

1-1-2013

Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo

Daniela Soria-Campos
Universidad Veracruzana

Ana Laura López-Escamilla
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, lopeza@uaeh.edu.mx

Laura Patricia Olguín-Santos
Universidad Nacional Autónoma de Mexico

Follow this and additional works at: <http://digitalcommons.unl.edu/hidalgo>

 Part of the [Zoology Commons](#)

Soria-Campos, Daniela; López-Escamilla, Ana Laura; and Olguín-Santos, Laura Patricia, "Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo" (2013). *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. Paper 16.
<http://digitalcommons.unl.edu/hidalgo/16>

This Article is brought to you for free and open access by the Parasitology, Harold W. Manter Laboratory of at DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln. It has been accepted for inclusion in Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas by an authorized administrator of DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln.

Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo

Daniela Soria-Campos, Ana Laura López-Escamilla, y Laura Patricia Olgún-Santos

Resumen

Se reporta por primera vez la micropropagación de la subespecie *Mammillaria schiedeana schiedeana*, cactácea mexicana considerada como amenazada de extinción por la Norma Oficial Mexicana. Se obtuvo la formación de brotes por activación areolar utilizando explantes longitudinales procedentes de brotes regenerados de un ciclo previo de cultivo y a partir de plántulas germinadas *in vitro* los cuales se sembraron en medio basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con 6-bencilaminopurina (BA) y ácido α -naftalenacético (ANA) a diferentes concentraciones. La producción de brotes en el medio de proliferación se evaluó después de dos meses. La mejor concentración para la formación de brotes fue de 2.2/0.53 μ M (0.5/0.1 mg l⁻¹) a partir de plántulas germinadas *in vitro* y de 4.4/0.53 μ M (1/0.1 mg l⁻¹) para los brotes previamente regenerados. Después de dos a tres meses, los brotes se individualizaron y subcultivaron a medio MS al 50% de sus componentes adicionado con carbón activado 1 g l⁻¹ para inducir el enraizamiento. La sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro* fue del 83% después de cuatro meses de su transferencia a suelo.

Palabras clave: Cactaceae, *Mammillaria schiedeana schiedeana*, activación areolar, micropropagación, cultivo de tejidos

Introducción

El género *Mammillaria* es el más grande de la familia Cactaceae, constituye uno de los grupos de cactáceas más populares. La mayoría de las especies de este género tienen su centro de diversidad genética en México, creciendo desde la costa hasta las montañas, generalmente no pasando los 3000 m de altitud (Rubluo, 1997). La mayoría de las especies se distribuyen en los desiertos de Sonora y Chihuahua (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Hernández y Godínez, 1994). La subespecie *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Fig. 1) comúnmente llamada "Biznaga de Metztitlán", es endémica del estado de Hidalgo, México y presenta una distribución geográfica muy restringida. Es una planta pequeña, con

tallos solitarios o cespitosos de 2.5 a 10 cm de alto y 2 a 4 cm de diámetro; por su forma y el color dorado de sus espinas es una planta muy preciada por los coleccionistas por su alto valor ornamental. En México está incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, como especie amenazada de extinción (NOM, 2010). Debido a su lento crecimiento, escasa producción de semillas y baja tasa de germinación es un candidato para ser propagada por cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de tejidos vegetales es una estrategia de conservación *ex situ* y tiene el potencial de producir muchas plantas en un corto tiempo y mantenerlas en un espacio reducido, la técnica ha resultado exitosa en varios miembros de la familia Cactaceae (Machado y Prioli, 1996; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Villavicencio



Figura 1. Plantas de *Mammillaria schiedeana schiedeana* en su hábitat natural. Barra = 1 cm.

et al., 1999; Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000; Mata *et al.*, 2001; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002). En donde se ha reportado que en condiciones *in vitro* los brotes crecen más rápido y producen un número considerable de regenerantes.

La propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas ya se ha realizado en diversos géneros como: *Mammillaria san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992), *Lophophora williamsii* (Ortiz-Montiel y Alcántara-García, 1997), *Cephalocereus senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000; Choreño-Tapia, 2002), *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001), *M. elongata* (Papafofiou *et al.*, 2001), *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *P. aselliformis* (Santos-Díaz *et al.*, 2003). El presente trabajo describe por primera vez, el sistema de propagación *in vitro* de *M. schiedeana schiedeana* permitiendo su reproducción clonal en un corto tiempo y su establecimiento exitoso en condiciones *ex vitro* como una alternativa para su conservación.

Material y Métodos

Material vegetal: Semillas de *M. schiedeana schiedeana* colectadas en el 2002 y 2004, se sembraron en tres grupos: La primera siembra fue de las semillas colectadas en el 2002 y dos siembras realizadas en diferentes tiempos de las semillas de el 2004. Las semillas se escarificaron por 15 segundos en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), antes del proceso de desinfección; posteriormente se lavaron por 20 minutos en 50 ml de agua destilada con 3 gotas de detergente líquido (Dawn®), y se desinfectaron con

50 ml con alcohol al 70% (v/v) durante 1 min, seguido de 50 ml de una solución de cloro comercial al 20% (v/v) con 3 gotas de Tween 80. En condiciones asépticas las semillas se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada. Se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con la mitad de la concentración de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa, se adicionó carbón activado $1g L^{-1}$, se ajustó el pH a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N y se solidificó con $10 g L^{-1}$ de agar (Bioxon®); se esterilizó en una autoclave a $108 kPa^2$ y $121^\circ C$ durante 18 min. Los cultivos fueron incubados, así como los subsecuentes experimentos, a $25 \pm 2^\circ C$, fotoperiodo de 16/8-h luz/obscuridad e intensidad luminosa de $54 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Debido al bajo porcentaje de germinación, algunas plántulas se sometieron a un ciclo preliminar de propagación *in vitro*, para ello, secciones longitudinales del tallo (explantes) se sembraron en medio MS, pH 5.7, $30 g L^{-1}$ de sacarosa y $8 g L^{-1}$ agar (Bioxon®) adicionado con $2.2 \mu M$ ($0.5 mg \cdot l^{-1}$) 6-bencilaminopurina (BA) para producir nuevos brotes y obtener más fuentes de explantes longitudinales.

Proliferación de brotes: Plántulas germinadas *in vitro* y brotes procedentes del ciclo preliminar de multiplicación *in vitro* de 0.3 a 1.3 cm de altura, fueron disectados longitudinalmente (explantes) y se sembraron en medio MS adicionado con 6-bencilaminopurina (BA: 0, 2.2, 4.4 y $8.8 \mu M$) ($0, 0.5, 1.2 mg \cdot l^{-1}$) en combinación con ácido α -naftalenacético (ANA: 0, $0.53 \mu M$) ($0, 0.1 mg \cdot l^{-1}$) (medio de inducción). Se sembró un explante por frasco y se utilizaron 17 explantes por tratamiento. Se empleó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), y una prueba de rango múltiple Toker-Kramer ($P \leq 0.05$), para analizar los datos.

Individualización de los brotes y proliferación de raíces: Después de dos a tres meses, brotes de (1.5-2 cm) se individualizaron y transfirieron a medio MS al 50% de su concentración adicionado con $1 g \cdot L^{-1}$ de carbón activado (medio de maduración) para inducir la elongación y formación de raíces.

Aclimatización y transferencia a suelo: Los brotes enraizados fueron transplantados en contenedores de plástico con tapa, con un mezcla esterilizada de tierra de hoja, tierra negra, tepojal (1:1:1) y mantenidos en el cuarto de incubación para su gradual aclimatización. Después de cuatro meses los brotes fueron transferidos a macetas individuales y se colocaron en un invernadero ($30 \pm 2^\circ C$). El porcentaje de sobrevivencia se determinó cuatro meses después del transplante.

Resultados

Germinación: Los procesos de escarificación y desinfección empleados fueron exitosos ya que las semillas germinaron y no se contaminaron; se consideró como semilla germinada aquella, cuya radícula emergió. La germinación *in vitro* de *M. schiedeana schiedeana* inició entre tercer y sexto día, alcanzando el máximo porcentaje de germinación entre los 26 y 32 días. Los porcentajes de germinación obtenidos para *M. schiedeana schiedeana* están relacionadas con la fecha de colecta y el tiempo que permanecieron almacenadas antes de ser sembradas. Las semillas colectadas en el 2002, las cuales permanecieron almacenadas dos años presentaron 32% de germinación, en comparación con las colectadas en el 2004 y cuyas siembras se realizaron de manera casi inmediata. Los porcentajes obtenidos en las dos siembras de ese año alcanzaron el 76 y 71% respectivamente (Tabla 1). Es evidente que hay un descenso en el porcentaje de germinación de las semillas al transcurrir el tiempo que permanecen almacenadas.

Proliferación de brotes: La formación de los brotes se presentó en todas las combinaciones hormonales de citocinina/auxina ensayadas y fue por activación de las aréolas, tanto en los explantes provenientes de brotes regenerados (72.5%) como de los explantes a partir de plántulas (71%). La combinación BA/ANA 4.4/0.53 μM (1/0.1 mg L^{-1}) fue la mejor para los explantes provenientes de brotes regenerados *in vitro*, con 22.4 brotes en promedio por explante, y las mejores combinaciones para explantes a partir de plántulas fue BA/ANA 2.2/0.53 μM (0.5/0.1 mg L^{-1}), con 6.5 brotes promedio por explante, seguido de BA/ANA 4.4/0.53 μM (1/0.1 mg L^{-1}), con 6.1 brotes promedio por explante.

Los brotes obtenidos se originaron en un periodo de entre cuatro a 18 semanas por activación de los meristemas areolares preexistentes a partir de las aréolas vegetativas, así como de las aréolas flo-

rales; las vegetativas dan origen a las espinas y se ubican en el ápice de los tubérculos, y se evidenció inicialmente por el incremento en el volumen del explante provocando que los tubérculos se separaran entre sí. Después de dos semanas en cultivo, el color del explante y de los tubérculos se transformó de verde oscuro a verde pálido. Así mismo, la base de los tubérculos incrementó su volumen y a las cinco semanas en su ápice comenzaron a desarrollarse estructuras abultadas de forma esférica y de color verde oscuro con espinas en crecimiento, al mismo tiempo se observó el desarrollo de abultamientos rojizos y con pequeñas espinas apenas evidentes en las aréolas florales ubicadas en las axilas de los tubérculos diferenciándose posteriormente en brotes. Después de 11 semanas de incubación todos los explantes de *M. schiedeana schiedeana* desarrollaron brotes diferenciados (Fig. 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que estadísticamente hay diferencias significativas entre tratamientos y el número de brotes promedio obtenidos, tanto para explantes provenientes de brotes regenerados como para explantes de plántulas germinadas (Tabla 2). Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas $P \leq 0.05$.

A pesar de la gran diferencia en el número promedio de brotes obtenidos en cada uno de los tratamientos, se observó que en ambos casos fue necesaria la presencia de las citocininas y auxinas para obtener la mayor producción de brotes por explante.

Elongación de brotes y proliferación de raíces: Durante esta etapa se manifestó la floración *in vitro* en brotes entre cinco a 10 meses de permanecer en el medio de cultivo (Fig. 3). El 80% de los brotes individualizados y sembrados en el medio de maduración formaron raíces de manera espontánea, sin la adición de auxinas.

Tabla 1. Porcentajes de germinación de tres lotes de semillas de *M. schiedeana schiedeana*, sembradas en medio MS 50% con sacarosa 15 g L^{-1} , agar 10 g L^{-1} , y carbón activado 1 g L^{-1} .

Siembra	GT	%	TIG	Gmax	Año
1	16/50	32	6	26	2002
2	36/47	76	3	32	2004
3	34/48	71	3	32	2004

Nota: GT = número de semillas germinadas/total; % = porcentaje de semillas germinadas; TIG = tiempo inicial de germinación (días); Gmax = germinación máxima (días); Año = año de colecta.



Figura 2. Proliferación y maduración de los brotes de *Mammillaria schiedeana schiedeana* Barra = 0.5 cm.

Tabla 2. Número promedio de brotes por explante longitudinal provenientes de plántulas germinadas *in vitro* y de brotes regenerados a partir de un ciclo preliminar *in vitro* de *M. schiedeana schiedeana* cultivados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BA/ANA.

(mg L ⁻¹)		Brotes por explante ($\bar{x} \pm ES$)	
BA	ANA	plántulas germinadas <i>in vitro</i>	brotes regenerados a partir de un ciclo preliminar <i>in vitro</i>
0.0	0.0	1.1 ± 0.3 a	7.3 ± 3.2 a
0.0	0.1	3.0 ± 0.1 c	7.2 ± 1.6 a
0.5	0.0	3.2 ± 0.8 c	12.5 ± 4.8 b
0.5	0.1	6.5 ± 1.4 e	13.0 ± 3.7 b
1.0	0.0	4.1 ± 0.7 d	19.4 ± 5.4 d
1.0	0.1	6.1 ± 1.3 e	22.4 ± 5.8 e
2.0	0.0	3.2 ± 0.9 c	15.2 ± 5.8 c
2.0	0.1	2.7 ± 0.7 b	14.7 ± 6.6 c

Nota: 17 explantes por tratamiento.



Figura 3. Brote *in vitro* de cinco meses de incubación que generó una flor. Barra = 0.25 cm.



Figura 4. Plantas de *M. schiedeana schiedeana* generadas *in vitro* y establecidas en macetas en condiciones de invernadero.

Aclimatización y transferencia a suelo: En *M. schiedeana schiedeana* el proceso de aclimatización resultó favorable, presentándose una mortandad de 56 brotes (16.7 %) de los 335 brotes transferidos a *ex vitro*. La mortandad no estuvo influenciada por la presencia o ausencia de raíces ni por el tamaño de los brotes, ya que del total, el 28% sobrevivió a las condiciones *ex vitro* aún sin presentar raíz al ser transferidas a suelo. Después de permanecer cuatro meses en aclimatización dentro del cuarto de incubación, los brotes enraizados se sembraron en macetas individuales y se colocaron en contenedores con domo de plástico transparente para que continuaran su desarrollo en el invernadero; se observó un incremento en el tamaño del tallo en un 50% después de cuatro meses. Actualmente se tienen en condiciones *ex vitro* 335 brotes con una sobrevivencia del 100% (Fig. 4), de cual el 61% fueron transferidos con la raíz desarrollada. Los brotes regenerados y establecidos en condiciones *ex vitro* cada año han generado flores (Fig. 5).

Discusión

Los porcentajes de germinación obtenidos en *M. schiedeana schiedeana* son similares a los reportados para otras especies como *Ariocarpus retusus* (66%) (Olgún, 1994), *Turbincarpus laui* (42%) (Mata *et al.*, 2001), *M. pectinifera* (23%), *Pelecyphora aselliformis* (46%) y *Escobaria minima* (69%) (Giusti *et al.*, 2002), *Polaskia chichipe* (80%) y *Echinocactus platyacanthus* (88%) (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004), *Cephalocereus senilis* 98% (Tapia, 2006). Los diferentes porcentajes



Figura 5. Planta en floración después de tres meses establecida en el invernadero. Barra = 0.8 cm.

obtenidos varían en función de la especie, viabilidad y el proceso de desinfección utilizado. De manera general no se reporta en los trabajos de propagación *in vitro* el tiempo y las condiciones de almacenamiento que han tenido las semillas previas a su establecimiento en condiciones asépticas. Existen reportes de germinación *ex vitro* de cactáceas que alcanzan elevados porcentajes de germinación a pesar de haber permanecido almacenadas por tiempos prolongados, como lo reporta Fearn en 1977 (citado por Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanez, 2000) en *Ferocactus herrerae* y *F. emory* obtuvo porcentajes de germinación del 80 y 90% respectivamente en semillas con diez años de almacenamiento, desafortunadamente no menciona las condiciones en las que fueron almacenadas.

Los brotes obtenidos de la subespecie *M. schiedeana schiedeana* se originaron en un periodo de entre cuatro a 18 semanas por activación de los meristemas areolares preexistentes, este tiempo fue mayor a los reportados por Vyskot y Jara (1984) al obtener la formación de brotes por activación areolar en un promedio de una o dos semanas de cultivo de *Astrophytum myriostigma*, *M. carmenae*, *M. prolifera* y *Trichocereus spachianus*, pero fue similar a lo reportado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), que obtuvieron la formación de brotes en un promedio de seis a 12 semanas por activación areolar en 21 especies diferentes de cactáceas. La variación en los tiempos de respuesta confirma que todas las especies responden de diferente manera a las fitohormonas empleadas, el tipo de explante utilizado, tamaño del mismo y madurez del tejido (Villavicencio *et al.*, 1999).

La formación de brotes a partir de la activación de los meristemas areolares fue reportada por Dabekaussen *et al.* (1991) en explantes longitudinales de *Sulcorebutia alba*. Estos autores registraron la activación de los meristemas areolares a los tres días de su inoculación *in vitro*.

El desarrollo de brotes a partir de las aréolas florales pueden respaldarse con el hecho que las aréolas de *Mammillaria* son dimórficas y por lo tanto es posible que desarrollen brotes tanto en las aréolas florales ubicadas en las axilas de los tubérculos como en las aréolas vegetativas que dan origen a las espinas (Rubluo, 1997). Este evento también se ha reportado para *M. coahuilensis* al obtener brotes por activación de las aréolas florales (Flores, 2007).

El número promedio por explante (22.4) a partir de brotes regenerados *in vitro* de *M. schiedeana schiedeana* en la combinación BA/ANA 0.5/0.1 mg L⁻¹ es mayor comparado con *M. formosa* (4.42) y *M. obscura*

(4.78) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), pero para los explantes provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, la mejor concentración y combinación hormonal generó 6.5 brotes promedio por explante. Este resultado es mayor en comparación con lo reportado para *M. craigii* (4.65), *M. formosa* (4.42), *M. obscura* (4.78) y *M. uncinata* (5.25) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), *M. oteroi* (5.3) (Castro-Gallo *et al.*, 2002) y *M. pectinifera* (4.38) (Giusti *et al.*, 2002), *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchsoniana*, *M. pectinifera*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, *M. zephyranthoides* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007).

En *M. bocasana*, *M. formosa*, *M. obscura*, *M. sphaelata*, *Cereus peruvianus*, *M. orcutii* se ha obtenido 4.42 hasta 17.50 de brotes promedio por explante respondiendo de manera efectiva a la adición de ambas hormonas (Machado y Prioli, 1996; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007). También se ha observado el desarrollo de brotes empleando solamente citocininas, tal es el caso de *M. candida*, *M. carmenae*, *M. craigii*, *M. herrerae*, *M. oteroi*, *M. theresae*, *M. uncinata*, *Echinofossulocactus sp.*, *Stenocereus coptonogonus*, *Thelocactus hexahedophorus*, *Astrophytum ornatum*, *Pelecyphora strobiliformis* y *Pelecyphora aselliformis*, obteniendo resultados en un intervalo de 4.65 hasta 16.75 de brotes promedio por explante en cada especie (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998, Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Retes-Pruneda *et al.*, 2007). Corroborando el hecho que las citocininas promueven principalmente la brotación de yemas axilares (Davies, 1990; Gaspar *et al.*, 1996) al contrario de las auxinas que principalmente promueven la desdiferenciación de los tejidos (callo) (Gaspar *et al.*, 1996). Sin embargo las respuestas morfogénicas obtenidas para cada especie, además de depender de la combinación y concentración hormonal, estarán influenciadas también por el tipo de explante empleado, la madurez del tejido y las condiciones de cultivo.

La floración *in vitro* que se manifestó en *M. schiedeana schiedeana* es un fenómeno que también se ha reportado para *Coryphanta minima* (Malda *et al.*, 1999) y en la subespecie *Turbinicarpus schmiedickeanus flaviflorus* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). Este fenómeno fisiológico no es común en condiciones *in vitro* y probablemente se deba a una aceleración en la maduración de los tejidos jóvenes y las condiciones ambientales dentro del contenedor.

La adición de auxinas al medio de cultivo para la formación de raíces en *M. schiedeana schiedeana* no fue necesaria como se ha reportado en otras especies como: *M. carmenae* y *M. prolifera*, empleando medio

MS solo o adicionado con ácido indol acético (AIA) 1 mg·L⁻¹ (Vyskot y Jara, 1984); en *Cereus peruvianus* en medio MS + AIA o ANA 1 mg·L⁻¹ se obtuvo la formación de raíces (Machado y Prioli, 1996); así mismo Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), lograron el enraizamiento de 21 especies diferentes en medio MS + AIA o AIB 0.5 y 1 mg·L⁻¹ dependiendo de la especie, por otra parte, el enraizamiento de *M. elongata* se logró en medio MS + AIB 2 o 0.2 mg·L⁻¹ (Pafotiou *et al.*, 2001).

Para favorecer el enraizamiento de los brotes de *M. schiedeana schiedeana*, se adicionó carbón activado (CA) al medio de maduración. Se tiene conocimiento de que el carbón activado absorbe citocininas residuales que han sido lixiviadas de los brotes hacia el medio después de ser transferidos a medio basal, ayudando a que la reducción de niveles endógenos de BA incremente el enraizamiento (Biondi *et al.*, 1984 citado por Bonga y von Aderkas, 1992; Haemphill *et al.*, 1998 citado por Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Díaz, 2005). El empleo de CA para el enraizamiento de brotes se ha reportado en otras especies de cactáceas: *Acharagma aguirreana*, *Pachycereus schottii* y *S. stellatus* en medio MS + CA 3 g·L⁻¹ obteniendo el 100% de enraizamiento en las tres especies (Castro-Gallo *et al.*, 2002). Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) también probaron medio MS adicionado con CA 2 g·L⁻¹ para el enraizamiento de *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *S. thurberi* obteniendo el 60, 68 y 68% respectivamente para cada especie.

La transferencia y aclimatización *ex vitro* es el paso final de la micropropagación, pero frecuentemente es el más delicado (Preece y Sutter, 1991). El ambiente *in vitro*, con un medio artificial usualmente adicionado con sacarosa, empleando envases herméticos generan altos porcentajes de humedad, bajo intercambio gaseoso y por lo tanto una escasez de CO₂ durante el fotoperiodo, producción de etileno y la baja densidad del flujo de fotones (PFD), inducen alteraciones en el desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* y en el rendimiento fotosintético de las mismas (Kozai, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1997 citados por Kadleček *et al.*, 2001). Por lo que, la adaptación de las plantas regeneradas *in vitro* a las condiciones externas es un factor determinante para que sea costeable un sistema de micropropagación, ya que no será útil un sistema de proliferación muy productivo, si el porcentaje de plantas que sobrevivirán a la adaptación es bajo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999), siendo necesario un proceso de aclimatización que incremente o asegure la sobrevivencia *ex vitro*.

Los resultados de enraizamiento *in vitro* (61%) y sobrevivencia *ex vitro* (83%) obtenidos para *M. schiedeana schiedeana* se encuentran dentro del intervalo reportado para otras especies 50–100% para enraizamiento y 84–100% en sobrevivencia, no siendo necesaria la adición de auxinas *in vitro*, pero si la aplicación de un enraizador comercial para favorecer el enraizamiento *ex vitro*.

Por otra parte, el uso de carbón activado para promover el desarrollo de raíces no es muy común, debido a que no es muy difundido su uso. Sin embargo con base a los resultados reportados y la de otras especies de cactáceas se ha observado que han respondido efectivamente a la adición de éste para promover el enraizamiento *in vitro*.

Es importante señalar que el presente trabajo es el primer reporte del establecimiento y proliferación *in vitro* de la subespecie *M. schiedeana schiedeana* y representa una alternativa viable para la propagación y conservación de esta especie. Con el fin de disminuir la presión de colecta de las poblaciones naturales, obteniendo una alta producción de plantas para distribuir las en colecciones científicas (jardines botánicos) así como su comercialización legal y regulada.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Hidalgo FOMIX-HIDALGO-2005-C01-53 "El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del estado de Hidalgo". La donación de semillas fue realizada por el Biol. Jerónimo Reyes Santiago de Jardín Botánico del IBUNAM y por personal de Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo (RBBM).

Literatura citada

- Bonga, J. M. y P. von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of trees. Forestry Sciences. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 236 p.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México. Vol III. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 643 p.
- Castro-Gallo, I., E. Meza-Rangel, M. E. Pérez-Reyes y M. E. Pérez-Molphe-Balch. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae*, Aguascalientes, México 2:5-24.
- Choreño-Tapia, J. M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 8:183-196.

- Dávila-Figueroa, C. A., M. L. De la Rosa-Carrillo, M. E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 41:540-545.
- Davies, P. J. 1990. Introduction. The Plant Hormones: their nature, occurrence and functions. *En Davies, P. J. (ed.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Academic Publishers pp. 1-11.*
- Díaz, M. C. 2005. Clonación *in vitro* de plantas de alta calidad comercial de chayote *Sechium edule* (Jack.) Sw. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Veracruzana, Córdoba, México. 77 p.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Vanderlaken y J. H. Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia-alba* Rausch. *Scientia Horticulturae* 46:283-294.
- Flores-León, R. y G. Ortiz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia* 7:92-96.
- Flores, R. D. Y. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie amenazada del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 61 p.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 32:272-289.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95:319-332.
- Hernández, M. H. y A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Kadleček, P., T. Tichá, D. Haisel, V. Čapková y C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161:695-701.
- Martínez-Vázquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64:99-105.
- Machado, M. y A. J. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 32:199-203.
- Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.
- Mata, R. M., M. A. Monroy de la Rosa, K. Moebius-Goldammer y V. M. Chávez-Ávila. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular & Development Biology-Plant* 34:400-404.
- Murashighe, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:573-487.
- Olguín, S. L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 85 p.
- Ortiz-Montiel, J. G y R. Alcántara-García. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Le-maire) Coulter. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 42:3-6.
- Papafotiou, M., G. N. Balotis, P. T. Louka y J. Chronopoulos, J. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65:163-167.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. R. Morones-Ruiz y H. Lizalde-Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 Species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 34:131.
- Pérez-Molphe-Balch, E., R. Ramírez-Malagón, H. G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags, México. 179 p.
- Pérez-Molphe-Balch, E. y C. A. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* Propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *HortScience* 37:693-696.
- Preece, J. E. y E. G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *En Debergh P.C. y R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp. 71-93.*
- Ramírez-Malagón, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nulez-Palenius, N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Pant* 43:660-665.
- Retes-Pruneda, J. L., M. L. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes, E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81:9-16.
- Rojas-Aréchiga, M. y C. Vázquez-Yanez. 2000. Cactus seed germination: A review. *Journal of Arid Environments* 44:85-104.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeher). *Cactus and Succulent Journal* 64:116-119.

- Rosas-López, U. Y. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichi* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. Grandis (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *Fyton* 73:213-220.
- Rubluo, A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer-Verlag Berlin pp. 193-205.
- Santos-Díaz, M. D., R. Méndez-Ontiveros y A. Arredondo-Gómez. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39:480-484.
- NOM- Norma Oficial Mexicana. 2010. NOM-059-SEMAR-NAT-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. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. *Diario Oficial*, 30 diciembre. México 77 p.
- Tapia, C. D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo 73 p.
- Villavicencio, G. E. E., A. Villegas-Monter, G. Arellano-Ostoa y J. Vargas-Hernández. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44:49-57.
- Vyskot, B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal Horticultural Science* 59:449-452.