4. DISCUSIÓN

En la mayoría de los casos la obtención de brotes se ha dado a partir de la activación de areolas presentes en explantes de diversas regiones de la planta (Ramírez et al., 2007; Soria, López y Olguín, 2012; Téllez et al., 2017). En este sentido, los resultados de este trabajo señalan que sin importar el tipo de explante, bajo las dosis de RCV evaluadas el principal tipo de respuesta fue de tipo organogénico y se dio a partir de la tercera y cuarta semana en ambas especies, a diferencia de lo reportado para otras cactáceas cuyo inicio de

formación de primordios llegó a ser de 84 días (Pérez, Pérez, Dávila y Villalobos, 2002). La respuesta de tipo callogénico fue de entre el 5 y 9 %, ligeramente menor al 15% reportado para otras cactáceas propagadas en medios de cultivo suplementados con ácido 1-naftalacético (Pérez et al., 2002).

Bajo las mismas dosis de RCV (1:1) los explantes intermedio de *M. albilanata*) y basal de *M. haageana* promovieron el mayor número de brotes, evidenciando la importancia en la elección del explante y su interacción con dosis de RCV suplementadas en medios de cultivo. La presencia o ausencia de BA y AIA promovieron un desarrollo diferencial de brotes que fue más evidente en los explantes de *M. albilanata*, en cambio para *M. haageana* hubo casos en los que el incremento de la relación de RCV no presentó diferencias estadísticas. Estas respuestas diferenciales podrían estar ligadas directamente a la presencia endógena de fitohormonas en cada tipo de explante que al someterse a la suplementación con auxinas y citocininas exógenas presentan una modulación diferencial de la expresión genética que promueve la organogénesis (Pernisová et al., 2009; Su, Liu y Zhang, 2011).

En trabajos reportados para este tipo de especies, no se presenta la segmentación de explantes que contemplen la región intermedia, sino solo la basal, apical y regiones laterales (Soria et al., 2012; Retes, Valadez, Pérez y Pérez, 2007). No obstante, al confrontar los resultados obtenidos con aquellos donde se compara la respuesta basal y apical, hemos observado que nuestros resultados contrastan con lo señalado para especies como *M. mathildae* donde el explante apical generó aproximadamente el doble de brotes en comparación con el explante basal en ausencia de BA y AIA y cuando estos estuvieron presentes en múltiples combinaciones, no hubo formación de brotes (García y Malda, 2010).

Por otra parte, el número de brotes generados a partir de los explantes con mejor respuesta para las dos especies [(7.40) para *M. albilanata* y (9.63) para *M.*

haageana] fue superior a lo reportado para *M. haageana* con 7.4 brotes en promedio en dosis cercanas a 3.0 mg.L^{-1} de BA (Pérez, Santos, Ramírez y Ochoa, 2015), así como lo señalado por Ramírez y Salazar (2016) para *M. geminispina* (1.6), *M. magnimamma* (1.6), *M. marcosii* (1.6), *M. mercadensis* (1.1) y *M. petterssonii* (1.7), y *M. mathildae* con un promedio de 4.09 en rangos similares (García y Malda, 2010). Los mayores tamaños de brotes se generaron en aquellos explantes y tratamientos donde el número de brotes fue reducido, en cambio donde hubo una alta proliferación de brotes su tamaño fue variable y extremo. Este tipo de resultado si bien no es reportado por algún autor en especies de este género, resulta de suma importancia de acuerdo al esquema de micropropagación que se pretenda llevar a cabo, de tal manera que se puede subcultivar un explante en medios suplementados con RCV a medios sin tales sustancias a fin de incrementar el desarrollo de los brotes, o bien individualizando los brotes generados por tamaños, asegurando una micropropagación continua en diferentes etapas de desarrollo.

En cuanto al enraizamiento Téllez et al. (2017) señalan que para *M. plumosa* la generación de raíces tuvo lugar en medios MS sin la presencia de auxinas luego de un período de incubación de 90 días. Por su parte Quiala et al. (2009) señalan que aún en medios MS reducidos al 50% y sin auxinas es posible promover la rizogénesis en cactáceas. En este sentido, la formación de raíces se pudo observar claramente a los 30 días de incubación, tanto en medios de cultivo con y sin auxinas, sin embargo, aquellos que contenían AIA presentaron una mayor eficiencia en el enraizamiento (cuadro 3). Estos resultados fueron superiores a lo reportado para el enraizamiento en medios suplementados con 0.5 mg.L^{-1} de AIA o AIB en *M. carmenae*, *M. herrerae* y *M. theresae* con tasas de respuesta de 67.2, 59 y 54.8% respectivamente (Retes et al., 2007).

La adición de 1.0 mg.L^{-1} AIA al medio MS supuso un mayor crecimiento de las raíces en ambas especies y al mismo tiempo incrementó el desarrollo de raíces secundarias, generándose una mayor biomasa en comparación con lo obtenido

en los otros tratamientos. Esto supone un desarrollo de raíces vigorosas y abundantes lo cual constituye uno de los factores fundamentales en el proceso de transferencia de la planta a condiciones *ex vitro* para su aclimatación, tal y como señalan Nath, Teixeira y Talukdar (2006). Los resultados al respecto de esto último mostraron una tasa de sobrevivencia del 100 % de las plantas enraizadas bajo medios suplementados con AIA, y aunque en este caso no se registraron otro tipo de variables, las plantas provenientes del tratamiento con 1.0 mg.L⁻¹ mostraron un mejor desarrollo aun cuando los riegos fueron reducidos.

4.5. CONCLUSIONES

Se puede concluir de modo general que la micropropagación de *M.albilanata* y *M.haageana* fue mejor cuando se emplearon explantes de tipo intermedio y basal respectivamente inoculados en medios de cultivo con dosis en relación 1:1 de BA y AIA. Los brotes obtenidos de esta forma respondieron mejor al tratamiento de enraizamiento con 1.0 mg.L⁻¹ de AIA y la sobrevivencia de las plantas generadas confirma que los protocolos obtenidos fueron eficientes. Con esta información, a nivel de cultivo de tejidos se contribuye a la propagación y conservación (*in vitro* y/o *ex situ*) de estas especies mexicanas, que si bien no presentan niveles altos de vulnerabilidad, la presión en sus ambientes de distribución y el saqueo de las mismas podría derivar en un riesgo mayor para la sobrevivencia de las mismas.

4.6. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado. A la M.C.H. Julieta Rodríguez Licona y al L.H. David De la Rosa por su aporte de material vegetal para la realización de esta investigación.

4.7. LITERATURA CITADA

- Barthlott, W., Burstedde, K., Geffert, J.L., Ibisch, P.L., Korotkova, N., Miebach, A., Rafiqpoor, M.D., Stein, A. y Mutke, J. (2015). Biogeography and Biodiversity of Cacti. *Schumannia* 7. 205 pg.
- Edwards, E. J., Nyffeler, R. y Donoghue, M. J. (2005). Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form, *American Journal of Botany* , vol. 92 (pg. 1177-1188).
- García, R. O. y Malda, B. G. (2010). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *Hortscience* 45:934–938
- Goettsch, B. et al. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*.
- Hunt, D. (2016). CITES Cactaceae Checklist. 3rd Edition. Royal Botanic Gardens & International Organization for Succulent Plant Study, Kew, 174 pp.
- IUCN (2018). Red list of threatened species version 2018-1.
- Jiménez, F. A. y Jiménez, S. C. (2007). Uso y manejo de las cactáceas en la reserva de la biosfera barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*. 7:78-85.
- Kulus, D. (2015). Selected aspects of ornamental plants micropropagation in Poland and worldwide. *Nauki Przyrodnicze* 4:10–25.
- Lázaro, C. J. O., Mata, R. M., González, D., Arias, S. y Reverchon, F. (2018). *In vitro* propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.
- Lema, R. J. y Kulus D. (2014). Micropropagation of Cacti-a review. *Haseltonia*.19:46–63.
- Minitab 18 Statistical Software (2018). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nath, H., Budhindra, Teixeira da Silva, J. y Talukdar, A. (2006). Effective Acclimatization of *in vitro* Cultured Plants: Methods, Physiology and Genetics.
- Pérez, M. B. E., Pérez, R. M., Dávila, F. C. y Villalobos, A. E. (2002). *In Vitro* Propagation of Three Species of Columnar Cacti from the Sonoran Desert, *HortScience HortSci*, 37(4), 693-696.

- Pérez, M. B. E., Santos, D. M. S., Ramírez, M. R. y Ochoa, A. N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, 72(6), 540-561.
- Pernisová, M. et al. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 2009;106:3609–3614
- Quijala, E., Matos, J., Montalvo, G., De Feria, M., Chávez, M., Capote, A., Pérez, N., Barbón, R. y Kowalski, B. (2009). *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 11:18-25.
- Ramírez, M. R., Aguilar, R. I., Borodanenko, A., Pérez, M. L., Barrera, G. J., Nuñez, P. H., Ochoa, A. N. (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Plant* 43:660–665.
- Ramírez, M. R. y Salazar, S. E. (2016). Propagación y conservación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 26 (2), 78-82.
- Retes, P. J. L., Valadez, A. M. D. L., Pérez, R. M. E. y Pérez, M. B. E. (2007). Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Botanical Sciences*, 81
- SEMARNAT. (2010). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF).
- Soria, C. D., López, E. A. L. y Olguín, S. L. P. (2013). Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* *schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas.16
- Su, Y. H., Liu, Y. B., y Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616–625. doi:10.1093/mp/ssr007
- Téllez, R. J., López, P. M. C. G., Hernández, M. E., Estrada, L. A. A., Zavaleta, M. H. A. y Livera, M. M. (2017). Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 863-876.
- Torres, W., Méndez, M., Dorantes, A. y Durán R. (2010). Estructura, composición y diversidad del matorral de duna costera en el litoral yucateco. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 86:37-51.
- Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559–902.

**5. CONSERVACIÓN *in vitro* DE *Mammillaria haageana* EN MEDIOS DE
MÍNIMO CRECIMIENTO**

CONSERVACIÓN *in vitro* DE *Mammillaria haageana* EN MEDIOS DE MÍNIMO CRECIMIENTO

RESUMEN

Mammillaria haageana es una especie endémica de México que actualmente se encuentra listada bajo la categoría “Protección especial” en la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la sobre explotación del recurso y deterioro de sus ambientes de distribución natural. En la búsqueda de una alternativa para la conservación de este recurso, se exploraron las condiciones de conservación de brotes *in vitro* bajo medios MS suplementados con manitol, sacarosa y sorbitol en dosis de 30, 45 y 60 g.L⁻¹ incubados a 4 y 25°C con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, número de brotes, presencia de raíz, así como la tasa de crecimiento relativo (RGR) para la variable biomasa. Los resultados indicaron que la adición de manitol en dosis de 45 g.L⁻¹ y la incubación a 25°C ralentizan el crecimiento vegetal de los explantes, sin afectar su capacidad organogénica luego de 8 meses de conservación, pudiéndose considerar como un medio de mínimo crecimiento efectivo para la conservación a corto plazo de esta especie.

Palabras clave: manitol, micropropagación, organogénesis, osmolito, sorbitol

Tesis de Doctorado en Ciencias, Doctorado en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Ramírez González
Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O.

***In vitro* CONSERVATION OF *Mammillaria haageana* IN MINIMAL GROWTH MEDIA⁸**

ABSTRACT

Mammillaria haageana is an endemic species of Mexico that is currently listed under the category "Special Protection" in NOM-059-SEMARNAT-2010, due to over-exploitation of the resource and deterioration of its natural distribution environments. In the search of an alternative for the conservation of this resource, the conditions of conservation of shoots *in vitro* were explored under MS media supplemented with mannitol, sucrose and sorbitol in doses of 30.45 and 60 gL⁻¹ incubated at 4 and 25 ° C with a photoperiod of 16 light hours and 8 dark. The percentage of survival, number of shoots, presence of root, as well as the relative growth rate (RGR) for the biomass variable were evaluated. The results indicated that the addition of mannitol in doses of 45 gL⁻¹ and the incubation at 25 ° C slow down the plant growth of the explants, without affecting their organogenic capacity after 8 months of conservation, and can be considered as a means of minimum growth effective for the short-term conservation of this species.

Keywords: mannitol, micropropagation, organogenesis, osmolite, sorbitol

⁸ Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

5.1. INTRODUCCIÓN

Existen especies que por sus características biológicas, zonas de distribución restringidas, usos tradicionales y/o comercialización, son más susceptibles a desaparecer (Martínez, Sosa y Noguera, 2014). Muchos miembros de la familia *Cactaceae* se encuentran en esta situación, tal y como sucede con especies como *Mammillaria haageana*.

Se distribuye naturalmente en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Hernández y Gómez, 2015), esta cactácea ha sido constantemente extraída de manera ilegal para su comercialización como planta de ornato. Esta situación ha impactado negativamente en el tamaño de sus poblaciones naturales a tal grado de ser considerada desde hace años bajo la categoría de riesgo “Protección especial” dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010) y como “Least Concern” en la Red List of Threatened Species de la International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources, con una tendencia poblacional en disminución (IUCN, 2018).

Si bien existen leyes de protección y programas de conservación *in situ* para este tipo de especies, la vigencia de dicha categorización advierte que tales medidas no han sido suficientes, por lo cual, deben considerarse otras alternativas que permitan conservar este recurso.

Dentro de estas alternativas, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se ha constituido como una gran herramienta en la conformación de protocolos de propagación masiva de plantas, que a su vez pueden ser destinadas a esquemas de conservación *ex situ* o *in situ* (Ramírez et al., 2007; García y Malda, 2010; Soria, López y Olguín, 2013; Téllez et al., 2017). De igual manera a nivel *in vitro*, existen trabajos dirigidos a la conservación de recursos genéticos a corto, mediano y largo plazo, aplicado a semillas, fragmentos nodales, botones florales, meristemos apicales y embriones somáticos (Kaviani, 2011; Cruz, González y Engelmann, 2013; Ojo, Veena y Tapan, 2018). Una de las principales ventajas de este tipo de conservación es el almacenamiento del germoplasma en grandes

cantidades en espacios reducidos; bajo condiciones totalmente controladas se garantiza la disponibilidad de material vegetal sano en todo momento. De este modo un recurso amenazado podría ser conservado y al mismo tiempo servir de material parental para micropropagar ejemplares que pudieran destinarse a programas de reintroducción en la naturaleza, conservación en parques y/o jardines botánicos o bien, comercializarlos bajo el cumplimiento de leyes y normas regulatorias.

El método de mínimo crecimiento empleado en la conservación a corto plazo es el que mejor se ajusta a la conservación de plantas que además de su importancia como recurso genético presentan un potencial de uso ornamental (Benelli, Ozudogru, Lambardi, y Dradi, 2012).

Bajo este método se han desarrollado protocolos para la conservación de especies amenazadas como *Splachnum ampullaceum* (Mallón, Barros, Luzardo y González, 2007), *Ramonda serbica*, *Ramonda nathaliae* (Gashi, Abdullai, Sota y Kongjika, 2015) y *Dianthus ingoldbyi* (Silva, Ozudogru, Reis y Lambardi, 2018) por mencionar algunas. Mediante la reducción de nutrientes, la adición de agentes osmóticos, modificaciones en las condiciones de luz y temperatura durante el almacenamiento, es posible ralentizar el crecimiento de una planta sin que ello afecte su desarrollo posterior toda vez que estas condiciones vuelven a ser óptimas para la especie (García, De Fera y Acosta, 2007).

En cactáceas se han desarrollado un gran número de protocolos de micropropagación *in vitro*, sin embargo, los trabajos dirigidos a la conservación mediante métodos de crecimiento mínimo son escasos, siendo los más destacados los reportados para 16 especies del género *Turbinocarpus* (Balch, Pérez, Reyes y De La Rosa, 2012).

Ante este panorama, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de conservación a corto plazo que contribuya a los esfuerzos por salvaguardar a la especie *Mammillaria haageana*.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como fuente de explantes se seleccionaron brotes sin raíz de dos meses de edad con características uniformes respecto a tamaño y vigor. Estos brotes fueron obtenidos a partir de plantas clonadas bajo condiciones *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100%, suplementado con 1mg.L^{-1} de benciladenina y 1mg.L^{-1} de ácido 3-indol acético.

Tratamientos de mínimo crecimiento

Los medios de cultivo se elaboraron a partir de sales inorgánicas MS al 20 % suplementadas con 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, 40 mg.L^{-1} y 3.5 g.L^{-1} de Gelrite Gellan Gum (Sigma®) previamente ajustados a un pH de 5.7 ± 0.1 . (30, 45 y 60 g.L^{-1}). Se evaluaron un total de 9 tratamientos con diferentes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol (Sigma®) en concentraciones del orden de 30, 45 y 60 g.L^{-1} . Los medios fueron esterilizados a una presión de 1.5 kg cm^{-2} y una temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un período de 15 minutos. La siembra se realizó en frascos con capacidad de 250 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo. Los explantes fueron sembrados en cada uno de los tratamientos hasta completar un total de 12 repeticiones, registrándose como dato inicial la biomasa de cada brote. La incubación se realizó bajo fotoperíodo de 16/8h luz-oscuridad, con una intensidad lumínica de $30\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ y dos temperaturas (4 y $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante un período de 8 meses (245 días).

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicado bajo un diseño completamente al azar. Se registró el porcentaje de sobrevivencia, número de brotes y presencia/ausencia de raíz. Para calcular la tasa de crecimiento relativo (RGR por sus siglas en inglés) se aplicó la fórmula propuesta por Hoffmann y Poorter

(2002): $RGR = \ln W_2 - \ln W_1 / (t_2 - t_1)$ donde; $\ln$ = logaritmo natural, W_2 = peso final (mg), W_1 = peso inicial (mg), t_2 = tiempo final en días (d) y t_0 = tiempo inicial en días (d). Posteriormente estos datos se sometieron a un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), mediante el software estadístico Minitab® v.18 (Minitab, State College, PA, USA).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A nivel de efectos principales se observó que tanto la temperatura como el tipo y concentración del osmolito generaron cambios significativos en los porcentajes de sobrevivencia de los brotes sembrados (Figura 7). La interacción de ambos factores pasó de ser positiva cuando cambió el nivel del factor temperatura a negativa cuando este factor se mantuvo fijo y se modificó el nivel de concentración del osmolito.

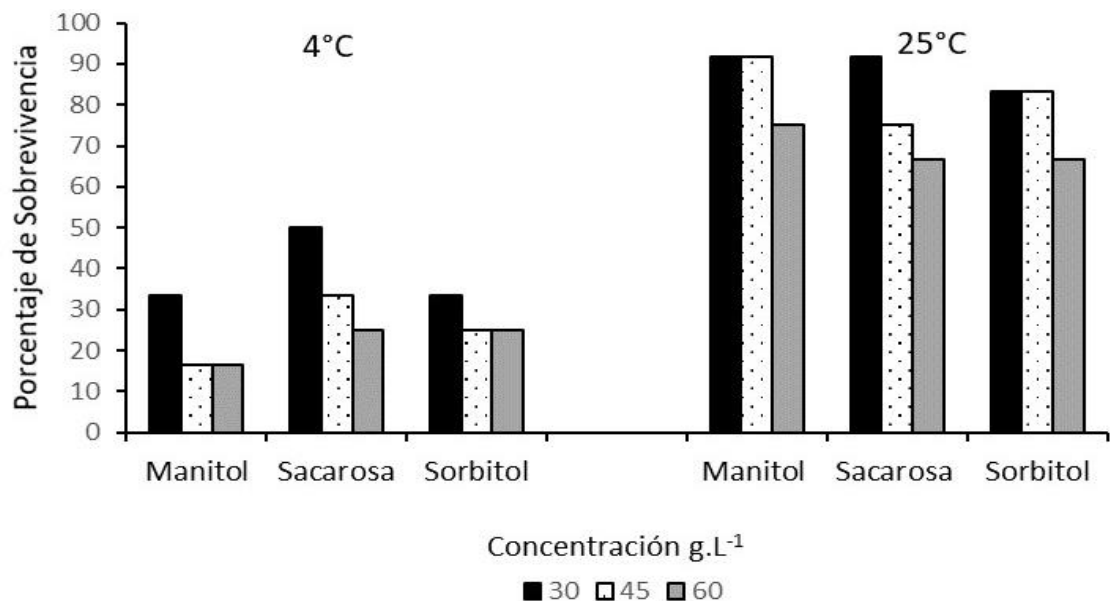


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia luego de 245 días de incubación.

La presencia de brotes solo se manifestó en el tratamiento control (sacarosa 30g.L⁻¹) aunque fue mínima, generándose un máximo de 2 brotes muy pequeños en algunas de las repeticiones. Por otro lado la presencia de raíces fue baja en los brotes incubados a 4 °C, observándose promedios de enraizamiento de 33.3 % . De igual manera en la incubación a 25°C se presentaron porcentajes de entre el 41.6 al % 75% en los tratamientos con sacarosa y sorbitol (30 g.L⁻¹) y manitol (30 y 45 g.L⁻¹), aunque los tamaños de las mismas apenas alcanzaron un máximo de 5 mm (Figura 8).

Tasa de crecimiento relativo

La incorporación de dosis elevadas de los osmolitos evaluados ralentizó significativamente el incremento de biomasa en los brotes incubados. Solo en el caso de los tratamientos con sacarosa a 30 g.L⁻¹ se registraron los valores de RGR más elevados en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 4). Por otro lado , los tratamientos con manitol (45 y 60 g.L⁻¹) mostraron diferencias significativas respecto a los valores de RGR generados bajo las mismas dosis con sacarosa y sorbitol cuando su incubación se realizó a 25°C.

Cuadro 4.Tasa de crecimiento relativo (RGR) en mg. d-1 después de 245 días de incubación.

Osmolito	Temperatura °C	Concentración g.L ⁻¹		
		30	45	60
Manitol	4	0.0018 b	0.0011 a	0.0009 a
Sacarosa	4	0.0031 a	0.0009 a	0.0010 a
Sorbitol	4	0.0018 b	0.0010 a	0.0008 a
Manitol	25	0.0026 b	0.0020 b	0.0018 b
Sacarosa	25	0.0078 a	0.0038 a	0.0030 a
Sorbitol	25	0.0025 b	0.0023 c	0.0023 c

* letras diferentes señalan diferencias estadísticas

La incubación en 4°C indujo una disminución en la RGR en comparación con lo que ocurrió cuando la incubación se realizó a una temperatura de 25° C , sin embargo los porcentajes de sobrevivencia bajo esta temperatura fueron muy bajos, además de que aquellos brotes que sobrevivieron presentaron características menos vigorosas (Figura 8A-C) comparadas con la incubación a 25°C (Figura 8D-F). El valor de RGR en el tratamiento con sacarosa (30g.L⁻¹) a 25°C fue 3.00 y 3.25 veces elevado que lo observado en el tratamiento con manitol y sorbitol en el mismo nivel. El incremento en biomasa en este tratamiento fue de 354.5% respecto a su biomasa inicial, dicho valor se encuentra en los rangos de crecimiento reportados para cactáceas del género *Turbinicarpus* en medios de mínimo crecimiento, donde se presentaron tasas de incremento en biomasa de entre el 164% para *T. schmidickeanus* y 3520% para *T. hoferi* bajo el tratamiento control: 30 g.L⁻¹ de sacarosa e incubación a 25± 2°C (Balch, Pérez y De La Rosa, 2012).

Por otro lado los tratamientos con manitol presentaron los valores de RGR más bajos tanto en concentraciones de 45 g.L⁻¹, sin embargo al aumentar la concentración a 60 g.L⁻¹ aunque el valor de RGR fue menor también lo fue el vigor y sobrevivencia de los brotes (Figura 8G-H).

El efecto osmótico del manitol a 45 g.L⁻¹ generó incrementos de biomasa de 170%, este valor también se encontró dentro del rango reportado por Balch et al. (2012) para 16 especies del género *Turbinicarpus*, donde los valores oscilaron entre el 120 a 700% aproximadamente cuando se empleó manitol, aunque en este caso la concentración fue a 30 g.L⁻¹ pero con una temperatura de incubación similar (25°C).

Respecto al sorbitol solo a la concentración de 30 g.L⁻¹ se comportó de manera similar al manitol presentando incrementos en biomasa de 165% pero con un valor de RGR que estadísticamente no fue diferente a lo obtenido con manitol a la misma concentración. En las concentraciones restantes los valores de RGR fue menor que lo que se obtuvo con sacarosa pero superiores a lo generado por

el efecto osmótico del manitol. Balch et al. (2012) reportaron que el efecto osmótico de sorbitol y la incubación a 25°C fue ligeramente inferior al efecto del manitol en 12 de las 16 especies de *Turbinicarpus* conservadas bajo medios de mínimo crecimiento, generando valores más altos de RGR.

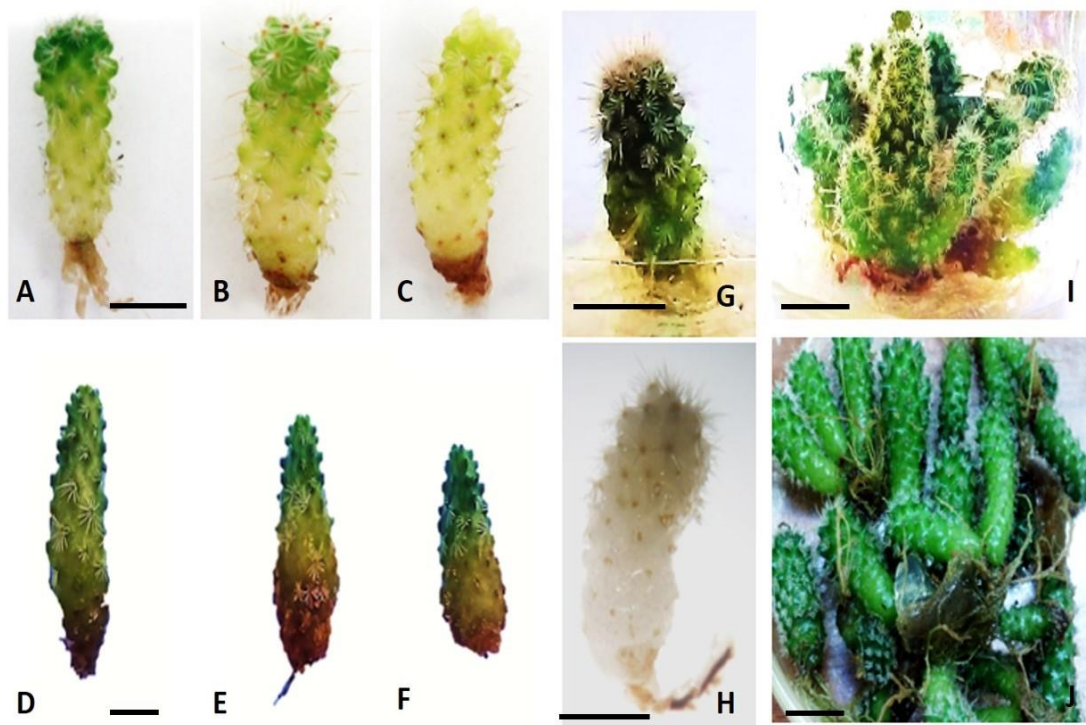


Figura 8. Incubación a 4 °C con A) Sacarosa, B) Manitol y C) Sorbitol con 30 g.L⁻¹. Incubación a 25 °C con D) Sacarosa, E) Manitol y F) Sorbitol con 30 g.L⁻¹; G) Incubación a 25 °C y H) 4° C con Manitol a 45 g.L⁻¹; I). Recuperación y multiplicación de los brotes. Tamaño de barra = 5 mm

Los brotes del tratamiento con manitol (45 g.L⁻¹) se recuperaron y sembraron en medio MS al 100% con 1.0 mg.L⁻¹ de BA y 1.0 mg.L⁻¹ de AIA (Figura 8.I), observándose una alta respuesta en la formación de brotes, indicador de que no existió alteración en la capacidad organogénica del explante, posteriormente estos se enraizaron en medio MS al 50% con 1.0 mg.L⁻¹ de AIA.

5.4. CONCLUSIONES

La concentración de 45 g.L⁻¹ y la incubación a 25° C fueron la combinación optima de los factores osmolito-temperatura debido a que bajo estas condiciones se presentaron los valores más bajos de RGR y al mismo tiempo valores altos de sobrevivencia de explantes (91.6%). En este medio la generación de nuevos brotes fue despreciable durante el período de incubación (245 días), sin embargo una vez recuperados y cultivados en medios MS con reguladores de crecimiento vegetal, la respuesta organogénica evidenció la eficacia del tratamiento como medio de mínimo crecimiento y como estrategia de conservación a corto plazo .

5.5. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado. A la M.C.H. Julieta Rodríguez Licona y al L.H. David De la Rosa por su aporte de material vegetal para la realización de esta investigación.

5.6. LITERATURA CITADA

- Benelli, C., Ozudogru, E.A., Lambardi, M. y Dradi, G. (2012). *In vitro* conservation of ornamental plants by slow growth storage. *Acta Hort.* 961, 89-93.
- Balch, E., Pérez, R. M. E. y De La Rosa, C. Ma. (2012). *In Vitro* Conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) Under Slow Growth Conditions. *Haseltonia*. 17. 10.2985/1070-0048-17.1.6.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM059-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. Diario Oficial de la Federación. (Segunda sección). 30 de diciembre de 2010. 70 p.
- Cruz, C. C.A., González, A. M.T. y Engelmann, F. (2013). Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*, 2, 73-95.
- García, A., Leyanis, D. F., M. y Acosta, K.(2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, [S.I.], v. 7, n. 2.
- García, R. O. y Malda, B.G. (2010). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *Hortscience* 45:934–938.
- Gashi, B., Abdullai, K., Sota, V. y Kongjika, E. (2015). Micropropagation and in vitro conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 21(1), 123–136.
- Hernández, M. H. M. y C. Gómez, H. (2015). Mapping the cacti of Mexico. Part II *Mammillaria*. *Succ. Pl. Res.* 9: 1–189.
- Hoffmann, W. A. y Poorter, H. (2002). "Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate". *Annals of Botany*. **90** (1): 37–42.
- IUCN (2018). Red list of threatened species version 2018-1.
- Kaviani, B. (2011). Conservation of Plant Genetic Resources by Cryopreservation *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 5, No. 6: 778-800.
- Mallón, R., Barros, P., Luzardo, A. y González, M.L.(2007) Encapsulation of moss buds: an efficient method for the *in vitro* conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.88, p. 41–497.
- Martínez, M. E., Sosa, E. J. E. y Noguera, F. A. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(Suplemento).

- Minitab 18 Statistical Software (2018). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc.
- Ojo, M. O., Veena, P. y Tapan, K. N. (2018). A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 7(07): 3778-3786
- Ramírez, M. R., Aguilar, R. I., Borodanenko, A., Pérez, M. L., Barrera, G. J., Nuñez, P. H., Ochoa, A. N. (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Plant* 43:660–665.
- Silva, D. P. C., Ozudogru, E. A., R., Valquíria, D. y Lambardi, M. (2018). *In vitro* conservation of ornamental plants (1). *Ornamental Horticulture*, 24(1), 28-33.
- Soria, C. D., López, E. A. L. y Olguín, S. L. P.(2013). Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* *schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*.16
- Téllez, R. J., López, P. M. C. G., Hernández, M. E., Estrada, L. A. A., Zavaleta, M. H. A. y Livera, M. M. (2017). Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 863-876.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Las técnicas de cultivo *in vitro*, medios de cultivo y tratamientos de incubación empleados en los tres experimentos mejoraron significativamente la propagación de las especies de estudio en comparación con lo que se obtuvo de manera *ex vitro* y con algunos de los trabajos reportados para especies del mismo género.

Las variables evaluadas en la germinación fueron en todos los casos superiores cuando el método de germinación se realizó de manera *in vitro*. Los porcentajes de germinación superaron en la mayoría de los casos el 90% en medios de cultivo básicos, sin necesidad de aplicar tratamientos pregerminativos (como la escarificación) o la adición de sustancias estimuladoras de la misma como la giberelina (Amador, Díaz, Loza y Bivián, 2013). La velocidad de germinación también aumentó, mientras que el número de días para obtener la germinación media se acortó. Cuando las plantas fueron subcultivadas en medios con una mayor aporte de carbohidratos en medios ligeramente gelificados se observó un incremento en la tasa de crecimiento en comparación con las plantas que se conservaron en el sustrato donde habían germinado.

La importancia de estos resultados radican en el hecho de que mediante la aplicación del protocolo resultante se podrían obtener plantas vigorosas y de mayor biomasa en un menor tiempo. En teoría estas plantas tendrían una mayor capacidad de adaptación y sobrevivencia en campo y podrían utilizarse para programas de reintroducción.

En dos de las especies estudiadas (*M. albinalana* y *M. haageana*) se observó una respuesta organogénica de tipo diferencial dependiendo del tipo de explante sembrado. Este sin embargo, aumentó o disminuyó su respuesta en formación de nuevos brotes cuando interactuó con dosis de reguladores de crecimiento vegetal. La respuesta promedio en formación de brotes para *M. haageana* (9.63) fue superior a los promedios reportados por Pérez, Santos, Ramírez y Ochoa (2015) con un total de 7.4 brotes en medios con dosis cercanas a 3.0 mg.L⁻¹ de BA.

Determinar qué tipo de explante y bajo que dosis se potencializa la mayor formación de brotes y posteriormente su individualización para generar nuevas plantas podría ser de gran utilidad en la producción masiva de plantas con fines de comercialización ornamental, siempre y cuando se cumplan con los requerimientos legales del aprovechamiento de este tipo de especies, sin impactar negativamente a las poblaciones silvestres como consecuencia del saqueo y sobreexplotación clandestina.

Finalmente, la conservación del tejido vegetal explorado para la especie *M. haageana* bajo la concentración de 45 g.L⁻¹ y 25°C suma a los escasos trabajos de conservación *in vitro* reportados para cactáceas. Balch, Pérez y De La Rosa (2012) coinciden en el empleo de sustancia tales como el manitol y el sorbitol para ralentizar el crecimiento vegetal y con ello establecer estrategias de conservación *in vitro* a corto plazo para este tipo de recursos.

7. CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en cada uno de los experimentos realizados en este trabajo de investigación, dan cuenta de la importancia que el cultivo de tejidos vegetales tiene sobre la propagación y conservación de especies amenazadas, en este caso cactáceas del género *Mammillaria*.

Mediante las técnicas aplicadas en cada experimento se cumplió con el objetivo general de obtener protocolos que si bien, de manera aislada aportan al conocimiento de la comunidad científica respecto a los trabajos de manejo *in vitro*, de manera conjunta pueden considerarse dentro de un esquema altamente eficaz para conservar un grupo de especies que además de estar en constante riesgo, también son altamente demandadas en el comercio de plantas de uso ornamental.