



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Desarrollo de protocolos de propagación in vitro en
especies amenazadas del género *Astrophytum*: un enfoque
sostenible para la producción de cactáceas con interés
ecológico y comercial.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Condini, Serena

Tutor/a: Rodríguez Burruezo, Adrián

Director/a Experimental: Cortés Olmos, Carles

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Título

Desarrollo de protocolos de propagación in vitro en especies amenazadas del género *Astrophytum*: un enfoque sostenible para la producción de cactáceas con interés ecológico y comercial.

Resumen

Astrophytum es un género perteneciente a la familia de las cactáceas en el que se incluyen seis especies: *A. myriostigma*, *A. asterias*, *A. coahuilense*, *A. ornatum*, *A. capricorne* y *A. caput-medusae*. Todas ellas son oriundas y endémicas de las regiones desérticas y semidesérticas de México, lo que les confiere un valor ecológico único y las convierte en elementos importantes de la flora desértica mexicana.

Estas especies tienen un gran valor estético, por lo que resultan interesantes tanto para el mercado de plantas ornamentales, como para el mercado enfocado a los coleccionistas. Sin embargo, *A. asterias* (incluida en el apéndice CITES I) y *A. caput-medusae* (última especie descrita del género, descubierta en 2003), se encuentran especialmente amenazadas y su comercio está regulado internacionalmente para protegerlas de la sobreexplotación.

El proceso de propagación de estas dos especies se hace en general de forma tradicional, bien por semillas o a través de injerto. Sin embargo, no se dispone de mucha información sobre la efectividad que podría tener su multiplicación mediante cultivo de tejidos in vitro. La obtención de un protocolo eficaz de micropropagación ayudaría a optimizar el proceso de producción, reduciendo los costes y aumentando la sostenibilidad del mismo. Además, permitiría a los viveros autorizados competir con el mercado ilegal de cactáceas basado en el expolio de los centros de diversidad. Por otra parte, una producción más eficiente permitiría plantear eventos de reintroducción de plantas en el hábitat original, contribuyendo a la conservación in situ de las poblaciones más sensibles.

Con esta tesis experimental se pretende desarrollar protocolos adecuados para la micropropagación in vitro de las especies *Astrophytum asterias* y *Astrophytum caput-medusae* y compararlas con la respuesta obtenida en *A. coahuilense*, una especie producida en masa a nivel comercial.

Partiendo de los resultados obtenidos en un ensayo preliminar basado en la combinación de citoquininas (KIN y BAP) y auxinas (NAA, IAA, IBA, PIC y 2,4-D) y empleando callos de *A. coahuilense* y *A. capricorne* como material de partida, se realizará una evaluación de las combinaciones de hormonas más prometedoras sobre las especies de interés. Así pues, se estudiará la respuesta de las especies propuestas al cultivo de tejidos para tratar de incrementar su rendimiento y productividad.

Para ello, se valorará el comportamiento de explantes procedentes de plantas de 20 semanas (cortes longitudinales) y explantes de plántulas de 4 semanas (epicotilo e hipocotilo) a través de la evaluación mensual del número de rebrotes generados, la frecuencia de aparición de callos y capacidad de desarrollar raíces en función del tipo de explante y condición. Finalmente, se procederá al enraizamiento y aclimatación de los rebrotes para confirmar su capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo ex vitro.

Palabras clave: *Astrophytum*, Cactaceae, micropropagación, conservación, especies amenazadas, ecología

Title

Development of in vitro propagation protocols in threatened species of the genus *Astrophytum*: a sustainable approach for the production of cacti with ecological and commercial interest.

Summary

Astrophytum is a genus belonging to the cacti family, which includes six species: *A. myriostigma*, *A. asterias*, *A. coahuilense*, *A. ornatum*, *A. capricorne*, and *A. caput-medusae*. All of them are native and endemic to the desert and semidesert regions of Mexico, giving them unique ecological value and making them important elements of the Mexican desert flora.

These species have significant aesthetic value, making them interesting for both the ornamental plant market and collectors. However, *A. asterias* (listed in CITES Appendix I) and *A. caput-medusae* (the most recently described species of the genus, discovered in 2003) are particularly threatened, and their trade is internationally regulated to protect them from overexploitation.

Propagation of these two species generally occurs through traditional methods, either by seeds or through grafting. However, there is limited information available on the effectiveness of their multiplication through in vitro tissue culture. Developing an efficient micropropagation protocol would optimize the production process, reduce costs, and increase sustainability. Additionally, it would enable authorized nurseries to compete with the illegal cactus market based on the plundering of diversity centres. Moreover, more efficient production could facilitate reintroduction events of plants into their original habitat, contributing to the in situ conservation of the most vulnerable populations.

This experimental thesis aims to develop appropriate protocols for the in vitro micropropagation of *Astrophytum asterias* and *Astrophytum caput-medusae* species and compare them with the response obtained in *A. coahuilense*, a species mass-produced commercially.

Based on the results of a preliminary trial involving a combination of cytokinins (KIN and BAP) and auxins (NAA, IAA, IBA, PIC, and 2,4-D) and using calluses from *A. coahuilense* and *A. capricorne* as starting material, an assessment of the most promising hormone combinations on the target species will be conducted. The response of the proposed species to tissue culture will be studied to try to increase their yield and productivity.

For this purpose, the response of explants from 20-week-old plants (longitudinal cuts) and explants from 4-week-old seedlings (epicotyl and hypocotyl) will be evaluated through monthly assessments of the number of generated shoots, the frequency of callus appearance, and the ability to develop roots depending on the type of explant and condition. Finally, rooting and acclimatization of the shoots will be carried out to confirm their adaptability to ex vitro cultivation conditions.

Keywords: *Astrophytum*, Cactaceae, micropropagation, conservation, threatened species, ecology.

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1 El género <i>Astrophytum</i>	1
1.1.1 Descripción botánica	1
1.1.1.1 <i>Astrophytum</i> asterias.....	5
1.1.1.2 <i>Astrophytum</i> caput-medusae	6
1.1.1.3 Especies de <i>Astrophytum</i> no amenazadas	8
1.1.2 Hábitat	9
1.2 Importancia en el mercado ornamental.....	9
1.3 Importancia desde el punto de vista ecológico	11
1.3.1 Cambio climático, depredadores y enfermedades.....	11
1.3.2 Amenazas antropogénicas directas	13
1.3.2.1 Recolección ilegal de especímenes.....	13
1.4 Conservación de los recursos fitogenéticos	15
1.4.1 Registro de especies amenazadas	15
1.4.2 Proyectos de conservación	17
1.5 Métodos de propagación.....	19
1.5.1 Métodos tradicionales.....	19
1.5.2 Propagación in vitro en cactáceas	19
1.6 Aplicación práctica del cultivo in vitro	21
1.6.1 Germinación in vitro	21
1.6.2 Uso de reguladores de crecimiento.....	21
2. Objetivo	24
3. Materiales y métodos.....	25
3.1 Material inicial	25
3.1.1 Protocolo de desinfección de las semillas	25
3.1.2 Establecimiento del cultivo in vitro	25
3.1.3 Ensayo preliminar	25
3.2 Diseño experimental.....	26
3.2.1 Inducción de brotes por activación areolar	26
3.2.2 Inducción de organogénesis a partir de callos	28
3.2.3 Diseño del experimento.....	29
3.2.4 Análisis estadístico.....	30
3.2.5 Enraizamiento y aclimatación	31
4. Resultados y discusión.....	33

4.1 Ensayo preliminar	33
4.2 Ensayo principal	35
4.2.1 Organogénesis directa	35
4.2.1.1 Respuesta específica en producción de rebrotes: tipo de explante	38
4.2.1.2 Dominancia apical	41
4.2.1.3 Respuesta específica en producción de rebrotes: condición de cultivo	43
4.2.2 Rizogénesis	45
4.2.3 Callogénesis	47
4.2.3.1 Inducción de organogénesis a partir de callo	50
4.2.3.2 Interacción genotipo x ambiente	51
4.2.4 <i>Astrophytum caput-medusae</i>	52
4.3. Ensayo de enraizamiento y aclimatación	55
4.3.1 Enraizamiento	55
4.3.2 Aclimatación	58
5. Conclusiones	59
6. Referencias	59
Apéndices	68

Índice de figuras

Figura 1. Detalle de areolas en ejemplares de <i>A. asterias</i> y <i>A. coahuilense</i>	2
Figura 2. Mapa de distribución de las especies del género <i>Astrophytum</i>	2
Figura 3. Ejemplar de <i>Astrophytum myriostigma</i> v. <i>nudum</i> junto a <i>Astrophytum myriostigma</i> en el que se observa la presencia de tricomas.	4
Figura 4. Flores y frutos del género <i>Astrophytum</i>	5
Figura 5. <i>A. asterias</i>	6
Figura 6. <i>A. caput-medusae</i>	7
Figura 7. Ejemplares de <i>A. myriostigma</i> , <i>A. coahuilense</i> , <i>A. capricorne</i> , <i>A. ornatum</i>	8
Figura 8. Semilleros de <i>A. asterias</i> , <i>A. caput-medusae</i> y <i>A. coahuilense</i>	9
Figura 9. Cultivares de <i>Astrophytum</i> con interés ornamental.....	10
Figura 10. Entre los depredadores de los <i>Astrophytum</i> se encuentran escarabajos de la familia Cerambycidae y la ardilla terrestre <i>Spermophilus mexicanus</i>	12
Figura 11. Semejanza entre el peyote, <i>Lophophora williamsii</i> , y <i>Astrophytum asterias</i>	14
Figura 12. Conservación de cactus mexicanos en el banco de germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes	18
Figura 13. Ejemplares de <i>A. asterias</i> cv. Purple y <i>A. coahuilense</i> cv. Kikko injertados en <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	19
Figura 14. Diferencias en la germinación de semillas de <i>A. asterias</i> en condición in vitro y ex vitro.	21
Figura 15. Tipo de explante, diseño experimental	27
Figura 16. División de callos en fragmentos en condiciones asépticas.	28
Figura 17. Explantes enraizados, limpiados del agar y listos para la aclimatación. Explantes en fase de aclimatación a sustrato.....	32
Figura 18. <i>A. coahuilense</i> en medio BAP 8 µm + IBA 4,9 µm; <i>A. coahuilense</i> en medio KIN 4 µm + 2,4-D 0,3 µm; <i>A. coahuilense</i> en medio KIN 4 µm + IAA 11,4 µm; <i>A. coahuilense</i> en medio KIN 4 µm + IBA 4,9 µm. ...	33
Figura 19. Evolución del número total de rebrotes (a) y del promedio de rebrotes por explante activo (b) durante los cinco meses del ensayo por las dos especies.	37
Figura 20. Ejemplo de explante de <i>A. asterias</i> con rebrote hiperhidratado (izquierda) y de <i>A. coahuilense</i> con rebrote revertiendo a callo (derecha) al final del ensayo (mes 5).....	38
Figura 21. Porcentaje de explantes que han dado respuesta organogenica directa a los cinco meses de ensayo.....	38
Figura 22. Grafica: representación visual de la respuesta de los diferentes tipos de explantes en cuanto a promedio de rebrotes por explante para la especie <i>A. coahuilense</i> . Fotos: explantes de <i>A. coahuilense</i> con alta producción en rebrotes ((a) explante longitudinal, medio A; (b) explante longitudinal, medio B).....	39
Figura 23. Grafica: respuesta de los diferentes tipos de explantes en cuanto a promedio de rebrotes por explantes activos por la especie <i>A. asterias</i> . Fotos: explantes de <i>A. asterias</i> con alta producción en rebrotes ((a) explante epicotilo, medio E; (b) explante hipocotilo, medio E).	40
Figura 24. Reestructuración de las plantas en explantes de tipo longitudinal de <i>A. asterias</i> (a, b) y <i>A. coahuilense</i> (c, d).....	42
Figura 25. Representación visual de la respuesta de los explantes a los diferentes medios de cultivo en cuanto a promedio de rebrotes por explante por la especie <i>A. coahuilense</i>	43
Figura 26. Representación visual de la respuesta de los explantes a los diferentes medios de cultivo en cuanto a promedio de rebrotes por explante por la especie <i>A. asterias</i>	44
Figura 27. Explantes que han dado respuesta rizogénica	45
Figura 28. Frecuencia de aparición de rizogénesis según los diferentes medios de cultivo en <i>A. asterias</i> y <i>A. coahuilense</i>	47
Figura 29. Formación de callo en explantes durante el ensayo	48

Figura 30. Sumatorio del número de callos por tipo de explante estudiado	49
Figura 31. Sumatorio del número de callos por condición.....	50
Figura 32. <i>A. coahuilense</i> : detalles de rebrotes (a) en medio A (solo kinetina 4 μ M) y (b, c) en medio C (kinetina 4 μ M con IBA 4,9 μ M); (d) gran proliferación de callo en medio I (TDZ 1 μ M con 2,4-D 0,3 μ M). ..	51
Figura 33. En una misma placa de epicótilos de <i>A. asterias</i> se observa una multitud de respuestas: (a) organogénesis por activación areolar, (b) rizogénesis, (c) callogénesis. (d) Diferencia de tamaño observado a mes 5 en dos explantes de <i>A. asterias</i> cultivados en las mismas condiciones.....	52
Figura 34. Formación y proliferación de callo en explantes tipo B (parte central de los tubérculos) de <i>A. caput-medusae</i> en medio C a mes 2 (a), a mes 3 (b) y a mes 5 (c). Desarrollo en explantes tipo C (cuerpo de la planta con cotiledones) en medio C a mes 1 (d) y mes 5 (e). Explantes de tipo D (raíces) en medio C a mes 1 (f) y mes 5 (g). Nota: medio C = kinetina 4 μ M con IBA 4,9 μ M	53
Figura 35. Frecuencia de aparición de callogénesis acumulada por meses, en los diferentes explantes de <i>A. caput-medusae</i> . Nota: MS=control; A= kinetina 4 μ M; C=kinetina 4 μ M con IBA 4,9 μ M; F= kinetina 4 μ M con 2,4-D μ M.	54
Figura 36. Medio MS (control): (a) rizogénesis en explantes de tipo C; rebrotes en explante (b) A y (c) D....	54
Figura 37. Enraizamiento en <i>A. coahuilense</i>	56
Figura 38. Enraizamiento en <i>A. asterias</i>	57
Figura 39. Explantes aclimatados a condiciones ex vitro: (a) explantes de <i>A. coahuilense</i> y <i>A. asterias</i> ; (b) exlantes de <i>A. caput-medusae</i>	58

Índice de tablas

Tabla 1. Evolución de la clasificación taxonómica de las especies de <i>Astrophytum</i> a lo largo del tiempo.	3
Tabla 2. Clasificación de las especies del género <i>Astrophytum</i> en las tres iniciativas de conservación más importantes.	16
Tabla 3. Resumen de trabajos previos de cultivo in vitro realizados con especies del género <i>Astrophytum</i>	22
Tabla 4. Diseño experimental del ensayo preliminar.	26
Tabla 5. Medios de cultivo utilizados durante el ensayo principal. En la primera columna se encuentran las denominaciones correspondientes utilizadas sucesivamente para hacer referencia a los medios.	28
Tabla 6. Medios de cultivo utilizados durante el ensayo de calogénesis. En la primera columna se encuentran las denominaciones correspondientes utilizadas sucesivamente para hacer referencia a los medios.	29
Tabla 7. Diseño experimental del ensayo.	30
Tabla 8. Resultados del ensayo preliminar: respuesta conjunta de los callos de las especies <i>A. coahuilense</i> y <i>A. capricorne</i> a medios suplementados con combinaciones hormonales.	34
Tabla 9. Datos del ensayo agrupados por especie y tipo de explante, al final del periodo de inducción (mes 3) y al final del ensayo (mes 5).	36
Tabla 10. Diferencias en promedio de rebrotes por explante activo entre los diferentes explantes en <i>A. coahuilense</i>	39
Tabla 11. Diferencias en promedio de rebrotes entre los diferentes explantes en <i>A. asterias</i>	39
Tabla 12. Frecuencia de aparición de rizogénesis comparada con la aparición de organogénesis directa en los diferentes explantes de <i>A. asterias</i> y <i>A. coahuilense</i>	46
Tabla 13. Promedio de formación de callo en <i>A. coahuilense</i> y <i>A. asterias</i> según el medio de cultivo.	49

1. Introducción

1.1 El género *Astrophytum*

1.1.1 Descripción botánica

Los cactus son plantas angiospermas pertenecientes a la familia *Cactaceae* (Juss, 1789), excepcionalmente diversificadas y distribuidas principalmente en regiones áridas y semiáridas de América (Anderson, 2001; Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Las cactáceas son plantas adaptadas a los ambientes cálidos y secos, gracias principalmente al desarrollo de diferentes características fisiológicas y anatómicas que les permiten conservar y optimizar el uso del agua disponible. Entre las adaptaciones xerófitas comunes a los cactus encontramos (Anderson, 2001):

- En primer lugar, la respiración CAM o Metabolismo Ácido de las Crasuláceas: los cactus abren sus estomas por la noche para minimizar la pérdida de agua y captan CO₂, que almacenan como ácidos orgánicos. Durante el día, con los estomas cerrados, liberan este CO₂ para la fotosíntesis, lo cual les permite conservar agua y aprovechar las condiciones nocturnas (más frescas y húmedas) para realizar el intercambio gaseoso. Este tipo de metabolismo resulta crucial para la supervivencia en ambientes áridos.
- El desarrollo de espinas o estructuras pilosas que protegen al meristemo. Las espinas crean una sombra sobre la superficie de la planta, mientras los tricomas reflejan la luz solar, ambos reduciendo la temperatura superficial y la pérdida de agua. Además, la epidermis de estas plantas está recubierta por una cutícula gruesa y cerosa que minimiza la evapotranspiración.
- La forma cilíndrica o globular que permite minimizar la superficie expuesta al sol, junto con tallos suculentos que permiten almacenar agua para sobrevivir durante largos periodos de sequía.
- Las semillas, que además de ser dispersas por pájaros y roedores, presentan una adaptación a la hidrodispersión: la forma de sombrero, el hilo amplio y las cámaras de aire, son particularidades que permiten su dispersión y germinación en sitios caracterizados por escurrimientos o lagos temporales (Bregman, 1988; Becerra-López *et al.*, 2010).
- Para acceder a la poca agua disponible, estas plantas suelen desarrollar sistemas radiculares extensos y superficiales que les permite absorber rápidamente el agua de las lluvias escasas y breves.

Además de estas características, que les permiten sobrevivir en ambientes adversos, los cactus se caracterizan por tener un tipo de estructura especializada única e identificativa de la familia: las areolas (**Figura 1**). Las areolas son puntos de crecimiento activo, a partir de las cuales se desarrollan estructuras como espinas, flores, yemas y raíces adventicias. También resultan fundamentales en la propagación vegetativa de estas plantas, dado que la activación de las yemas axilares presentes en las areolas puede dar origen a nuevos brotes, capaces de desarrollarse y constituir una planta completa (Villavicencio *et al.*, 2012; Lema-Rumińska y Kulus, 2014).



Figura 1. Detalle de areolas en ejemplares de *A. asterias* (izquierda) y *A. coahuilense* (derecha).

Entre los 150 géneros aproximadamente que componen la familia de las cactáceas, se encuentra el género *Astrophytum*, descrito por Charles Lemaire y publicado en “*Cactearum Genera Nova Speciesque Novae*” en 1839. Las plantas de este género son endémicas de regiones áridas y semidesérticas de México, como el desierto de Chihuahua y los estados de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí y Zacatecas, así como en áreas adyacentes de Texas (USFWS, 2013) (**Figura 2**).

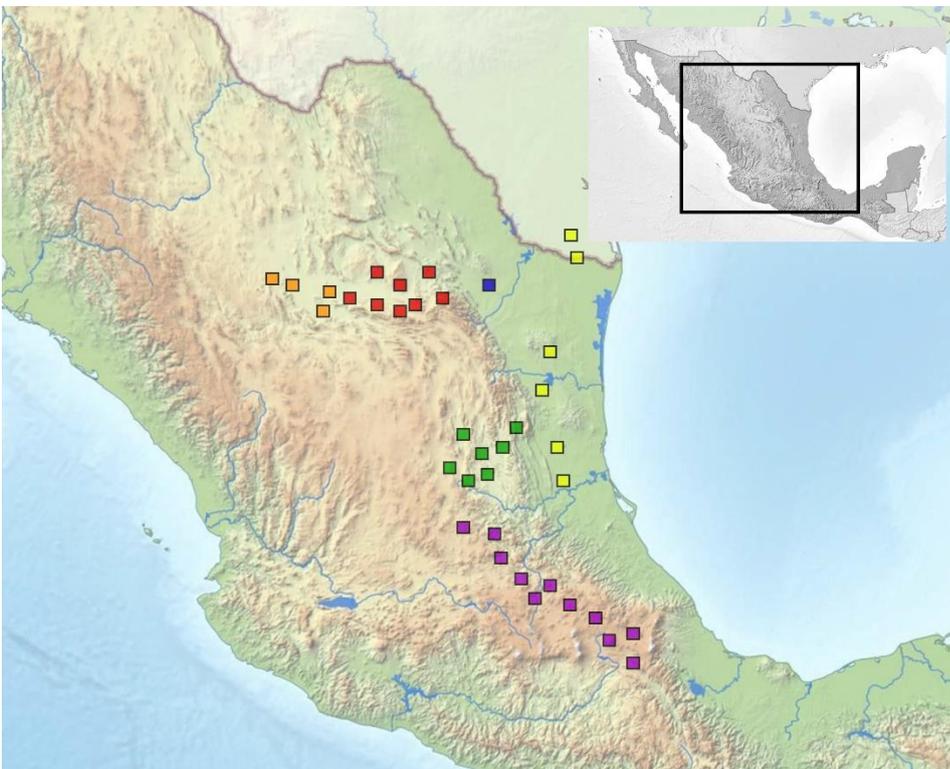


Figura 2. Mapa de distribución de las especies del género *Astrophytum*. Los cuadrados representan la distribución de las poblaciones de las seis especies de *Astrophytum*: naranja: *A. coahuilense*; rojo: *A. capricorne*; azul: *A. caput-medusae*; amarillo: *A. asterias*; verde: *A. myriostigma*; morado: *A. ornatum*.

La clasificación taxonómica del género difiere según la bibliografía consultada (**Tabla 1**), dado que ha ido evolucionando con el tiempo. Entre los años 1822 y 1868 fueron descubiertas las primeras cuatro especies del género: *A. asterias* (Zucc., 1868), *A. myriostigma* (Lem. 1839), *A. ornatum* (DC., 1922) y *A. capricorne* (A. Dietr., 1922). No fue hasta 1927 cuando se describió el *Astrophytum coahuilense* (H. Moeller, 1927) como una especie independiente, ya que se consideró por mucho tiempo como una variante de *A. myriostigma* por su similitud en forma y número de costillas. Mientras que la especie *A. caput-medusae* no fue descubierta y descrita hasta el 2002 (Velazco y Nevárez, 2002).

Tabla 1. Evolución de la clasificación taxonómica de las especies de *Astrophytum* a lo largo del tiempo.

Britton y Rose, 1922	Backeberg, 1950 y 1961	Sadovsky y Schütz, 1979	Bravo-Hollis y Sanchez-Mejorada, 1991	Anderson, 2001	Hunt et al., 2006
<i>A. asterias</i>	(N) <i>A. asterias</i>	<i>A. asterias</i>	<i>A. asterias</i>	<i>A. asterias</i>	(N) <i>A. asterias</i>
<i>A. capricorne</i>	(N) <i>A. capricorne</i>	<i>A. capricorne</i>	<i>A. capricorne</i>	<i>A. capricorne</i>	(N) <i>A. capricorne</i>
<i>A. myriostigma</i>	(N) <i>A. coahuilense</i>	<i>A. coahuilense</i>	<i>A. myriostigma</i>	<i>A. myriostigma</i>	(S) <i>A. caput-medusae</i>
<i>A. ornatum</i>	(A) <i>A. myriostigma</i> (A) <i>A. ornatum</i> (N) <i>A. senile</i>	<i>A. crassipinum</i> <i>A. myriostigma</i> <i>A. niveum</i> <i>A. senile</i>	<i>A. ornatum</i>	<i>A. ornatum</i>	(N) <i>A. coahuilense</i> (A) <i>A. myriostigma</i> (A) <i>A. ornatum</i>

Nota. A=*Astrophytum* subgénero *Astrophytum*; N=*Astrophytum* subgénero *NeoAstrophytum*; S=*Astrophytum* subgénero *Stigmatodactylus*.

No obstante, en la actualidad se incluyen 6 especies aceptadas. De hecho, los resultados obtenidos por Vázquez-Lobo et al. en 2015 sobre la divergencia evolutiva dentro del género de cactus *Astrophytum*, indican que hubo eventos evolutivos independientes que dieron lugar a la diversificación actual del género. Este trabajo, que compara las secuencias genéticas y las relaciones filogenéticas entre las especies, demuestra que el género *Astrophytum* comprende seis especies, agrupadas en dos clados principales:

- **Clado 1:** *A. asterias*, *A. caput-medusae*, *A. coahuilense*, y *A. capricorne*. Las especies de este grupo son relativamente delicadas de cultivar; tienen en común la presencia de una zona rojiza en el centro de las flores.
- **Clado 2:** *A. myriostigma* y *A. ornatum*. De cultivo más sencillo, resisten climas más frescos y más húmedos; su flor es completamente amarilla.

Los dos clados se distinguen por afinidad genética, resistencia climática, morfología, color de la flor y la facilidad de hibridación entre miembros de un mismo clado. La diferente evolución sería debida principalmente al aislamiento geográfico entre las especies, separadas por las montañas del sistema de la Sierra Madre Oriental (Sierra de Parras y Sierra de Guadalupe; Hafner y Riddle, 2011).

Según las descripciones de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) y Anderson (2001), las especies incluidas dentro del género *Astrophytum* tienen una morfología consistente: son cactus globosos o columnares cortos con apariencia estrellada cuando se ven desde arriba (con la excepción de *A. caput-medusae*, que tiene una morfología tuberculada distintiva). De hecho, la palabra "*Astrophytum*" significa "planta con forma de estrella". Cabe destacar que todas las especies presentan un acumulo de tricomas blancos en su epidermis, aunque existen algunas formas denominadas "nuda" o "nudum" que han sido seleccionadas específicamente por su ausencia (**Figura 3**).

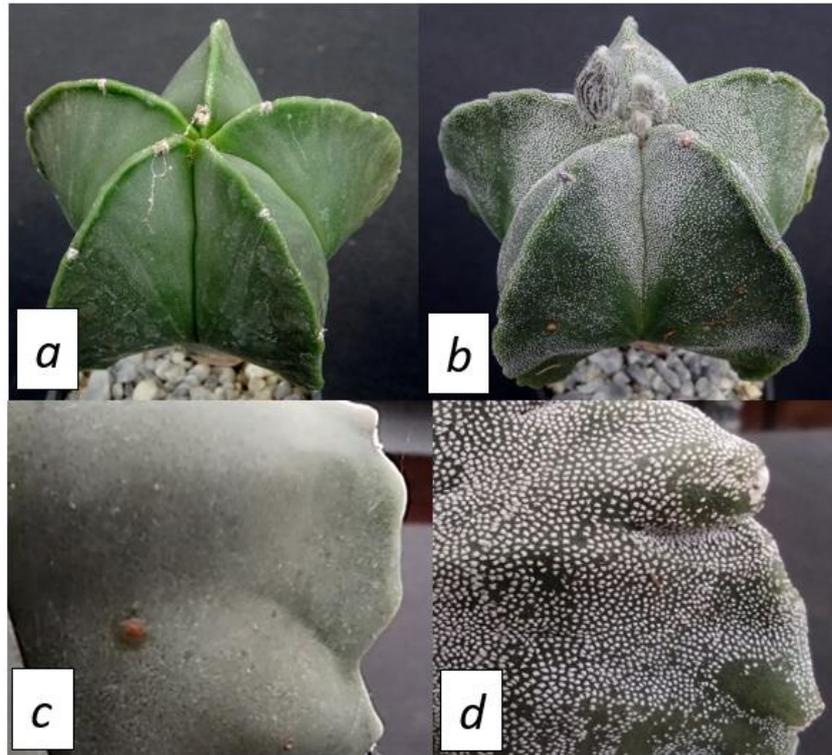


Figura 3. (a, c) Ejemplar de *Astrophytum myriostigma* v. *nudum* junto a (b, d) *Astrophytum myriostigma* en el que se observa la presencia de tricomas.

A. myriostigma y *A. ornatum* tienen flores completamente amarillas (**Figura 4a**) mientras algunas flores de las otras cuatro especies presentan color rojo en su centro (**Figura 4b**) y todas muestran simetría radial; eventualmente las flores se convierten en frutos globosos, semicarnosos, con tricomas y escamas secas (**Figura 4c, d, e**), que contienen semillas negras relativamente grandes con un alto poder germinativo pero una durabilidad escasa (United States Fish and Wildlife Service, 2003). La dehiscencia de los frutos es apical, longitudinal o basal según la especie. Estas plantas son alógamas estrictas y su polinización es de tipo entomófila. Además, muy raramente se reproducen vegetativamente por lo que su reproducción depende exclusivamente de su producción de semillas (Strong and Williamson, 2007).

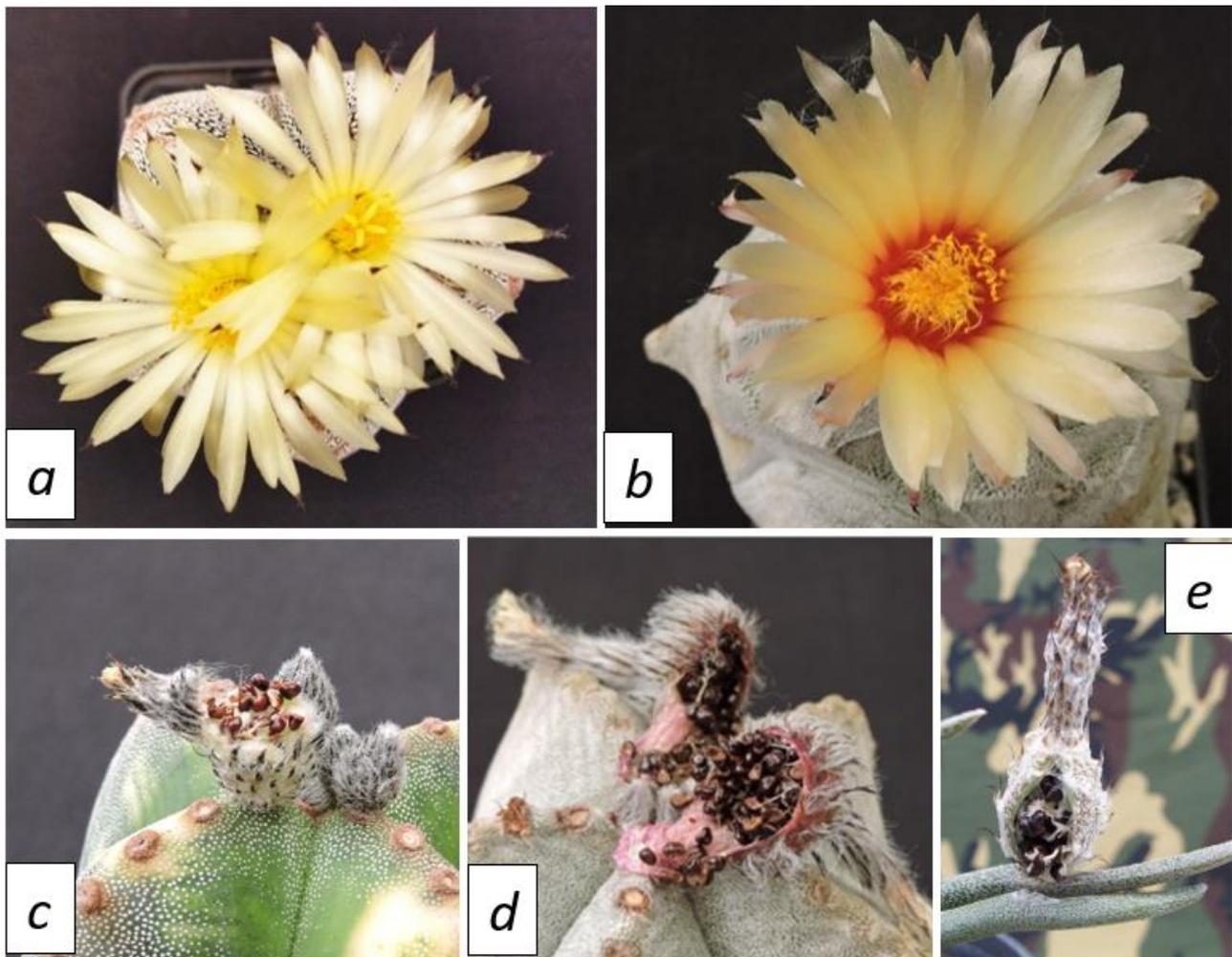


Figura 4. Flores y frutos del género *Astrophytum*: (a) flores amarillas de *A. myriostigma*, características de las especies pertenecientes al clado 2, (b) flor amarilla con el centro rojo-anaranjado de *A. coahuilense*, típica de las especies incluidas en el clado 1, (c) fruto de *A. myriostigma* con dehiscencia apical, (d) fruto de *A. coahuilense* en el que se aprecia la dehiscencia basal, (e) fruto de *A. caput-medusae* con la característica dehiscencia longitudinal (Proyecto Digitostigma, Nevarez, <https://www.flickr.com/photos/totalmentenorestense/albums/72157594240624615/>).

Además de clasificarse por clados, los *Astrophytum* pueden dividirse en dos grupos según el riesgo de supervivencia en su hábitat natural. *A. asterias* y *A. caput-medusae* son especies con un alto riesgo de desaparición y están sujetas a una protección ecológica especial, a diferencia de las otras cuatro especies que muestran un riesgo menor en comparación. Dado el objetivo del proyecto, enfocado a la conservación de las dos especies amenazadas, se van a describir en detalles las particularidades botánicas y morfológicas de cada una de las especies de *Astrophytum*, profundizando en *A. asterias* y *A. caput-medusae* por su situación crítica.

1.1.1.1 *Astrophytum asterias*

Astrophytum asterias se descubrió en 1868 y sus poblaciones silvestres se extienden entre el estado de Tamaulipas y Nuevo León en México y el valle de Río Grande en Texas. Desde un punto de vista morfológico, *A. asterias* es un cactus de porte globular, aplanado, con ocho costillas y desprovisto de espinas (**Figura 5a**), aunque se pueden encontrar cultivares con un número diferente de costillas (**Figura 5b**). Las plantas llegan a medir unos 25 cm de diámetro y 8 cm de altura, son de color verde grisáceo con areolas blancas y prominentes. Las flores, apicales, aparecen por primera vez a los 2-5 años (dependiendo de las condiciones

de cultivo) y son amarillas con el centro rojo (**Figura 5c**), aunque existen cultivares comerciales con flores de diversas tonalidades (**Figura 5d**).

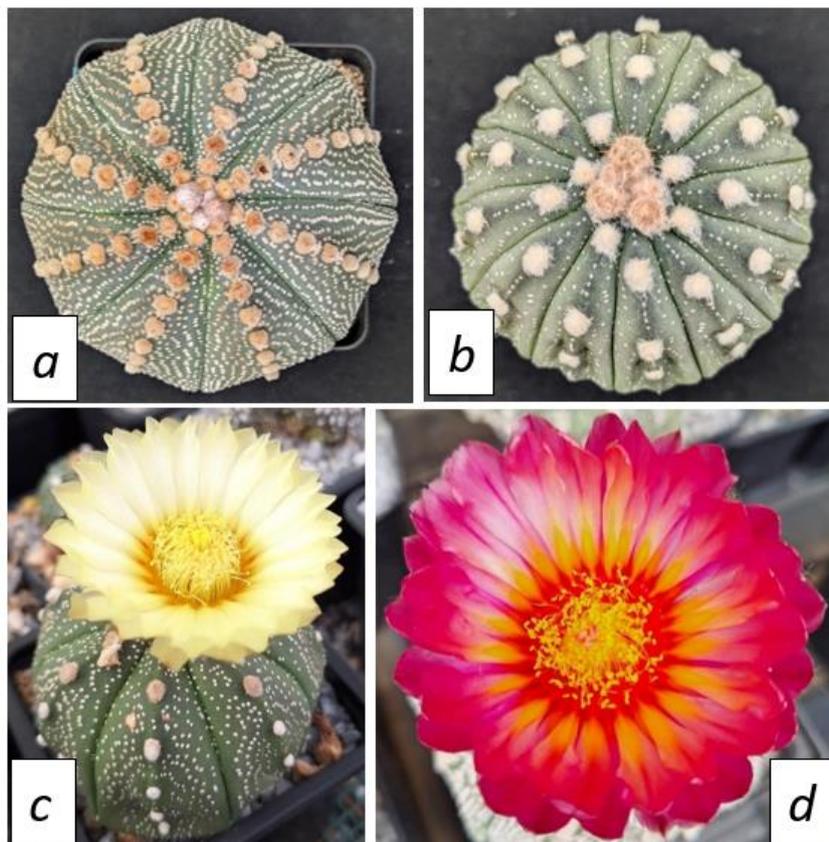


Figura 5. *A. asterias*: (a) Ejemplar de *Astrophytum asterias*, (b) *A. asterias* f. *multicostatum*, con trece costillas; (c) ejemplar de *A. asterias* en floración; (d) *A. asterias* cv. Rainbow, variante comercial de flor roja y centro amarillo-anaranjado.

1.1.1.2 *Astrophytum caput-medusae*

Astrophytum caput-medusae, descubierta en 2002 y endémica del estado de Nuevo León en México, se distingue por su forma única: su cuerpo alargado y cilíndrico se ramifica desde la base en múltiples segmentos delgados. Debido a esta forma tan distintiva, en un principio se incluyó en un género de nueva creación: *Digitostigma* (Velazco & Nevarez, 2002). Diversos estudios evidenciaron que cambios evolutivos en la forma del tallo, como la transición de tallos globosos a tuberculares, son comunes en Cactaceae (Butterworth *et al.* 2002, Hernández-Hernández *et al.* 2011) y sucesivamente se confirmó su pertenencia al género *Astrophytum*.

Los largos tubérculos de *A. caput-medusae* lo hacen asemejar a una medusa (de aquí el nombre de la especie) (**Figura 6a**); estos pueden llegar a medir unos 20 cm, son de color verde grisáceo con estigmas lanosos y espinas apicales cortas y blancas (**Figura 6b**). La flor, muy parecida a la de *A. asterias*, es amarilla con el centro rojo-anaranjado (**Figura 6c**). Si bien la especie comparte algunos caracteres con las otras especies del género, hay características morfológicas que la alejan del resto de los *Astrophytum*: los frutos de *A. caput-medusae* tienen dehiscencia longitudinal (**Figura 4e**), sus semillas tienen una forma muy característica y las raíces son napiformes (**Figura 6d**).

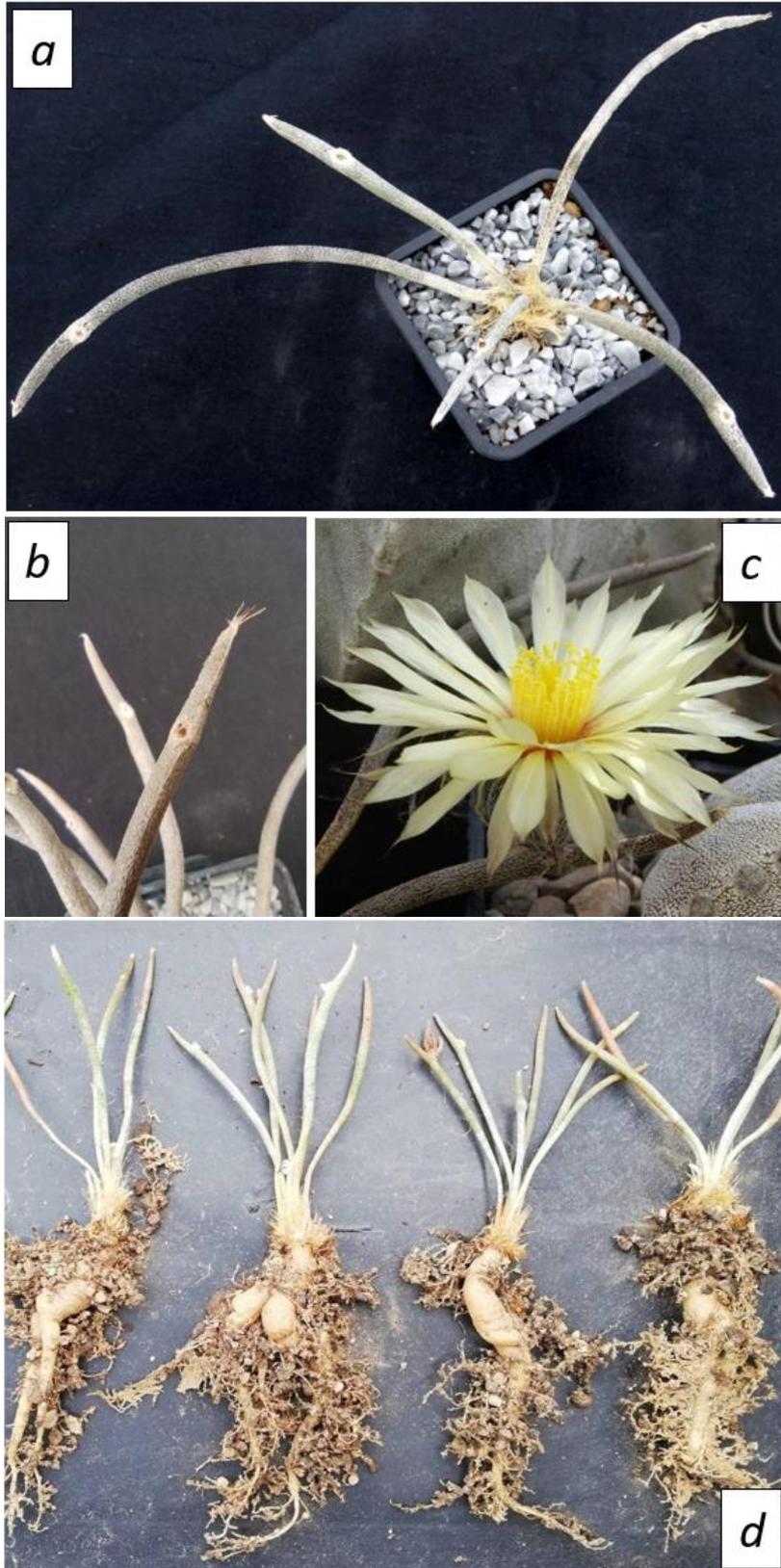


Figura 6. *A. caput-medusae*: (a) ejemplar de *A. caput-medusae*, (b) detalle de estigmas y espinas y (c) flor. (e) Plantas enteras donde se aprecia el sistema radicular. Cortesía de C. C. Olmos.

1.1.1.3 Especies de *Astrophytum* no amenazadas

Entre las especies de *Astrophytum* que no se encuentran amenazadas o en peligro de extinción en su hábitat, encontramos: *A. myriostigma*, *A. coahuilense*, *A. capricorne* y *A. ornatum*.

A. myriostigma (**Figura 7a**) se distribuye ampliamente en los estados mexicanos de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango. Es generalmente globular, con 5 costillas muy marcadas y su tallo verde está recubierto por tricomas escamosos y blanquecinos que le confieren una coloración grisácea. Este cactus no presenta espinas y sus flores son de color amarillo.

A. coahuilense (**Figura 7b**) se distribuye por la zona noreste de Durango y sureste de Coahuila, siendo este último el estado que da el nombre a la especie. Es una especie de crecimiento lento y tampoco muestra desarrollo de espinación. Se distingue del *A. myriostigma* por sus estigmas lanosos; su color y forma le permiten de camuflarse muy bien en su hábitat.

A. capricorne (**Figura 7c**) se encuentra en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas; tiene un porte globular-elongado y puede llegar a unos 85 cm de altura. Presenta espinas largas y enmarañadas y su tallo está habitualmente recubierto por una capa espesa de tricomas blancos.

A. ornatum (**Figura 7d**) se encuentra en los estados de Hidalgo, Querétaro y Guanajuato; tiene un porte columnar que puede desarrollarse hasta los 1,8 metros de altura y es el cactus más resistente entre los *Astrophytum*. Es de color verde oscuro y presenta un alto número de costillas con espinas (amarillas o grises) distribuidas de forma radial.

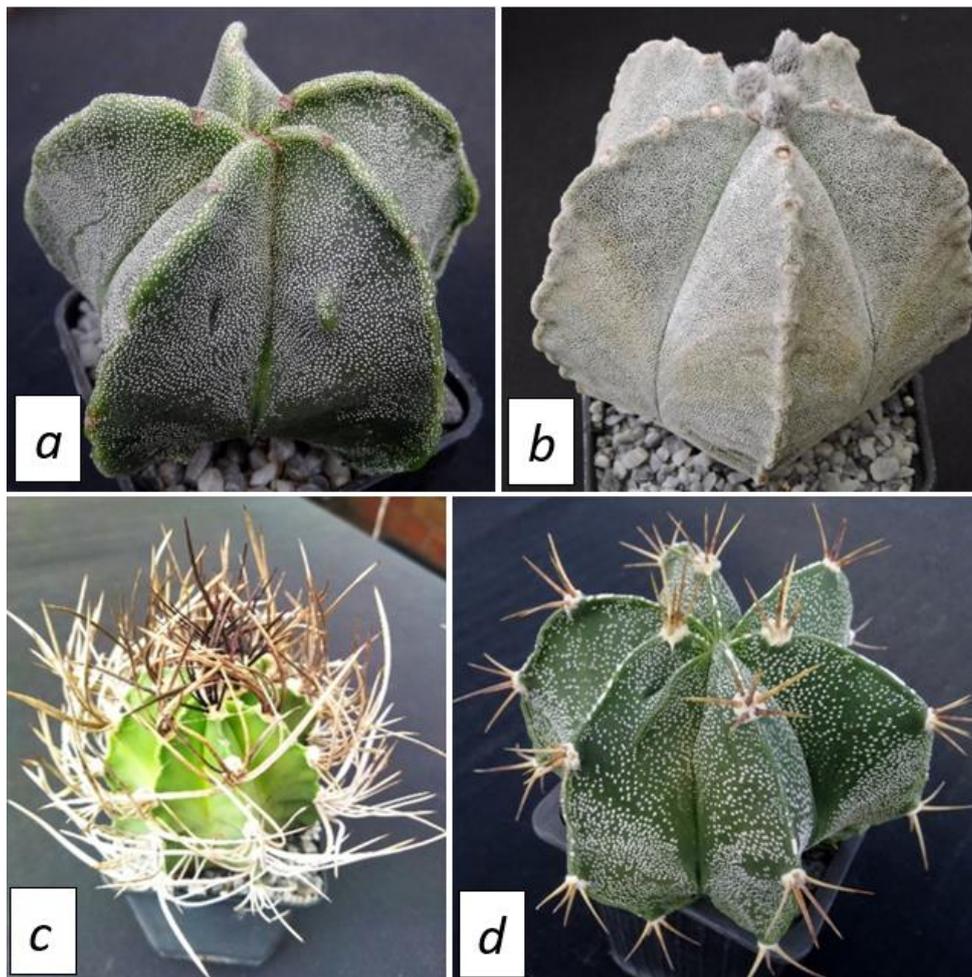


Figura 7. Ejemplares de (a) *A. myriostigma*, (b) *A. coahuilense*, (c) *A. capricorne*, (d) *A. ornatum*.

1.1.2 Hábitat

La gran variabilidad observada en las características morfológicas dentro del género *Astrophytum* es el resultado de las adaptaciones adquiridas por las especies a lo largo de su evolución. Esto ha permitido que cada especie haya podido enfrentar los desafíos de su entorno específico y ocupar su nicho ecológico.

Como ya se ha mencionado, las poblaciones silvestres del género *Astrophytum* abarcan una gran área geográfica de América central, distribuyéndose desde cerca del nivel del mar hasta una altitud de 2700 metros. En cuanto a los rangos de temperatura y precipitación, estos varían entre 12°C y 25,4°C para la temperatura media anual, y entre 165 mm y 934 mm para la precipitación anual. En general las plantas se pueden encontrar en áreas abiertas, entre rocas y en grietas, a veces protegidas por la sombra de otras plantas. Las especies *A. myriostigma*, *A. capricorne*, *A. coahuilense* y *A. ornatum* son ampliamente distribuidas en el desierto de Chihuahua, un área que se caracteriza por condiciones de aridez extrema y suelos arenosos o rocosos, poco fértiles ya que son fuertemente erosionados por los vientos y la falta de cobertura vegetal, con una exposición prolongada al sol, donde los largos periodos de sequía se alternan con lluvias esporádicas que llegan a provocar inundaciones.

A. asterias y *A. caput-medusae* se distribuyen en el área del mezquital tamaulipeco, una zona de transición entre el desierto y los ecosistemas más húmedos, con un clima que puede variar de semiárido a subhúmedo: estas condiciones ambientales son bastante inusuales para especies de la familia de las cactáceas. La vegetación de esta zona, dominada por la presencia del mezquite (*Prosopis spp.*), comprende diversas especies de arbustos y plantas herbáceas adaptadas a las condiciones semiáridas, con suelos que suelen ser más fértiles respecto a los de la zona desértica adyacente.

1.2 Importancia en el mercado ornamental

En los últimos años, la demanda de cactus ha experimentado un crecimiento destacado en el mercado de planta ornamental (Torres-Silva *et al.*, 2021). Entre ellos, el género *Astrophytum* es altamente valorado en debido principalmente a su atractivo estético, adaptabilidad al cultivo en macetas y enorme variedad de formas y colores.

Existen dos tipos de mercado asociados al comercio de cactáceas, con características y dinámicas propias que los distinguen: el primero es el mercado de plantas ornamentales, o mercado al por mayor, donde muchísimos ejemplares propagados en masa se venden a precios relativamente bajos (**Figura 8**). Los clientes son viveros, centros de jardinería, tiendas de plantas y proveedores mayoristas, que se enfocan principalmente en variedades comunes y populares que tienen alta demanda.

Entre las especies del género *Astrophytum*, *A. ornatum* y *A. myriostigma* son las que tienen una demanda más elevada en el mercado al por mayor.



Figura 8. semilleros de (a) *A. asterias*, (b) *A. caput-medusae* y (c) *A. coahuilense*.

El segundo tipo de mercado está asociado al coleccionismo. Este mercado se enfoca en especies particulares, diversos cultivares o incluso rarezas botánicas, que muchas veces resultan difíciles de encontrar. Atrae a coleccionistas privados, botánicos, investigadores y entusiastas de las cactáceas.

El género *Astrophytum* es el favorito de una gran cantidad de coleccionistas, particularmente asiáticos. De hecho, algunos de los coleccionistas y productores se dedican exclusivamente a los *Astrophytum*. La gran variabilidad natural de estos cactus es una cualidad que ha sido empleada bajo condiciones de cultivo para generar multitud de variantes morfológicas e híbridos. Además, la facilidad con la que hibridan determinadas especies ha dado origen a toda una gama de formas y colores intermedios, así como a nuevos cultivares que se diferencian por características como el número de costillas, la falta de espinas, etc... (Figura 9). Así pues, hoy en día se pueden encontrar cultivares e híbridos que alcanzan un valor muy elevado en el mercado de los coleccionistas por su aspecto curioso y sobre todo por su rareza; son un ejemplo los cultivares *A. myriostigma* cv. Huboki, *A. capricorne* v. *senile*, *A. ornatum* cv. *Fukuryu Hakujo*, *A. asterias* cv. *Superkabuto*, entre muchos (Figura 9).

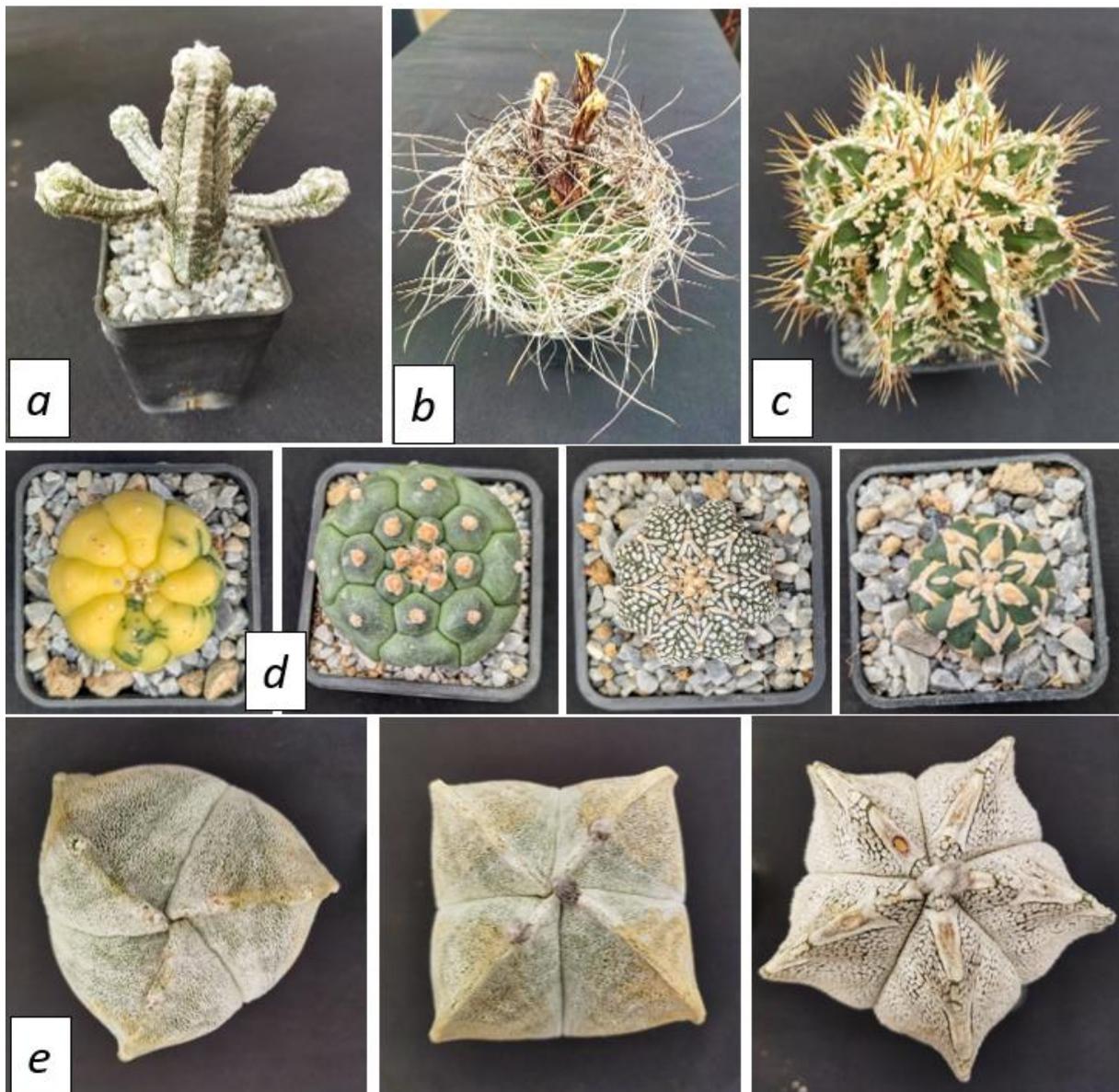


Figura 9. Cultivares de *Astrophytum* con interés ornamental: (a) *A. myriostigma* cv. Huboki (b) *A. capricorne* v. *senile*, (c) *A. ornatum* cv. *Fukuryu Hakujo*, (d) *A. asterias*: *Variegata*, *Kikko*, *Superkabuto* s. *Star Shape* y *Superkabuto* s. *V Type*; (e) plantas seleccionadas de *A. coahuilense* con tres, cuatro y cinco costillas.

Uno de los aspectos más apreciados por los coleccionistas es la novedad, y las especies recién descubiertas se incluyen en este grupo, adquiriendo rápidamente valores altísimos en el mercado. Desafortunadamente, esto provoca que, tan pronto se descubren nuevas poblaciones de cactus, y antes de que se pueda aplicar una regulación estricta, surja un comercio ilegal que lleva al saqueo de los individuos, los cuales ya suelen estar presentes en números reducidos (Pérez Molphe Balch *et al.*, 2015).

Los coleccionistas pueden normalmente adquirir plantas a través de subastas, ventas privadas y tiendas especializadas que garantizan la legalidad y sostenibilidad de su origen, pero muchas veces la escasez de algún tipo de planta en este mercado fomenta el comercio ilegal y la sobreexplotación de poblaciones silvestres, poniendo en riesgo su conservación.

La legalidad y la trazabilidad de las plantas también influyen en el precio de venta: un origen conocido y el cumplimiento de las regulaciones de comercio internacional suelen añadir valor a la planta, debido a la seguridad y la legitimidad de su adquisición.

En este conjunto de plantas “nuevas” destaca el *Astrophytum caput-medusae*, que se convirtió en una de las especies de cactus más buscadas por los coleccionistas a nivel mundial a principios de los años 2000. Un riesgo enorme para la supervivencia de sus reducidas poblaciones.

1.3 Importancia desde el punto de vista ecológico

Las plantas del género *Astrophytum* ocupan nichos ecológicos específicos y tienen un rol fundamental en el mantenimiento del equilibrio biológico del ecosistema en el cual viven. Como muchos otros cactus, juegan un papel determinante desde muchas perspectivas: desde la capacidad de conservación del agua y la provisión de hábitat para diversos animales, hasta la polinización y la relación simbiótica con otros organismos (U.S. Fish and Wildlife Service, 2018). Además, los frutos, semillas y brotes de los cactus son una fuente importante de alimento para aves, mamíferos, insectos y reptiles (Carrillo-Ángeles, 2016).

Un estudio realizado por Blair y Williamson en 2008 muestra la estrecha conexión entre *A. asterias* y varios insectos polinizadores, entre ellos siendo el más efectivo la abeja *Diadasia rinconis*. El estudio demuestra que *A. asterias* depende de sus polinizadores para mantener poblaciones viables, y a su vez estos polinizadores requieren las fuentes de polen de estos cactus para reproducirse y sostener sus propias poblaciones. Estas relaciones interdependientes hacen que la conservación de estas especies sea crucial para la salud y el funcionamiento de estos frágiles ecosistemas.

1.3.1 Cambio climático, depredadores y enfermedades

Si bien la presencia de los *Astrophytum* fomenta el desarrollo de biodiversidad en el hábitat, proporcionando refugio y alimento para una gran variedad de especies animales, no todos los seres vivos que sacan ventajas de ellos son beneficiosos por la sobrevivencia de las poblaciones de estos cactus.

Entre los factores ecológicos que provocan disminuciones en la supervivencia de los individuos en poblaciones de cactus, se encuentran algunos herbívoros como insectos y pequeños mamíferos que se nutren de estas plantas y algunos patógenos o plagas, que las debilitan con enfermedades.

De hecho, Martínez-Ávalos *et al.* (2007) evaluaron la tasa de mortalidad en poblaciones de *A. asterias* en función de la presencia del fitopatógeno *Phytophthora infestans*, escarabajos de la familia Cerambycidae y la ardilla terrestre *Spermophilus mexicanus* (**Figura 10**). Concluyeron que el daño por la combinación de patógeno y herbívoro puede significar una reducción de más del 50% de los individuos en las poblaciones naturales y, que estas mermas provocan fluctuaciones demográficas estocásticas que suponen un aumento del riesgo para la pervivencia de ciertas poblaciones. Esta situación es lógica, dado que una disminución del tamaño poblacional supone una reducción en la variabilidad genética, que podría llevar a un riesgo de extinción en condiciones ambientales cambiantes (De Castro y Bolker, 2005).

Las interacciones bióticas (competencia y depredación) juegan un papel menor como factores causales en el peligro de extinción de una especie si se comparan con otras amenazas más peligrosas como pueden ser la destrucción del hábitat o la recolecta ilegal (Foin *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2006). A pesar de eso, es igualmente de gran importancia identificar estos factores biológicos que influyen en las etapas de vida vulnerables de las plantas amenazadas, para poder proponer planes de recuperación más adecuados que tengan en cuenta la posibilidad de regeneración de las poblaciones.



Figura 10. Entre los depredadores de los *Astrophytum* se encuentran escarabajos de la familia Cerambycidae (izquierda) y la ardilla terrestre *Spermophilus mexicanus* (derecha).

Otros de los factores ecológicos que influyen en la conservación de las poblaciones de *Astrophytum* son los cambios provocados por el cambio climático. El aumento de CO₂ atmosférico derivado de actividades antropogénicas puede acelerar la pérdida de muchas especies de cactus al alterar las condiciones adecuadas para su sobrevivencia (Télliz-Valdés y Dávila-Aranda, 2003; Zepeda-Martínez *et al.*, 2013). Entre los efectos más significativos del cambio climático se encuentran el aumento del estrés térmico, sequías frecuentes y prolongadas, lluvias intensas que saturan el suelo y la alteración de los ciclos estacionales con impacto en las fases reproductivas de las plantas y en la distribución de los polinizadores. Así pues, en 2024 se reporta la primera extinción de una especie de cactus (*Pilosocereus millspaughii*) en los cayos de Florida directamente relacionada con el cambio climático (principalmente al aumento del nivel del mar). Desgraciadamente, aunque sigan sobreviviendo poblaciones de este cactus, la diversidad genética asociada a este ecotipo específico de Florida, se ha perdido irremediablemente.

Carrillo-Ángeles *et al.* en 2016 y Cardoza-Martínez *et al.* en 2019, estudiaron la amplitud del nicho ecológico y las implicaciones del cambio climático en la conservación de *A. capricorne*, *A. myriostigma*, *A. asterias*, *A. ornatum* y *A. coahuilense*. El estudio sugiere que la mayoría de las poblaciones de *Astrophytum* experimentarán condiciones cada vez más inadecuadas y extremas, debido al aumento de la temperatura y la reducción de las precipitaciones. En general, se espera que las especies con un nicho más amplio sean más resilientes al cambio climático, mientras las especies con nichos estrechos y con rangos de distribución restringidos estén particularmente amenazadas por las alteraciones climáticas (Brown, 1984; Johnson, 1998). Por esto, Las especies de *Astrophytum* menos afectadas serían aquellas que se han adaptado a un área de distribución más extensa (*A. capricorne* y *A. myriostigma*); por otro lado, la tendencia de *A. ornatum* y *A. coahuilense* a ser más especialistas en el uso del hábitat local, y la distribución más discontinua y reducida de las poblaciones de *A. asterias*, aumentarían la vulnerabilidad de estas especies.

El nicho ecológico de *Astrophytum caput-medusae* es el más reducido de todas las especies del género, debido a que la distribución de la especie en estado silvestre se reduce a una única localidad en Nuevo León (Hernández-Alva *et al.*, 2011). El impacto del cambio climático sobre esta especie no ha sido estudiado todavía, pero resulta lógico esperar que la alteración de las condiciones climáticas pueda llegar a ser críticas para su supervivencia y reproducción.

1.3.2 Amenazas antropogénicas directas

Es crucial considerar el impacto del factor humano y su potencial destructivo sobre las poblaciones de plantas, ya que éste constituye el principal obstáculo para la supervivencia de las poblaciones silvestres de *Astrophytum* y de los cactus en general.

Las amenazas de origen antropogénico son numerosas y pueden tener un impacto destacable; entre las que afectan al entorno natural de los *Astrophytum* se pueden encontrar:

- la expansión urbana y el desarrollo industrial, que llevan a la destrucción de hábitats naturales de forma directa o que los afectan indirectamente por medio de la contaminación del suelo y del agua. La expansión urbana es fuente de preocupación, por ejemplo en Texas, donde Rio Grande City se encuentra a 13 km de las poblaciones de *A. asterias* y el desarrollo de viviendas se está extendiendo hacia sus poblaciones (Birnbaum *et al.*, 2011). La prospección de petróleo y gas es un ejemplo de desarrollo industrial que está llevando a cabo la destrucción de los *Astrophytum* en su hábitat: entre el otoño de 2008 y la primavera de 2009, dos proyectos de prospección sísmica de 260 km² (destinados a detectar reservas de gas) cruzaron poblaciones de *A. asterias*. A pesar de la coordinación entre las compañías de gas y consultores privados conocedores de las poblaciones de estos cactus, alrededor del 10% de las plantas en el área del proyecto fueron destruidas (Janssen *et al.* 2010);
- la conversión de tierras desértica en áreas agrícolas o de pastoreo, que alteran o arrasan completamente el ecosistema. La pérdida de hábitat debido a prácticas de manejo de pastizales se considera una de las mayores amenazas directas a las poblaciones de *A. asterias* en el sur de Texas (U.S. Fish and Wildlife Service, 2003). Así pues, las prácticas comunes de arrancar raíces de la vegetación y plantar pastos (con pastos no nativos) no solo son perjudiciales directamente para *A. asterias*, sino que también disminuyen la abundancia y diversidad de otras especies de cactus que podrían aumentar la calidad del hábitat para los polinizadores de *A. asterias*;
- las actividades recreativas no reguladas en áreas desérticas, como por ejemplo senderismo fuera de los senderos designados, camping sin autorización y uso de vehículos todo terreno, que pueden causar daños físicos a las plantas y al hábitat circundante de forma inadvertida (U.S. Fish and Wildlife Service, 2003).

1.3.2.1 Recolección ilegal de especímenes

Por otra parte, entre los factores que amenazan directamente a las poblaciones de plantas, la más destacada es la recolección ilegal de individuos para el comercio de planta ornamental, negocio que ha llegado a esquilmar poblaciones íntegras de algunas especies de cactus (Anderson *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 2005). Esta circunstancia ha sido confirmada en poblaciones silvestres de *A. asterias* que, a pesar de que es fácilmente propagada comercialmente, continúa siendo amenazada por la recolección de sus ejemplares y la destrucción de su hábitat (U.S. Fish and Wildlife Service, 2003, 2018; Martínez-Avalos *et al.*, 2007; W. Blair, S. Williamson, 2008; M. Reemts, 2014). Como ya se ha visto, *Astrophytum asterias* es un cactus muy popular en el mercado ornamental, sin embargo, la venta de plantas cultivadas en viveros no refleja la situación real de las poblaciones silvestres sometidas a tanta presión que se están enfrentando a una grave disminución en su número y tamaño. A día de hoy la recolección de ejemplares silvestres de *A. asterias* es muy inferior, dado que el expolio tuvo lugar en las primeras décadas sucesivas al descubrimiento de la especie, aunque en este caso concreto, la recolección ilegal no se debe solamente a su atractivo y valor comercial en el mercado, sino sobre todo a un error de recolección por su semejanza con la *Lophophora williamsii* ((Lem.) J.M.Coult.) (M. Terry, D. Price, J. Poole, 2007); de hecho, en su lugar de origen, la gente se refiere a *A. asterias* como “Peyotillo” o “falso peyote” debido al parecido con este cactus (**Figura 11**).



Figura 11. Semejanza entre el peyote, *Lophophora williamsii* (izquierda), y *Astrophytum asterias* (derecha).

Con respecto a *A. caput-medusae*, la recolección ilegal se debe principalmente al hecho de ser una especie recientemente descubierta. Las poblaciones de esta especie han sido saqueadas de forma intensa desde que fue descrita en 2002 (Hernández-Alva *et al.*, 2011).

En general, el mercado negro asociado a la recolección ilegal de especies protegidas representa un grave problema que amenaza la supervivencia de muchas plantas y animales en peligro de extinción (USFWS 2003). Este comercio irregular no solo pone en riesgo la biodiversidad al reducir drásticamente las poblaciones silvestres, sino que también dificulta los esfuerzos de conservación y recuperación de las mismas.

Durante las últimas décadas, se sabe que aproximadamente 60 especies de cactus han sido recolectadas ilegalmente, principalmente especies de los géneros *Astrophytum*, *Ariocarpus*, *Lophophora* y *Turbincarpus* (Bárceñas, 2003). Pero, además, el comercio ilegal continúa amenazando a muchas especies de cactus de distribución limitada y cuya conservación es motivo de preocupación en el Desierto Chihuahuense de México.

El comercio ilegal de especies de cactus es el síntoma de una combinación de problemas:

- leyes mexicanas confusas y frecuentemente contradictorias que representan una barrera para el establecimiento de un sistema funcional de reproducción de plantas;
- la falta de una aplicación estricta de las leyes mexicanas existentes para desalentar a las personas, particularmente a los coleccionistas privados extranjeros, de recolectar y llevar a sus países cactus protegidos;
- la ausencia de un número suficiente de viveros que propaguen estas especies para cubrir la demanda internacional;
- esfuerzos insuficientes para ofrecer información a los pueblos rurales y comunicarles el beneficio económico y ecológico del cultivo sostenible de cactus.

Estos asuntos requieren de un enfoque holístico, desde la inversión en la propagación comercial, a la conservación de ejemplares *in situ* y *ex situ*, hasta la mejora de la aplicación de la ley y su monitoreo. A menos que se traten conjuntamente todos estos problemas, continuarán disminuyendo irremediamente las poblaciones de cactus en su hábitat (Christopher S. Robbins, TRAFFIC Norteamérica, 2003).

1.4 Conservación de los recursos fitogenéticos

1.4.1 Registro de especies amenazadas

La vulnerabilidad de las cactáceas hace necesarias unas medidas de protección legal que controlen su comercio y unas acciones concretas para mejorar su estado de conservación.

Entre los sistemas y organismos que se ocupan de estas regulaciones destacan los siguientes: la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001). Las tres iniciativas tienen en común el enfoque conservacionista de la biodiversidad y la protección de especies amenazadas o en riesgo de extinción, aunque cada una se centra en diferentes aspectos y ámbitos de aplicación

Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) es un sistema que evalúa el riesgo de extinción de especies de plantas, animales y hongos. Organizaciones conservacionistas y agencias gubernamentales elaboran las Listas para identificar y categorizar las especies según su nivel de amenaza, determinando el grado de peligro de un taxón basándose en varios criterios biológicos y ecológicos, entre ellos el tamaño de la población y el rango geográfico. Estas listas son herramientas importantes para la conservación, ya que ayudan a priorizar acciones y políticas para proteger la biodiversidad y preservar las especies amenazadas (Arias *et al.*, 2005). La información de la IUCN sobre el estado de conservación de las especies puede ser utilizada por agencias internacionales como la CITES o por gobiernos de países específicos.

La CITES es una convención internacional para regular el comercio de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. Fue creada con espíritu de cooperación y actualmente brinda diversos grados de protección a más de 40,000 especies de animales y plantas, ya sea que se comercialicen como especímenes vivos o productos derivados de los mismos (como pieles o hierbas disecadas). La convención fue redactada a partir de una resolución de la IUCN en 1963 y su texto entró en vigor el 1 de julio de 1975. Actualmente cuenta con el beneplácito de 184 miembros. En la CITES se incluyen tres apéndices:

- Apéndice I, que incluye las especies en peligro de extinción, es el más restrictivo; prohíbe el intercambio comercial de especies de plantas, a menos que especímenes de esas especies se produzcan de existencias propagadas artificialmente.
- El Apéndice II incluye especies que no están necesariamente en peligro de extinción, pero que podrían llegar a estarlo si su comercio no se regula. Los especímenes de estas especies, que se obtienen del medio silvestre o han sido propagados artificialmente, pueden intercambiarse comercialmente siempre que se sigan todos los procedimientos gubernamentales y se emitan todas las licencias de exportación.
- El Apéndice III incluye especies protegidas en al menos un país, que ha solicitado la cooperación de otros países para controlar su comercio y exportación.

De las 3000 especies de cactus descritas, unas 73 especies son registradas en el Apéndice I, mientras las demás están incluidas en el Apéndice II. Dentro del género *Astrophytum* únicamente *A. asterias* está incluida en el Apéndice I (1975), fue clasificada como en peligro de extinción a nivel federal en 1993 y por el estado de Texas en 1997 (Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos, 2003); desde 2009, se encuentra clasificado en la Lista Roja de la IUCN como “vulnerable” (Hernández *et al.*, 2017 (IUCN)). Como hemos visto, el expolio de las poblaciones y la destrucción del hábitat sigue poniendo en peligro el futuro de esta especie, y las protecciones legales son parte de las precauciones que pueden salvaguardarlo (Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos, 2003).

A. caput-medusae todavía no se ha incluido en el Apéndice I de CITES; sin embargo, se encuentra descrita en la NOM-059-Semarnat-2010 (de la Norma Oficial Mexicana) en la categoría de Peligro de Extinción y en

la Lista Roja de la IUCN como “en peligro crítico” (Gómez-Hinostrosa & Hernández, 2013 (IUCN)). La inclusión de una especie en una lista y no en otra podría reflejar la necesidad de actualizar y armonizar los sistemas de clasificación, añadiendo poblaciones o especies redescubiertas o recientemente descritas, como es el caso del *A. caput-medusae* (Arias *et al.*, 2005).

Aunque *A. asterias* y *A. caput-medusae* son las especies con un riesgo de desaparecer más elevado, los demás componentes del género tienen también la necesidad de ser protegidos. *A. coahuilense* y *A. ornatum* también están incluidos en la Lista Roja de la IUCN como vulnerables desde 2009 (Fitz-Maurice *et al.*, 2017; Sanchez *et al.*, 2017 (IUCN)). Un estudio de 2013 de Zepeda-Martínez *et al.*, confirmó que las poblaciones de *Astrophytum ornatum* estaban disminuyendo de tamaño. Además, subrayaron la falta de información relativa a la especie y la necesidad de un estudio más pormenorizado de las poblaciones existentes; pero no sólo de *A. ornatum*, sino de todo el género *Astrophytum*. Un resumen de la clasificación de las seis especies de *Astrophytum*, según los diferentes sistemas de evaluación del riesgo y medidas de conservación, se puede ver en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación de las especies del género *Astrophytum* en las tres iniciativas de conservación más importantes.

<i>Especie</i>	<i>NOM-059</i> (<i>Sermanat 2010</i>)	<i>IUCN</i> (<i>IUCN 2017</i>)	<i>CITES</i> (<i>Inskipp & Gillett 2003</i>)
<i>A. asterias</i>	P	VU	I
<i>A. capricorne</i>	A	LC	II
<i>A. caput-medusae</i>	P	CR	II
<i>A. coahuilense</i>	-	VU	II
<i>A. myriostigma</i>	A	LC	II
<i>A. ornatum</i>	A	VU	II

Nota. *NOM-059:* P=En peligro de extinción; A=amenazadas. *IUCN:* LC=Preocupación menor; VU=Vulnerable; CR=En peligro crítico. *CITES:* I=Apéndice I; II=Apéndice II

Si bien la CITES es un acuerdo jurídicamente vinculante para los países miembros, no por ello suplanta a las legislaciones nacionales. Bien al contrario, ofrece un marco legal que cada país debe seguir, promulgando sus propias legislaciones nacionales para garantizar que la CITES se aplique a escala nacional.

En México, país que alberga más de la mitad de las especies de cactus del mundo, existe una legislación propia que ofrece protección a estas especies amenazadas. La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) regula la recolección y el comercio de especies protegidas por el gobierno mexicano (Diario Oficial de la Federación, 5 de marzo, 2002). Junto con la Ley General de Vida Silvestre (Diario Oficial de la Federación, 3 de julio, 2000), tratan del uso sostenible y la conservación de especies silvestres y de sus hábitats. Estas regulaciones prohíben la extracción comercial de especies del medio silvestre que están categorizadas como en peligro de extinción, amenazadas, raras o sujetas a protección especial y se implementan por La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Permiten la cosecha legal con propósitos científicos o para propagación, siempre y cuando se haya obtenido un consentimiento escrito de la agencia federal apropiada.

La implementación del acuerdo CITES y de la legislación mexicana ha revelado numerosos delitos a lo largo de los años, logrando detener operaciones de tráfico ilegal y repatriar muchos especímenes de cactus. En varias operaciones que tuvieron lugar entre 1996 y 2000, por ejemplo, las autoridades de México, EE.UU. y Países Bajos incautaron más de 8000 especímenes de cactus (entre ellos se encontraban más de 300 ejemplares de *Astrophytum*), de los que el 27% resultaron especies sujetas a protección especial (PROFEPA, 2000). Desgraciadamente, esta situación sigue prolongándose en la actualidad. De hecho, en 2021 se realizó una de las incautaciones más espectaculares en Italia, donde se confiscaron cerca de 1500 cactus pertenecientes a géneros amenazados (sobre todo *Eriosyce* y *Copiapoa*) provenientes del desierto de Atacama (Kaminski, 2024).

Estas importantes operaciones demuestran que las medidas preventivas y la aplicación de la ley pueden contribuir a reducir el comercio ilegal y las actividades que amenazan la vida silvestre de los cactus. Sin embargo, las operaciones ilegales descubiertas representan solo una fracción del verdadero mercado negro de especies protegidas o amenazadas. Actualmente, sigue existiendo un expolio masivo y un próspero mercado ilegal, un comercio que además se ve facilitado por el uso de Internet y las redes sociales (INTERPOL, 2021).

1.4.2 Proyectos de conservación

Es de vital importancia evaluar el riesgo e incluir las especies vulnerables en listas oficiales de conservación, pero la protección legal no es suficiente para aquellas poblaciones de plantas que están ya desapareciendo en la naturaleza. En estos casos se requieren acciones concretas para la gestión de las áreas de conservación con un enfoque a la restauración de las poblaciones y de sus hábitats.

Una de las medidas de conservación más populares es la propagación de las plantas y la sucesiva reintroducción de los individuos en el hábitat natural para, de este modo, aumentar el tamaño poblacional y en general la resiliencia del género. Algunos estudios han evaluado el éxito de la reintroducción de cactus de la especie *A. asterias* en el entorno natural (Birnbaum *et al.*, 2011; Departamento de Parques y Vida Silvestre de Texas, 2012), como por ejemplo el ensayo llevado a cabo por Birnbaum *et al.* (2011), que determinaron que las plántulas presentaban una mayor tasa de supervivencia que las semillas sembradas directamente en campo. Estos trabajos evidencian que la reintroducción mediante plantación es una estrategia viable para restaurar las poblaciones de cactus, pero que resulta necesario seguir investigando para conseguir mejorar la eficiencia y sostenibilidad del proceso.

Aunque es importante atender a la propagación, la reintroducción de plantas en los mismos entornos degradados resulta tremendamente compleja (Hobbs, 2007). Así pues, la reintroducción exitosa puede garantizarse solo si se suma a un programa de protección del entorno. Este enfoque, complementario a la reintroducción de ejemplares, incluye diferentes acciones, como: (1) la eliminación de vacíos legales que facilitan el comercio ilegal (Bárceñas, 2006), (2) la implementación de sistemas de monitoreo y vigilancia para asegurar el cumplimiento de la ley, (3) la promoción de áreas de conservación y (4) proyectos de urbanización sostenibles (Carrillo-Angeles *et al.*, 2016). Por otra parte, también deben incluirse programas de concienciación para sensibilizar a las comunidades locales y turistas sobre la importancia de los cactus y fomentar prácticas responsables y sostenibles.

Otro objetivo importante para la conservación es la necesidad de desincentivar la compraventa de plantas expoliadas. Para ello, la capacidad de ofertar plantas a precios accesibles puede ayudar a satisfacer la demanda sin dañar las poblaciones silvestres. En este sentido, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser extremadamente eficientes para abastecer el mercado, ya que aceleran todas las fases de desarrollo de la planta (germinación más rápida, crecimiento acelerado y entrada temprana en fase reproductiva). Siempre que se disponga de un protocolo optimizado, el cultivo de tejidos permite la producción de numerosas plantas a partir de una pequeña cantidad de material vegetal, pudiendo llegar a reducir los costes de producción. Además, esta tecnología permite disponer de especímenes y tejidos para diversos fines sin necesidad de recolectarlos del medio ambiente. El estudio y desarrollo de protocolos efectivos de micropropagación sería crucial para alcanzar estos objetivos, facilitando una producción masiva y sostenible que podría reemplazar la extracción ilegal de plantas silvestres.

En ocasiones, la reducción del tamaño poblacional asociado al deterioro del entorno, obliga a implementar estrategias de conservación *ex situ*. Este tipo de conservación se lleva a cabo fuera del hábitat natural y resulta crucial para complementar los esfuerzos de conservación *in situ*. Este tipo de conservación no permite mantener las interacciones ecológicas y evolutivas, pero sí asegura la pervivencia de determinados genotipos que puedan estar en riesgo extremo de desaparición. Algunos ejemplos de conservación “*ex situ*” son los jardines botánicos, los bancos de semillas y la conservación de tejidos vegetales. Mediante esta

última técnica se puede lograr almacenar material vegetal en crecimiento por medio del cultivo in vitro. A modo de ejemplo, cabe destacar que la Universidad Autónoma de Aguascalientes (México) ha utilizado la técnica de cultivo in vitro para establecer y mantener un banco de germoplasma que incluye 122 especies de cactus mexicanos, mayoritariamente amenazadas, con un elevado valor ornamental (**Figura 12**).

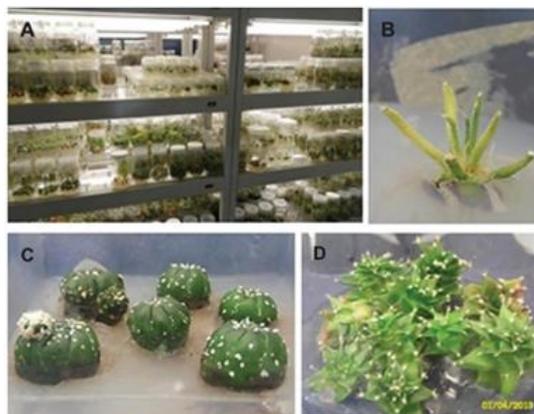


Figura 12. (A) Conservación de cactus mexicanos en el banco de germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; (B) rebrotes de *Astrophytum caput-medusae*, (C) *A. asterias* y (D) *Obregonia denegrii* conservados in vitro (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

Todas estas medidas de conservación y recuperación se han ido aplicando y concretando en el Plan de Recuperación para *A. asterias*, elaborado en 2003 por el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de Estados Unidos. El plan se basa en decisiones de manejo, acuerdos de conservación y programas educativos para mitigar amenazas y recuperar la especie en su área original. En el documento se detallan acciones a largo plazo, incluyendo estudios sobre la biología reproductiva, el tipo de suelo y ecosistemas necesarios para su reintroducción, la búsqueda y establecimiento de nuevas poblaciones y la promoción de cambios legislativos, entre ellos el desarrollo de un acuerdo de conservación entre EE.UU. y México.

Las revisiones del plan publicadas en 2013 y 2018 (U.S. Fish and Wildlife Service, 2013, 2018) indican avances en la investigación y manejo de la especie. El proyecto más exitoso fue llevado a cabo por "The Nature Conservancy", que consiguió proteger a más de 2,500 acres de hábitat. Además, un programa educativo abordó la identificación errónea de *Lophophora williamsii* y *Astrophytum asterias*.

Por otro lado, la reintroducción de individuos no fue muy efectiva, y ninguna de las 33 poblaciones existentes llega el umbral mínimo de 2,500 individuos. Un ejemplo claro del fracaso es el proyecto de reintroducción de 2007 en Las Estrellas Preserve, donde, cinco años después de la siembra, solo sobrevivía el 14% de las plantas reintroducidas (Birnbaum, 2009; Departamento de Parques y Vida Silvestre de Texas, 2012). De forma similar, tampoco se han obtenido avances concretos en la mejora de la cooperación entre los gobiernos de EE.UU. y México.

En cuanto a *A. caput-medusae*, todavía no existe un plan de recuperación oficial para esta especie. Actualmente se propaga en muchos países y, en México, se ha multiplicado en viveros gracias fundamentalmente al "Proyecto *Digitostigma*", creado por uno de los descubridores (Velazco y Nevárez, 2002; CONABIO, 2010); este proyecto es un paso importante para promover la viabilidad a largo plazo de la especie y para abastecer de forma sostenible el mercado y podría en un futuro dirigirse a la reintroducción de la especie en el ecosistema original.

1.5 Métodos de propagación

1.5.1 Métodos tradicionales

En la producción de cactus a nivel comercial se emplean habitualmente métodos tradicionales de propagación (Torres-Silva *et al.*, 2021), como la propagación vegetativa por medio de esquejes o injertos y la propagación sexual a través de siembra de semillas.

En las plantas del género *Astrophytum*, la multiplicación suele abordarse mediante la siembra, ya que las semillas frescas suelen germinar fácilmente y en un elevado porcentaje. La propagación clonal mediante injerto suele llevarse a cabo con el objetivo de mantener un determinado fenotipo de interés.

El uso de injerto es popular sobre todo entre los apasionados que buscan acelerar el crecimiento de las plantas, pero también resulta muy útil para mantener cactus sensibles a la pudrición en buen estado, sobre un portainjerto más resistente (**Figura 13**). El injerto también suele acelerar la floración, por lo que resulta indispensable para reducir los tiempos entre generaciones si se pretende abordar programas de mejora destinados a la obtención de nuevos cultivares.



Figura 13. Ejemplares de *A. asterias* cv. Purple (izquierda) y *A. coahuilense* cv. Kikko (derecha) injertados en *Myrtillocactus geometrizans*.

La siembra de semillas es la forma más utilizada en la producción a gran escala. El género *Astrophytum* se considera fácil de cultivar a partir de semillas si se le proporciona un suelo apropiado, arenoso y ligeramente alcalino, que contenga una baja cantidad de materia orgánica que permita a las plantas resistir mejor los ataques de hongos al sistema radicular (Brack y Gardens, 1992). Los *Astrophytum* se desarrollan lentamente (pocos centímetros por año), por lo que la propagación tradicional podría llegar a sustituirse por técnicas de cultivo más avanzadas que resultaran más eficientes a gran escala. En este contexto, el desarrollo de protocolos de micropropagación específicos podría contribuir a la optimización de la producción y, además, asegurar la conservación de estas especies.

1.5.2 Propagación *in vitro* en cactáceas

La micropropagación es una técnica de propagación que se basa en la totipotencia celular. Permite regenerar plantas enteras a partir de pequeños fragmentos de la planta madre denominados explantes, por

lo que la optimización de protocolos puede permitir la multiplicación a gran escala de un individuo, obteniendo plantas genéticamente idénticas a este (clones).

La regeneración de plantas a partir de explantes se puede producir por dos vías alternativas: la organogénesis (diferenciación de órganos directamente a partir de células o tejidos) o la embriogénesis (generación de embriones a partir de células). La organogénesis puede ser directa o pasar por una fase de tejido desorganizado, el callo, lo que se conoce con el nombre de organogénesis indirecta (Gisbert-Doménech *et al.*, 2008). Sin embargo, la técnica de micropropagación más popular en la producción *in vitro* de cactáceas es la activación de areolas. Esta técnica consiste en estimular la brotación de las yemas axilares contenidas en esas estructuras bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, la presencia de ciertos reguladores del crecimiento). Los rebrotes obtenidos pueden separarse de la planta madre, estimular su enraizamiento y obtener plantas viables para adaptarlas a las condiciones de cultivo *ex vitro* (aclimatación). Además de ser altamente efectiva, con esta técnica la probabilidad de producir alteraciones genéticas (variación somaclonal) es mucho menor con respecto a las primeras vías mencionadas, debido a que no se pasa por una fase de tejido calloso y sólo se estimula el desarrollo de meristemos preexistentes (Vyskot y Jára, 1984). Por ello, cuando se pretende propagar germoplasma de especies silvestres con fines conservacionistas, ésta suele ser la aproximación más acertada.

En el caso de las cactáceas las aplicaciones prácticas del cultivo *in vitro* explotadas son principalmente dos: la conservación de germoplasma y la optimización de la propagación de material a gran escala.

Esta segunda aplicación es particularmente efectiva en taxones de crecimiento lento: por ejemplo, el cactus *Pelecyphora aselliformis*, necesita más de 4 años en la naturaleza para elongar su tallo de 1 cm (Santos-Díaz *et al.*, 2003), mientras que bajo condiciones *in vitro* solo necesita pocos meses (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002). Además, el cultivo de tejidos *in vitro* puede realizarse durante todo el año y permite ajustar las condiciones para aquellas especies con requerimientos concretos.

Los métodos de micropropagación en cactus se han estado desarrollando durante más de 50 años (King 1957; Steinhart 1962), aplicado sobre todo a los cactus de interés hortícola, los cuales se cultivan principalmente por su valor comestible o utilidad en la industria. Dos ejemplos destacados son el nopal (*Opuntia spp.*), conocido por sus hojas comestibles (nopales) y su producción de frutas (higos chumbos), y la pitahaya (principalmente *Hylocereus undatus* (Haw.) D. R. Hunt) cultivada por sus frutos conocidos como fruta del dragón.

Hoy en día hay muchos estudios en los cuales se utiliza la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos para la propagación y el estudio de diferentes cactus, no solo de interés hortícola, sino también de interés ornamental (entre muchos: Vyskot, *et al.*, 1984; Holder, *et al.*, 1984; Ault, *et al.*, 1987; Clayton, *et al.*, 1990; Oliveira, *et al.*, 1995; Batov, 2001; Popovs, 2004; Cherevchenko *et al.*, 2008).

En los últimos años se han también desarrollado estudios de micropropagación en múltiples cactáceas mexicanas amenazadas de los géneros *Pelecyphora* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *Ariocarpus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), *Mammillaria* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007) y *Turbincarpus* (Rosa-Carrillo *et al.*, 2012).

Gracias a todos estos estudios se ha podido observar que cada especie, o incluso subespecie, responde de manera diferente ante las condiciones de cultivo, lo que hace necesario conocer las respuestas de cada una de ellas y desarrollar sistemas de cultivo y propagación masiva *in vitro* particulares para cada taxón (Hubstenberger *et al.*, 1992; Giusti *et al.*, 2002). Por esto, para que la propagación *in vitro* sea una alternativa válida a la propagación de cactus tradicional, es crucial destacar la necesidad de llevar a cabo investigaciones más exhaustivas y detalladas para cada especie en concreto, que permitirían optimizar los procesos productivos.

1. 6 Aplicación práctica del cultivo in vitro

1.6.1 Germinación in vitro

En general, en cactáceas es recomendable iniciar el cultivo in vitro a partir de semillas siempre que sea posible. Se ha comprobado que esta modalidad es mejor que la introducción de tejidos por varias razones: en primer lugar, las areolas de los cactus son zonas muy delicadas y los meristemas se dañan fácilmente con los desinfectantes (una desinfección con lejía al 2% por 25 minutos puede dañar estos tejidos); en segundo lugar, la presencia de espinas y pelos complica la esterilización y es necesario eliminarlos (proceso que puede resultar muy difícil) para realizar una desinfección efectiva de la planta y evitar contaminación (Gratton and Fay, 1999); como último, y especialmente importante en especies en peligro de extinción, la siembra de semillas permite obtener material vegetal sin necesidad de dañar o destruir la planta madre.

Por otra parte, se ha observado que la siembra de semillas directamente en condición in vitro parece acelerar el proceso de germinación respecto a una siembra en sustrato. De hecho, en la tesis de A. Dehesa (2018) se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al tiempo de germinación de semillas de *A. asterias* en condición in vitro (9 días) frente a las cultivadas en invernadero (24 días). Además, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en la condición in vitro (100%) vs ex vitro (40%) (**Figura 14**).

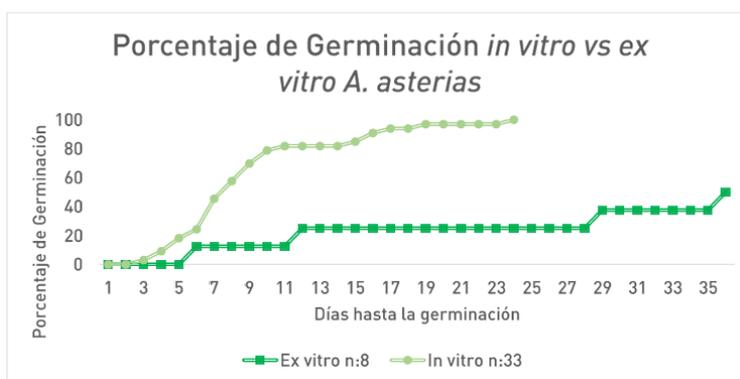


Figura 14. Diferencias en la germinación de semillas de *A. asterias* en condición in vitro y ex vitro (A. Dehesa, 2018).

1.6.2 Uso de reguladores de crecimiento

Para promover la activación de los tejidos vegetales en muchas ocasiones es necesario añadir al medio de cultivo reguladores de crecimiento (PGRs) para generar un ambiente propicio. El uso de PGRs, como las auxinas, las citoquininas y, en menor medida, las giberelinas, pueden favorecer la activación de las yemas axilares de los cactus (Bouzroud *et al.*, 2022). Además, cada hormona tiene funciones específicas en el proceso de cultivo: así pues, las auxinas en general, promueven la elongación celular y el enraizamiento de los explantes; las más frecuentemente utilizadas son el ácido Indolacético (IAA, auxina de tipo natural), el ácido Indolbutírico (IBA, auxina de tipo natural) y el 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D, auxina de tipo sintético), aunque el 2,4-D suele inducir callogénesis y se utiliza en la regeneración de plantas a partir de tejido calloso. Las citoquininas promueven la división celular y la diferenciación y se utilizan para inducir la formación de brotes o de callo. Más utilizadas son la bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (KIN). El ácido giberélico y el ácido abscísico son utilizados en cultivo in vitro con aplicaciones específicas, como pueden ser la superación o activación de la dormancia de semillas y la inducción a floración.

La proporción de auxinas a citoquininas en el medio de cultivo determina el tipo de respuesta del tejido. En general una alta proporción de auxina respecto a la citoquinina promueve el enraizamiento, mientras que una baja relación favorece la formación de brotes. Varias especies de cactus activan las células meristemáticas de las areolas en presencia de citoquininas individuales o en combinación con auxinas a bajas concentraciones (Lema-Rumińska y Kulus, 2014).

Con respecto al género *Astrophytum*, se tienen pocos registros de estudios de micropropagación. La especie más estudiada es *A. myriostigma* de la que hay reportes de regeneración y análisis de crecimiento con reguladores (Vyskot and Jara, 1984, Molphe-Balch *et al.*, 1998; Chablé *et al.*, 2006; Álvarez y Chablé, 2009, Santos *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2014). En esta especie se ha obtenido principalmente organogénesis indirecta utilizando BA en combinación con ANA o con 2,4-D (Garza-Padrón *et al.*, 2010, Pérez Molphe Balch *et al.*, 1998).

De *A. capricorne* se registra un estudio en el que se obtuvo organogénesis utilizando meristemos apicales (Cárdenas *et al.*, 1993) y un estudio de activación areolar donde se obtuvieron resultados utilizando la kinetina BA (3.0 µM) en combinación con 2,4-D a 0.2 µM (Comparán-Sanchez y Luna-Martinez, 2004).

De *A. ornatum* se encuentra un estudio de regeneración *in vitro* donde se obtuvo organogénesis (Mendoza, 2007) y otro estudio en el cual se obtuvieron resultados de activación areolar suplementando el medio con BA (1.0, 2.0 µM) + ANA (2.0 µM) (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

No resulta haber ningún estudio del cultivo *in vitro* de la especie *A. coahuilense*, mientras que el cultivo *in vitro* de *A. asterias* fue objeto de estudio en tres ocasiones (Mancilla-Villanueva, 2014; Gaona-Dehesa, 2018; Lema-Ruminska y Kulus, 2012) y *A. caput-medusae* en dos (Hernández-Alva, 2013 y Camargo-Sánchez, 2017).

Un resumen de los resultados obtenidos en *A. asterias* y *A. caput-medusae* se muestran en la tabla siguiente (Tabla 3):

Tabla 3. Resumen de trabajos previos de cultivo *in vitro* realizados con especies del género *Astrophytum*.

Especie	Origen explante	Tipo de explante	Concentración optima	Tipo de regeneración	Tamaño explante	Referencia
<i>A. asterias</i>	Semillas sembradas <i>in vitro</i>	Cortes longitudinales	7 mg/L 2,4-D / Control (MS)	Embriogénesis somática / rebrotes y rizogénesis	No se describe	Lema-Ruminska, Kulus, 2012
<i>A. asterias</i>	Plántulas provenientes de germinación aséptica	Cortes apicales y longitudinales	MS con ANA 0,5 + BAP 2 mg/L	Rebrotes	“organismos bien desarrollados y grandes”	Mancilla-Villanueva, 2014
<i>A. asterias</i>	Semillas sembradas <i>in vitro</i>	Ápice, hipocótilo, raíces	Control (MS)	Organogénesis indirecta	1 cm altura (4 meses)	Gaona-Dehesa, 2018
<i>A. caput-medusae</i>	Semillas sembradas <i>in vitro</i>	Ápice, secciones de tallo	1,0 mg/L BA + 1 mg/L ANA	Callogenesis; organogénesis directa a partir de la zona apical	3 cm altura (84 días)	Hernández-Alva, 2013
<i>A. caput-medusae</i>	Explantos <i>in vitro</i>	Secciones de tubérculos	(0.5/3.5mg/L ANA/Kin) (0.5/3.5mg/L ANA/BAP) (1.0/5.0mg/L 2,4-D/BAP)	Organogénesis directa (activación de la areola florífera) y callogenesis	No se describe	Camargo-Sánchez, 2017

Nota. 2,4-D=Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA=Ácido Naftalenacético; MS=Murashige y Skoog; BAP o BA=6-bencilaminopurina.

En el caso de *A. asterias*, en el estudio de Mancilla-Villanueva (2014) se obtuvo buena respuesta organogénica directa en fragmentos de plantas cultivados en presencia de dos hormonas combinadas (ANA 0,5 + BAP 2 mg/L). El autor no obtuvo ninguna respuesta morfogénica en el cultivo de fragmentos de callo. Lema-Ruminska y Kulus (2012) indujeron embriogénesis somática en fragmentos de plántulas cultivados en presencia de diferentes concentraciones de 2,4-D (5 mg/L, 7 mg/L y 10 mg/L), mientras obtuvieron organogénesis directa y rizogénesis en medio sin PGRs.

Gaona-Dehesa (2018) cultivó explantes de epicotíleo, hipocótilo y raíces en tres medios; el medio que dio mejores resultados en cuanto a rebrotes fue el medio control (sin PGRs) seguido por el tratamiento BAP/ANA 2/0.5 mg/L, mientras el mejor tipo de explante fue el hipocótilo; los rebrotes se obtuvieron por organogénesis indirecta.

Respecto a *A. caput-medusae*, en la tesis de Hernández-Alva se consiguió respuesta callogénica en algunos explantes (ápice y secciones transversales de tallo) en presencia de alta concentración de citoquininas (BA a 0,5; 1; 2 mg/L) y baja de auxina (ANA a 0; 0,1; 0,5 mg/L), mientras se obtuvieron rebrotes en dos medios (1 mg/L BA + 0,5 mg/L ANA y solo 1 mg/L BA).

Camargo-Sanchez utilizó material ex vitro (secciones superiores de plantas adultas) que cultivó en medio con bajas concentraciones de PGRs obteniendo callo en la zona de corte de los tubérculos, en ningún caso regenerativo, mayoritariamente en presencia de 2,4-D. Pocos explantes dieron una respuesta de organogénesis directa, con rebrotes a partir de la areola florífera en presencia de PGRs distintos (ANA/KIN, ANA/BAP, 2,4-D/BAP). El autor hipotetiza que la especie sea recalcitrante al cultivo in vitro (crecimiento lento y alto contenido en compuestos fenólicos en los tejidos, condiciones de cultivo muy específicas).

Estos estudios pueden proporcionar un punto de partida interesante para el futuro desarrollo de un protocolo de cultivo in vitro adaptado a la propagación a gran escala de estas especies.

2. Objetivo

En este estudio se pretende establecer un protocolo eficiente de propagación in vitro, a partir de diferentes tipos de explantes (planta, plántula y callo), para las especies en peligro de extinción: *Astrophytum asterias* y *Astrophytum caput-medusae*; así como comparar sus respuestas con las observadas en *Astrophytum coahuilense*, una especie actualmente no amenazada y producida en masa a nivel comercial.

3. Materiales y métodos

3.1 Material inicial

3.1.1 Protocolo de desinfección de las semillas

Las semillas de *Astrophytum asterias*, *caput-medusae* y *coahuilense* adquiridas en Cactusloft OE (Valencia, España) fueron esterilizadas superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% durante un minuto, seguido de una solución compuesta por lejía doméstica al 20% (v/v) y polisorbato (Tween-20) al 0,08% (v/v), durante 15 minutos. Posteriormente, las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de una cabina de flujo laminar.

3.1.2 Establecimiento del cultivo *in vitro*

Las semillas esterilizadas se germinaron en placas Petri utilizando medio comercial Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) a una concentración media (1/2 MS; 2,2 mg/L). Este medio se suplementó con sacarosa (10 mg/L) y se utilizó agar (4,5 mg/L) como agente gelificante. Todos los componentes se adquirieron en Duchefa Biochime BV (Haarlem, Países Bajos). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7 antes de esterilizarlo en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

La siembra se realizó en dos tandas con el objetivo de comparar la respuesta de explantes procedentes de plantas de distinto tamaño: las primeras plantas germinadas se cultivaron *in vitro* durante 5 meses y durante ese periodo, se realizó un subcultivo mensual para refrescar el medio. La segunda tanda de semillas se sembró más tarde en las mismas condiciones de cultivo y las plántulas se utilizaron en el experimento a las 4 semanas desde la siembra. De esa manera, se pudo disponer de plantas y plántulas para incluir en el ensayo. Las placas se mantuvieron durante todo el ensayo en una cámara de crecimiento a 26 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas en oscuridad.

3.1.3 Ensayo preliminar

Vista la gran variabilidad de hormonas empleadas en diversos estudios previos del género *Astrophytum*, se realizó un ensayo preliminar con el objetivo de determinar qué combinaciones de hormonas podrían mostrar potencial y utilizarlas posteriormente en el ensayo definitivo. Esta aproximación preliminar se realizó con callos de dos especies (*A. capricorne* y *A. coahuilense*) ya que se disponía de material abundante de las mismas. Se dispusieron tres fragmentos de callo de aproximadamente 1 cm² por placa en medio suplementado con hormonas de crecimiento: dos tipos de citoquinina (BAP 8 μM y KIN 4 μM) combinadas con auxinas a diferentes concentraciones (NAA 0,6 μM; PIC 0,8 μM; IBA 4,9 μM; IAA 11,4 μM y 2,4-D 0,3 μM) (**Tabla 4**). Durante seis semanas se evaluaron las diferentes respuestas de los callos a la presencia de las combinaciones hormonales.

Tabla 4. Diseño experimental del ensayo preliminar.

CITOQUININA	AUXINA	Fragmentos de callo de <i>A. coahuilense</i>	Fragmentos de callo de <i>A. capricorne</i>
KIN 4 μM	NAA 0,6 μM	3	3
	PIC 0,8 μM	3	3
	IBA 4,9 μM	3	3
	IAA 11,4 μM	3	3
	2,4-D 0,3 μM	3	3
BAP 8 μM	NAA 0,6 μM	3	3
	PIC 0,8 μM	3	3
	IBA 4,9 μM	3	3
	IAA 11,4 μM	3	3
	2,4-D 0,3 μM	3	3

Nota. KIN=Kinetina; BAP=6-bencilaminopurina; NAA (o ANA) = Ácido naftalenacético; PIC=Ácido picloram; IBA=Ácido indolbutírico; IAA=Ácido indolacético.

3.2 Diseño experimental

3.2.1 Inducción de brotes por activación areolar

Con el propósito de evaluar el potencial morfogénico de las especies amenazadas *Astrophytum asterias* y *A. caput-medusae*, se estudió el efecto de la citoquinina kinetina (KIN a concentración 4 μ M) en combinación con dos auxinas en diferentes concentraciones, el ácido indolbutírico (IBA: 2.45; 4.9; 9.8 μ M) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0.15; 0.3; 0.6 μ M) en la inducción y producción de brotes. Estos reguladores de crecimiento vegetal se adquirieron de Duchefa Biochime BV (Haarlem, Países Bajos). Se utilizó la especie *A. coahuilense* cultivada en las mismas condiciones para tener un control comercial al cual poder hacer referencia.

Para las especies *A. asterias* y *A. coahuilense* se utilizaron plantas cultivadas in vitro durante 5 meses y plántulas de 4 semanas.

Las plantas se seccionaron longitudinalmente y se eliminaron las raíces, obteniéndose dos explantes por planta (**Figura 15a, c**). Se dispusieron con la parte del corte en contacto con el medio.

Por otra parte, las plántulas se cortaron transversalmente, obteniéndose epicótilos (que contenían la totalidad de las areolas) e hipocótilos (carentes de areolas). Los epicótilos se cultivaron con la zona de corte en contacto con el medio, mientras que los hipocótilos fueron cultivados invirtiendo la orientación natural de la planta (**Figura 15b, d**).

Para la especie *Astrophytum caput-medusae* se utilizaron exclusivamente plantas de 5 meses. Dada su morfología particular, se eligieron como explantes secciones transversales realizando cortes a distintas alturas en las plantas, de modo que se obtuvieron cuatro tipos distintos de explantes: (A) ápices de los tubérculos, (B) parte central de los tubérculos, (C) cuerpo de la planta, que incluía los cotiledones y (D) raíces (**Figura 15e**).

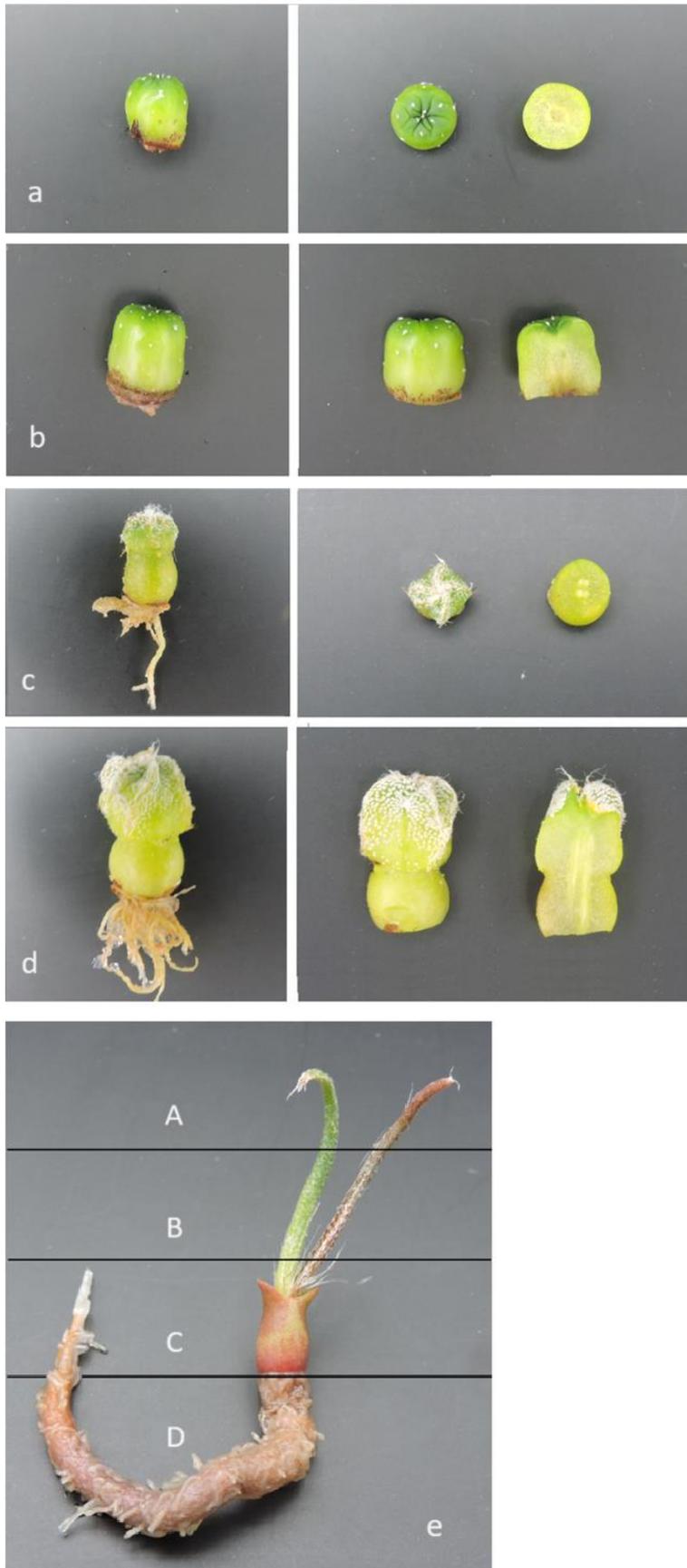


Figura 15. Tipo de explante, diseño experimental: plantas de cinco meses cortadas longitudinalmente: (a) *A. asterias*, (c) *A. coahuilense*; plántulas de cuatro semanas cortadas transversalmente: (b) *A. asterias*, (d) *A. coahuilense*. (e) Los cuatro tipos de explante de *A. caput-medusae*.

Todos los explantes obtenidos se colocaron en placas Petri que contenían medio de cultivo Murashige y Skoog (1/2 MS: 2.2 g/L) suplementado con sacarosa (10 g/L), agar (4.5 g/L), kinetina a 4µM sola o con la respectiva concentración de auxina: bien de ácido indolbutírico (IBA: 2.45; 4.9; 9.8 µM) o de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0.15; 0.3; 0,6 µM). Para cada tipo de explante, se incluyó un grupo de control con medio libre de reguladores de crecimiento vegetal. El periodo de inducción se prolongó durante tres meses, en los cuales los explantes se cultivaron en presencia de los PGRs, los primeros dos meses en medio MS a media carga en presencia de la combinación citoquinina-auxina correspondiente, y el tercer mes, en medio MS a carga completa suplementado solo con la KIN4. Posteriormente, todos los explantes fueron subcultivados a medio MS para continuar con la evaluación de su desarrollo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Medios de cultivo utilizados durante el ensayo principal. En la primera columna se encuentran las denominaciones correspondientes utilizadas sucesivamente para hacer referencia a los medios.

DENOMINACIÓN	Inducción (meses 1, 2)			Inducción (mes 3)			Crecimiento (mes 4, 5)		
	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA
MS	MS ½	-	-	MS	-	-	MS	-	-
A	MS ½	KIN 4 µM	-	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
B	MS ½	KIN 4 µM	IBA 2,45 µm	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
C	MS ½	KIN 4 µM	IBA 4,9 µM	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
D	MS ½	KIN 4 µM	IBA 9,8 µM	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
E	MS ½	KIN 4 µM	2,4-D 0,15 µM	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
F	MS ½	KIN 4 µM	2,4-D 0,3 µM	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-
G	MS ½	KIN 4 µM	2,4-D 0,6 µM	MS	KIN 4 µM	-	MS	-	-

Nota. Hormonas: MS=Murashige y Skoog; KIN=kinetina; IBA=Ácido indolbutírico; 2,4-D=Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

3.2.2 Inducción de organogénesis a partir de callos

Se realizó un ensayo paralelo utilizando callos que se habían obtenido espontáneamente a partir de las plántulas germinadas. En este ensayo se buscó obtener datos valiosos sobre la capacidad de los callos de diferentes especies de *Astrophytum* para regenerar brotes bajo distintas combinaciones de reguladores de crecimiento. Ya que el material era limitado, se hizo un ensayo principal con los callos de *A. coahuilense* (de los cuales se disponía en abundancia) y un ensayo reducido con los callos de *A. asterias* y *A. caput-medusae*.

Los callos, divididos en segmentos de un tamaño de 1 cm² (**Figura 16**), se colocaron en placas Petri de forma análoga al ensayo precedente (medio de cultivo Murashige y Skoog (1/2 MS: 2.2 g/L) suplementado con sacarosa (10 g/L) y agar (4.5 g/L)).



Figura 16. División de callos en fragmentos en condiciones asépticas.

En este ensayo las citoquininas utilizadas fueron dos: KIN a 4 μM y TDZ a 1 μM , mientras las combinaciones de auxinas fueron las intermedias: IBA a 4,9 μM y 2,4-D a 0,3 μM . (**Tabla 6**). El período de inducción se mantuvo durante tres meses, en los cuales los explantes se mantuvieron dos meses en medio MS a media carga en presencia de la citoquinina y auxina correspondiente y un mes en medio MS a carga completa suplementado con la citoquinina (KIN o TDZ según la proveniencia); el periodo de inducción fue seguido de un período de desarrollo en MS a carga completa, similar al ensayo con explantes, para asegurar condiciones comparables.

Tabla 6. Medios de cultivo utilizados durante el ensayo de callogénesis. En la primera columna se encuentran las denominaciones correspondientes utilizadas sucesivamente para hacer referencia a los medios.

DENOMINACIÓN	Inducción (meses 1, 2)			Inducción (mes 3)			Crecimiento (mes 4, 5)		
	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA	MEDIO	CITOQUININA	AUXINA
MS	MS ½	-	-	MS	-	-	MS	-	-
A	MS ½	KIN 4 μM	-	MS	KIN 4 μM	-	MS	-	-
C	MS ½	KIN 4 μM	IBA 4,9 μM	MS	KIN 4 μM	-	MS	-	-
F	MS ½	KIN 4 μM	2,4-D 0,3 μM	MS	KIN 4 μM	-	MS	-	-
H	MS ½	TDZ 1 μM	IBA 4,9 μM	MS	TDZ 1 μM	-	MS	-	-
I	MS ½	TDZ 1 μM	2,4-D 0,3 μM	MS	TDZ 1 μM	-	MS	-	-

Nota. Hormonas: MS=Murashige y Skoog; KIN=kinetina; IBA=Ácido indolbutírico; 2,4-D=Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; TDZ= Tidiazurón.

3.2.3 Diseño del experimento

Para el ensayo de plantas grandes se utilizaron y evaluaron un total de 128 explantes por especie que se dividieron aleatoriamente entre los 8 medios de cultivo. Se incluyeron 4 explantes por placa, por lo que se evaluaron finalmente 16 explantes por condición (**Tabla 5**).

Respecto a las plántulas, se evaluaron un total de 256 explantes por especie, divididos en los 8 medios de cultivo. Se incluyeron 8 explantes por placa, con un total de 32 explantes (16 epicótilos y 16 hipocótilos) por condición (**Tabla 7**).

Disponiendo de un número inferior de plantas de *Astrophytum caput-medusae* respecto a las demás especies, el diseño experimental se realizó con un número menor de tratamientos: además del control sin hormonas y del medio con la presencia de la KIN4, se eligieron las concentraciones intermedias de las dos auxinas (IBA 4,9 μM y 2,4-D 0,3 μM). En cada placa se cultivaron 5 explantes, con 4 repeticiones por tipo de explante, dando un total de 20 explantes por tratamiento y 80 explantes evaluados en total (**Tabla 7**).

En cuanto a los callos, para la especie *A. coahuilense* se utilizaron seis medios de cultivo diferentes (control, solo kinetina, kinetina con IBA, kinetina con 2,4-D, TDZ con IBA y TDZ con 2,4-D) con cuatros segmentos de callo por placa con dos repeticiones por tratamiento; de las especies *A. asterias* y *A. caput-medusae* se disponía de poco material, por lo tanto, se ensayaron fragmentos de callo únicamente en cuatro medios (control, KIN + IBA y KIN + 2,4-D, TDZ+IBA) (**Tabla 7**).

A lo largo de cinco meses, se realizaron evaluaciones mensuales para observar la repuesta organogénica en los varios ensayos (formación de callo y aparición de rebrotes en los explantes de planta, incremento de tamaño y formación de rebrotes en los fragmentos de callo).

Tabla 7. Diseño experimental del ensayo.

Medio de cultivo	<i>A. coahuilense</i>			<i>A. asterias</i>			<i>A. caput-medusae</i>	
	Explantos de cortes longitudinales	Explantos de epicótilo e hipocótilo	Explantos de callo	Explantos de cortes longitudinales	Explantos de epicótilo e hipocótilo	Explantos de callo	Explantos	Explantos de callo
MS	16	32	8	16	32	4	20	4
A	16	32	8	16	32	-	20	-
B	16	32	-	16	32	-	-	-
C	16	32	8	16	32	4	20	4
D	16	32	-	16	32	-	-	-
E	16	32	-	16	32	-	-	-
F	16	32	8	16	32	4	20	4
G	16	32	-	16	32	-	-	-
H	-	-	8	-	-	4	-	4
I	-	-	8	-	-	-	-	-
Total tipo explante	128	256	48	128	256	16	80	16
Total especie	432			400			96	
TOTAL	928							

Nota. MS=medio control sin hormonas; A=KIN 4 μ M; B= KIN 4 μ M+IBA 2,45 μ M; C= KIN 4 μ M+IBA 4,9 μ M; D= KIN 4 μ M+IBA 9,8 μ M; E=KIN 4 μ M+2,4-D 0,15 μ M; F= KIN 4 μ M+2,4-D 0,3 μ M; G= KIN 4 μ M+2,4-D 0,6 μ M; H=TDZ 1 μ M+IBA 4,9 μ M; I=TDZ 1 μ M+2,4-D 0,3 μ M.

3.2.4 Análisis estadístico

A lo largo de este estudio, se llevaron a cabo diferentes análisis estadísticos para evaluar la eficacia de tres métodos clave de propagación en los explantes de *Astrophytum*:

- **Organogénesis directa.** En los explantes de planta grande y plántula se busca la activación del tejido para la producción de rebrotes. La eficiencia se calcula estadísticamente como porcentaje de explantes activos por medio, porcentaje de explantes activos por tipo de corte y con la producción de rebrotes por explante activo (promedio). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas en el número de rebrotes entre los diferentes tratamientos.
- **Callogénesis.** En los explantes desprovistos de areolas (principalmente los hipocótilos) se espera como respuesta la callogénesis, es decir la inducción y proliferación de callo, que permite producir grandes cantidades de tejido para una sucesiva producción en masa de plantas. El éxito se calcula estadísticamente como porcentaje de explantes que forman callo teniendo en cuenta que el callo se pueda desarrollar en la zona de corte, en la zona de contacto con el medio y a partir de areolas. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar asociaciones y patrones significativos en las respuestas observadas.

- **Organogénesis indirecta.** En los fragmentos de callo se quiere inducir morfogénesis, es decir la formación de rebrotes a partir del tejido indiferenciado. Intrínsecamente conectado con la respuesta del apartado precedente, este es el paso sucesivo para la formación de plantas a gran escala.

3.2.5 Enraizamiento y aclimatación

Con el propósito de iniciar el proceso de aclimatación, se aislaron 60 rebrotes de *A. asterias* y 60 rebrotes de *A. coahuilense* con un tamaño superior a los 5 mm y se subcultivaron en tres medios diferentes para promover su enraizamiento. No se incluyó la especie *A. caput-medusae* dado que no se disponía de rebrotes de tamaño suficiente.

Además de un medio control con MS a carga completa, se utilizó un medio suplementado con ácido indolbutírico a 1 mg/L (IBA) y otro con ácido indolacético a 1 mg/L (IAA). Los brotes se mantuvieron en cultivo durante 8 semanas y se realizó un seguimiento semanal para notificar los eventos de rizogénesis.

A los dos meses los explantes enraizados se sacaron de la condición in vitro, se lavaron con agua destilada para eliminar las trazas de agar (**Figura 17**) y se trasplantaron a bandejas de alveolos con sustrato. Al ensayo de aclimatación se añadieron cinco explantes de *A. caput-medusae* provenientes del ensayo principal que habían enraizado espontáneamente (explantes tipo C en medio MS) para evaluar su adaptación a condiciones ex vitro; estos explantes se lavaron y plantaron en sustrato de la misma forma que los de las otras dos especies.

Para evaluar el sustrato más adecuado para la aclimatación, los explantes enraizados se dividieron en dos grupos aleatorios y se plantaron en dos condiciones diferentes: la mitad de ellos en fibra de coco al 100% y la otra mitad en una mezcla de 50% turba y 50% vermiculita (**Figura 17**).

Estas bandejas fueron colocadas en mini-invernaderos con el fin de controlar la humedad ambiental. Durante las dos primeras semanas de aclimatación, se redujo gradualmente la humedad desde el 100% inicial hasta llegar a la humedad ambiente, abriendo gradualmente la tapa del mini invernadero.

Transcurridas dos semanas de cultivo, se retiraron por completo las cubiertas de los mini invernaderos y las plantas continuaron creciendo en las condiciones de la cámara de cultivo mencionadas anteriormente. Estas plantas se mantuvieron en cultivo durante 8 semanas más para poder estudiar su desarrollo y su capacidad de adaptación a condiciones ex vitro.

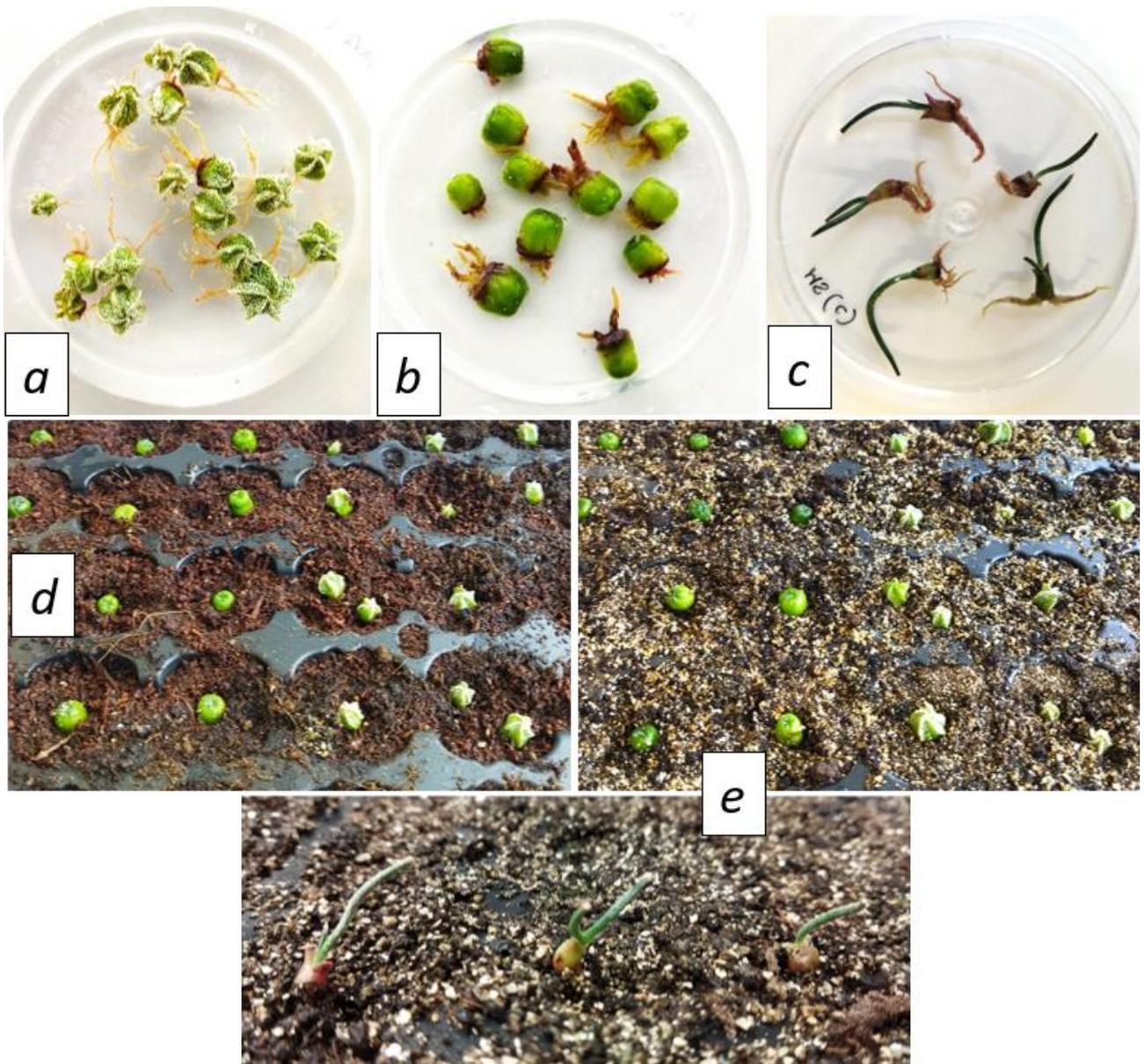


Figura 17. Explantes enraizados, limpiados del agar y listos para la aclimatación: (a) *A. coahuilense*, (b) *A. asterias*, (c) *A. caput-medusae*. Explantes en fase de aclimatación a sustrato: (d) en fibra de coco al 100% y (e) en una mezcla de 50% turba y 50% vermiculita.

4. Resultados y discusión

4.1 Ensayo preliminar

El ensayo preliminar se realizó con fragmentos de callo de las especies *A. capricorne* y *A. coahuilense* obtenidos de forma espontánea tras la germinación de las semillas. Durante las seis semanas en las cuales se evaluó la respuesta de los callos de *A. coahuilense* y *A. capricorne*, se observaron eventos de organogénesis en muchos fragmentos de tejido desorganizado (**Figura 18**). Estos resultados iniciales se emplearon como referentes para desarrollar el ensayo general que incluirá las especies *A. coahuilense*, *A. asterias* y *A. caput-medusae*.

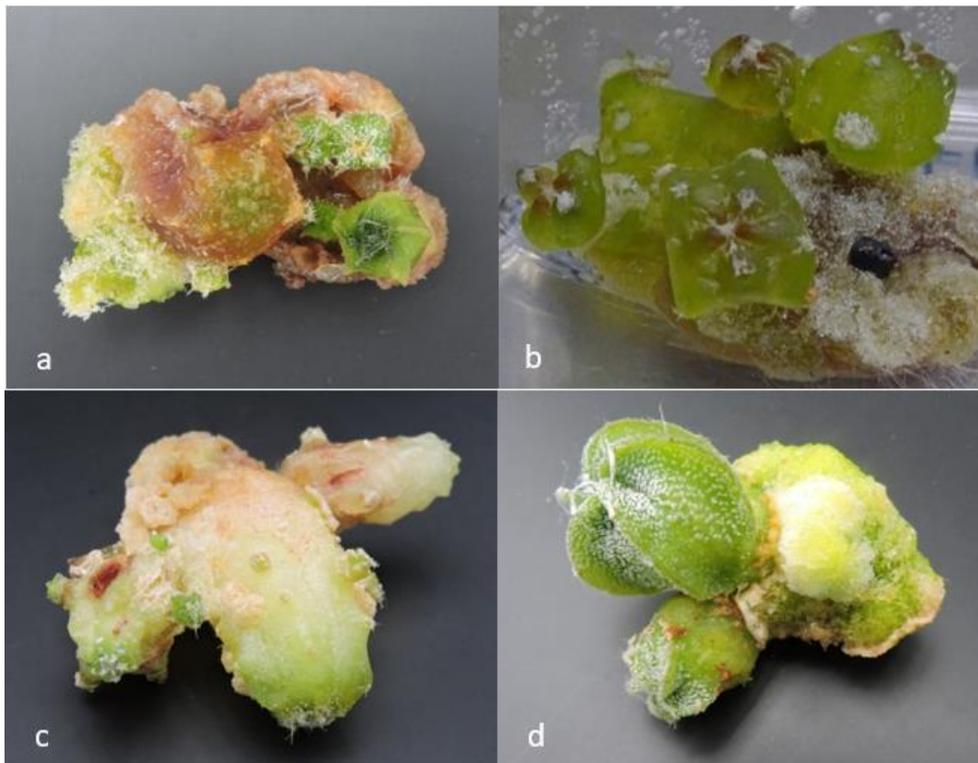


Figura 18. (a) *A. coahuilense* en medio BAP 8 μM + IBA 4,9 μM ; (b) *A. coahuilense* en medio KIN 4 μM + 2,4-D 0,3 μM ; (c) *A. coahuilense* en medio KIN 4 μM + IAA 11,4 μM ; (d) *A. coahuilense* en medio KIN 4 μM + IBA 4,9 μM .

Se evaluó el número de rebrotes por explante en cada uno de los medios, comparando así el efecto de las combinaciones hormonales sobre el tejido vegetal. La disponibilidad de material inicial impidió que el número de réplicas fuera suficientemente grande como para obtener datos estadísticamente significativos, pero sirvió como guía para orientar el siguiente ensayo. Así pues, se buscó la combinación de hormonas de crecimiento más eficaz y prometedora para poder hacer un ensayo más profundo y con un mayor número de repeticiones.

En la **Tabla 8** se comparan los resultados calculando el número de explantes que dieron respuesta y la media de rebrotes calculados contando los explantes activos:

Tabla 8. Resultados del ensayo preliminar: respuesta conjunta de los callos de las especies *A. coahuilense* y *A. capricorne* a medios suplementados con combinaciones hormonales.

Citoquinina	Auxina	Tot explantes	% Explantes activos	Promedio rebrotes (por explante activo)
BAP 8 μ M	NAA 0,6 μ M	6	33%	2,00
	2,4-D 0,3 μ M	6	33%	1,00
	PIC 0,8 μ M	6	50%	2,00
	IAA 11,4 μ M	6	0%	0,00
	IBA 4,9 μ M	6	50%	3,00
Total BAP		32	33%	2,10
KIN 4 μ M	NAA 0,6 μ M	6	83%	2,20
	2,4-D 0,3 μ M	6	83%	2,80
	PIC 0,8 μ M	6	67%	2,25
	IAA 11,4 μ M	6	67%	2,25
	IBA 4,9 μ M	6	100%	3,67
Total KIN		32	80%	2,70

Nota. BAP=bencilaminopurina; KIN=kinetina; NAA=ácido Naftalenacético; 2,4-D=ácido 2,4-diclorofenoxiacético; IAA=ácido Indolacético; IBA=ácido indolbutírico. Los porcentajes se calculan como cantidad de explantes que han dado lugar a rebrotes/total de los explantes. El promedio de rebrotes se calcula únicamente sobre el total de los explantes que han dado respuesta. Los valores resaltados corresponden a las hormonas que han dado mejores resultados.

Comparando el efecto de las dos citoquininas, se observa que en presencia de BAP se activó un total de 10 explantes (33%) con una media de 2,1 rebrotes por explante, mientras que en presencia de KIN se activó un total de 24 explantes (80%) con una media de 2,7 rebrotes por explantes (**Tabla 8**). Estos resultados indican que los callos cultivados en medio suplementado con kinetina (KIN) mostraron una mayor tasa de proliferación celular en comparación con aquellos tratados con 6-Bencilaminopurina (BAP). Esta observación sugiere que KIN podría ser más efectivo en la inducción de brotes en estas especies de *Astrophytum*.

En cuanto a las auxinas, IBA generó una respuesta organogénica elevada en comparación con las otras auxinas, ya que el 100% de los explantes en medio KIN + IBA se activaron. Esto sugiere que la combinación KIN + IBA tiene un alto potencial para ser utilizado en futuros ensayos de propagación in vitro. Además, la media de rebrotes por explante activo indica que las combinaciones de KIN con IBA (promedio de 3,67 rebrotes) y de KIN con 2,4-D (promedio de 2,80 rebrotes) podrían ser las más eficientes en términos de producción. Cabe destacar que el IBA es una auxina natural, mientras que el 2,4-D es sintética, lo cual es un aspecto interesante a evaluar en nuestro ensayo principal, permitiendo comparar la respuesta de los explantes a auxinas de diferente origen.

Los resultados del ensayo principal indican que la utilización de la citoquinina kinetina en combinación con las auxinas IBA o 2,4-D puede ser una estrategia prometedora para la propagación in vitro de *Astrophytum*. Sin embargo, se observó una considerable variabilidad en la respuesta de los callos frente a las diferentes combinaciones estudiadas, circunstancia ya detectada en estudios previos sobre el género *Astrophytum* (Sato & Inoue, 2011; Pérez-Molphe-Balch & Dávila-Figueroa, 2002). Esta situación evidencia la necesidad de una optimización adicional para maximizar la eficiencia del procedimiento, adaptando todos los protocolos a las necesidades específicas de cada especie.

Analizando varios estudios previos realizados en cactáceas se vio que, entre las citoquininas, las más comúnmente utilizadas son la 6-benciladenina (BA), la kinetina (KIN), la 2-isopentenil adenina (2iP) y la

zeatina (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 2012). El tidiazurón (TDZ) se ha utilizado solo muy ocasionalmente, pero se está volviendo cada vez más popular. Estas hormonas pueden inducir organogénesis directa o eventualmente inducir la formación de callos dependiendo de la especie de cactus, la concentración de la citoquinina y la combinación con auxinas (Lema-Rumińska y Kulus, 2014).

La auxina que se incorpora con mayor frecuencia a los medios de crecimiento para inducir la organogénesis es el ácido 1-naftalenacético (NAA), seguido del ácido indol-3-acético (IAA) y del ácido indol-3-butírico (IBA) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Mata Rosas *et al.*, 2001; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). En general, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es útil cuando se pretende promover la formación de callos y/o embriogénesis somática en diferentes explantes y especies vegetales (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 2015).

En 1990, Clayton *et al.* observaron una buena respuesta regenerativa a altas concentraciones de citoquininas (benzilaminopurina y kinetina) en *Escobaria missouriensis*, *Sclerocactus spinosior*, *Pediocactus despainii*, *Pediocactus winkleri* y *Toumeyia papyracantha*. De igual manera, Gratton y Fay (1999), recomiendan el uso de altas cantidades de citoquininas en la familia Cactaceae, para promover respuestas regenerativas. Un estudio de Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2015) confirma que la hormona que ha dado los mejores resultados en *Mammillaria san-angelensis* es la benzilaminopurina, remarcando la eficiencia de esta citoquinina en promover la regeneración de brotes y destacando su relevancia en la micropropagación de cactáceas. Un estudio de Cortés-Olmos *et al.* (2023) en cactus del género *Gymnocalycium* analizó el efecto de tres citoquininas diferentes (KIN, TDZ y BAP) sobre la respuesta regenerativa. Los resultados indicaron que el tidiazurón en general induce calogénesis en los explantes, mientras los mejores resultados en producción de brotes (por medio de activación areolar) se obtuvieron con medio suplementado con kinetina a concentración 4 μM y con BAP a concentración 8 μM .

Por otro lado, los datos recopilados durante el ensayo previo indicaron que las combinaciones de la citoquinina kinetina con las auxinas IBA y 2,4-D tienen un alto potencial para inducir morfogénesis en las especies de *Astrophytum*.

Para la elección de los reguladores de crecimiento y su concentración destinados al ensayo principal, se tomó como referencia en primer lugar a la bibliografía revisada y, en segundo lugar, los resultados obtenidos durante el ensayo preliminar (**Tabla 8**). Finalmente, para el ensayo de organogénesis a partir de fragmentos de callo, se optó por utilizar el TDZ como citoquinina en contraposición a la kinetina, dado los buenos resultados que parece haber dado en otros ensayos de cactáceas descritos en la bibliografía.

4.2 Ensayo principal

4.2.1 Organogénesis directa

Durante el ensayo, se observaron diversas respuestas en los explantes evaluados, tanto para el porcentaje de activación de los mismos, como para el número de rebrotes generado por cada uno de ellos. Los porcentajes de activación y el promedio de rebrotes producidos por los explantes agrupados por especies, se obtuvieron por tipo de explante (**Tabla 9a**) y en función del medio de cultivo utilizado (**Tabla 9b**).

Tabla 9. (a) Datos del ensayo agrupados por especie y tipo de explante, al final del periodo de inducción (mes 3) y al final del ensayo (mes 5). La media de rebrotes es calculada con los explantes que han dado respuesta organogénica. **(b)** Datos del ensayo agrupados por especie y medio de cultivo, al final del periodo de inducción (mes 3) y al final del ensayo (mes 5). La media de rebrotes es calculada con los explantes que han dado respuesta organogénica.

			Final periodo de inducción (3 meses)		Final periodo de crecimiento (5 meses)	
Especie	Tipo explante	N° explantes evaluados	% activación	Media rebrotes	% activación	Media rebrotes
<i>A. asterias</i>	LONG	128	36%	2,26	44%	2,38
	EPI	128	13%	1,35	13%	1,00
	HIPO	128	21%	2,22	37%	1,98
<i>A. coahuilense</i>	LONG	128	47%	2,12	52%	1,85
	EPI	128	27%	2,26	29%	1,57
	HIPO	128	17%	1,32	19%	0,50
<i>A. caput-medusae</i>	Ápice	20	0%	0,00	0%	0,00
	Tubérculo	20	0%	0,00	0%	0,00
	Centro	20	0%	0,00	0%	0,00
	Raíz	20	0%	0,00	0%	0,00

			Final periodo de inducción (3 meses)		Final periodo de crecimiento (5 meses)	
Especie	Medio	N° explantes evaluados	% activación	Media rebrotes	% activación	Media rebrotes
<i>A. asterias</i>	MS	48	13%	1,00	15%	0,71
	A	48	35%	2,12	40%	3,37
	B	48	27%	2,54	42%	1,55
	C	48	19%	2,67	35%	2,88
	D	48	23%	1,73	38%	1,50
	E	48	40%	2,21	44%	2,24
	F	48	25%	1,75	27%	1,08
	G	48	6%	2,00	10%	1,20
<i>A. coahuilense</i>	MS	48	23%	1,82	25%	2,00
	A	48	35%	2,18	40%	1,95
	B	48	40%	3,11	44%	2,52
	C	48	8%	1,00	8%	0,00
	D	48	21%	1,40	25%	0,75
	E	48	60%	2,17	63%	1,73
	F	48	40%	1,47	42%	0,55
	G	48	17%	1,25	19%	0,67
<i>A. caput-medusae</i>	MS	20	0%	0,00	0%	0,00
	A	20	0%	0,00	0%	0,00
	C	20	0%	0,00	0%	0,00
	F	20	0%	0,00	0%	0,00

En el caso de la especie *A. caput-medusae*, no hubo ninguna respuesta organogénica, por lo que las observaciones realizadas se comentarán independientemente. Por otro lado, las especies *A. coahuilense* y *A. asterias* dieron en general una elevada respuesta organogénica, siendo *A. asterias* la especie que destaca significativamente en a promedio de rebrotes por explante.

En las especies *A. coahuilense* y *A. asterias* se observó que el número total de rebrotes fue aumentando durante los primeros tres meses de ensayo (periodo de inducción), así como la media de rebrotes por explante. A partir del cuarto mes, se observó que en *A. asterias* el número total de rebrotes siguió aumentando (**Figura 19a**), mientras la media de rebrotes por explante se mantuvo constante hasta el final del ensayo (**Figura 19b**). Por otro lado, a partir del tercer mes hubo una disminución importante en el número de rebrotes totales en *A. coahuilense* (**Figura 19a**). En esta especie la media de rebrotes por explante activo llega a su máximo en el tercer mes del ensayo y sucesivamente se observa un decrecimiento en el promedio de rebrotes por explante (**Figura 19b**).

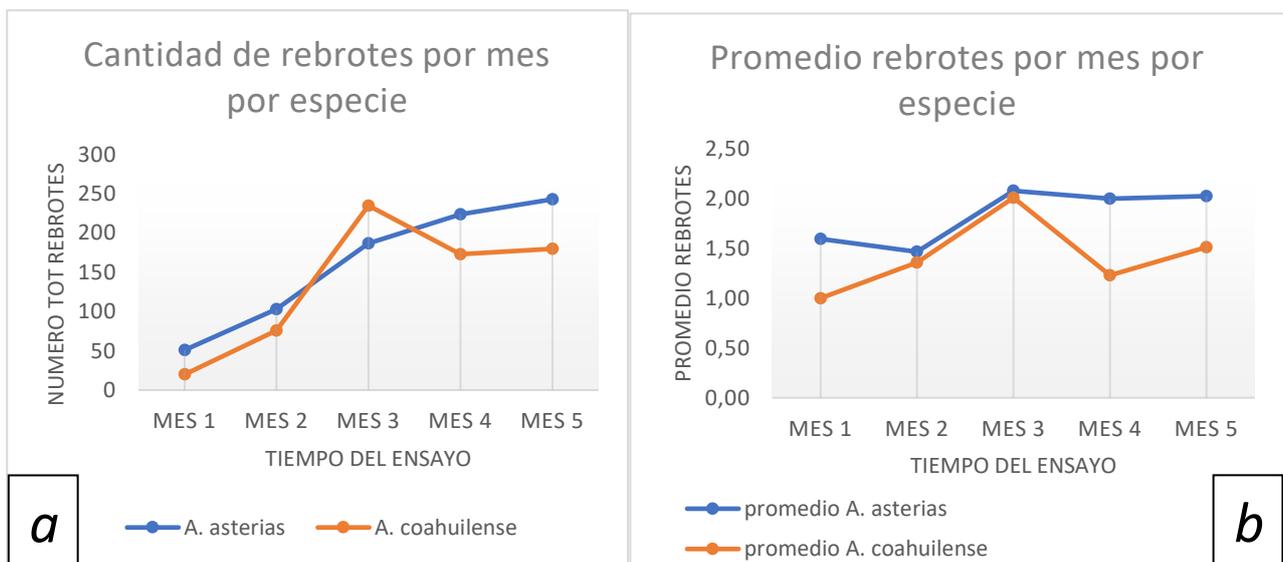


Figura 19. Evolución del número total de rebrotes (a) y del promedio de rebrotes por explante activo (b) durante los cinco meses del ensayo por las dos especies.

Esta disminución en el número total y en el promedio, se debe a que algunos de los rebrotes, mantenidos en condición in vitro, revertía a callo o reventaba por hiperhidratación (**Figura 20**).

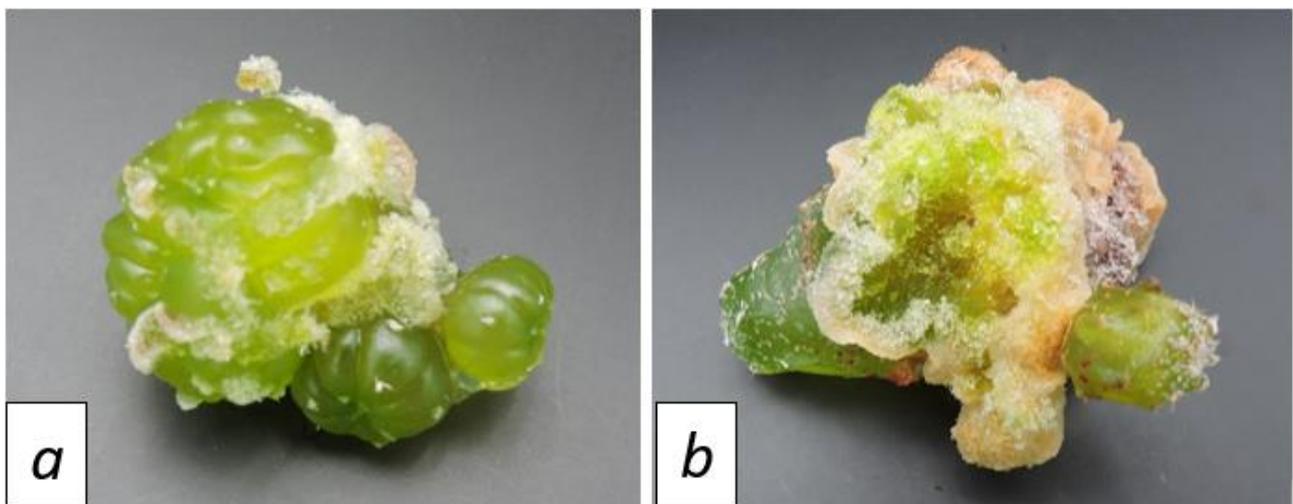


Figura 20. Ejemplo de explante de *A. asterias* con rebrote hiperhidratado (izquierda) y de *A. coahuilense* con rebrote revertiendo a callo (derecha) al final del ensayo (mes 5).

La hiperhidratación es un fenómeno bastante común en cultivos in vitro de cactáceas y otras especies vegetales. Las plantas adquieren una apariencia vítrea, sus células se hinchan y los tejidos se saturan de agua; esto impide que puedan sobrevivir en el suelo (Balen *et al.*, 2012). La vitrificación, que ocurre bajo condiciones de cultivo in vitro como alta humedad, exceso de nutrientes y reguladores del crecimiento, o poca luz, es responsable de este problema (Ziv, 1991). Para mitigarlo, se pueden utilizar varias estrategias, entre ellas la más utilizada es aumentar la concentración del agente gelificante (por ejemplo, incrementando la concentración de agar), lo que reduce la disponibilidad de agua en el medio de cultivo y mejora el intercambio osmótico (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; García-Osuna *et al.*, 2011).

La aparición de explantes hiperhidratados en nuestro ensayo indica que podría ser mejor llevar los rebrotes a aclimatar en cuanto estos tengan el tamaño idóneo, sin esperar el periodo de crecimiento y maximizar la eficiencia de la propagación in vitro.

4.2.1.1 Respuesta específica en producción de rebrotes: tipo de explante

Se utilizó un análisis ANOVA para determinar si las diferencias observadas entre las variables del ensayo eran estadísticamente significativas, lo que permitió identificar el medio de cultivo y el tipo de explante con mejor rendimiento en términos de producción.

Los resultados revelaron que tanto el tipo de explante como el medio de cultivo tuvieron efectos significativos a lo largo de todo el periodo del ensayo, mientras la interacción entre estas dos variables solo tuvo efecto en los tres últimos meses en la especie *A. coahuilense* (**Anexo II y III**).

En el estudio, se observó que en ambas especies (*Astrophytum coahuilense* y *Astrophytum asterias*), los explantes de tipo longitudinal mostraron una mejor respuesta en términos de porcentaje de explantes activos y promedio de rebrotes por explante (**Figura 21**).

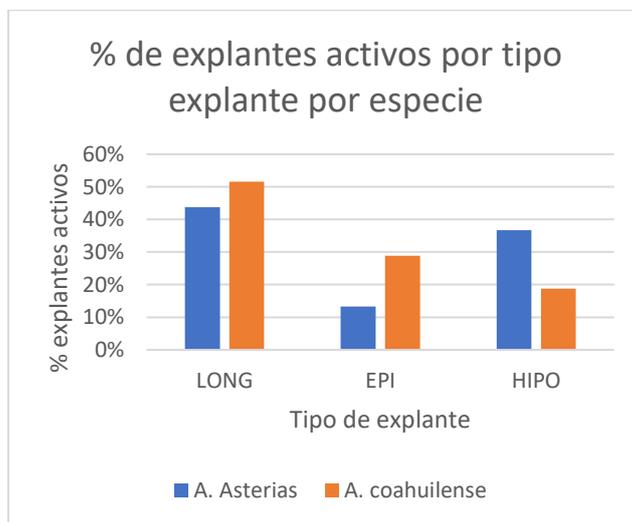


Figura 21. Porcentaje de explantes que han dado respuesta organogenica directa a los cinco meses de ensayo.

En *A. coahuilense*, los explantes longitudinales sobresalieron significativamente en la producción de rebrotes, mostrando valores consistentemente más altos en comparación con otros tipos de explantes a lo largo de todo el ensayo. Entre los explantes de plántulas de esta especie, los epicótilos mostraron mejor respuesta que los hipocótilos (**Tabla 10; Figura 22**).

Tabla 10. Diferencias en promedio de rebrotes por explante activo entre los diferentes explantes en *A. coahuilense*.

Tipo explante	Tot. explantes	Promedio mes 3	P-valor	Promedio mes 4	P-valor	Promedio mes 5	P-valor
LONG	128	0,99±0,14 c	0,0000	0,84±0,16 c	0,0000	0,95±0,16 c	0,0000
EPI	128	0,62±0,13 b		0,42±0,12 b		0,45±0,12 b	
HIPO	128	0,23±0,05 a		0,09±0,03 a		0,09±0,03 a	

Nota. Los valores son medias ± errores estándar. Además, valores seguidos de letras distintas son estadísticamente diferentes para P =0.05; el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

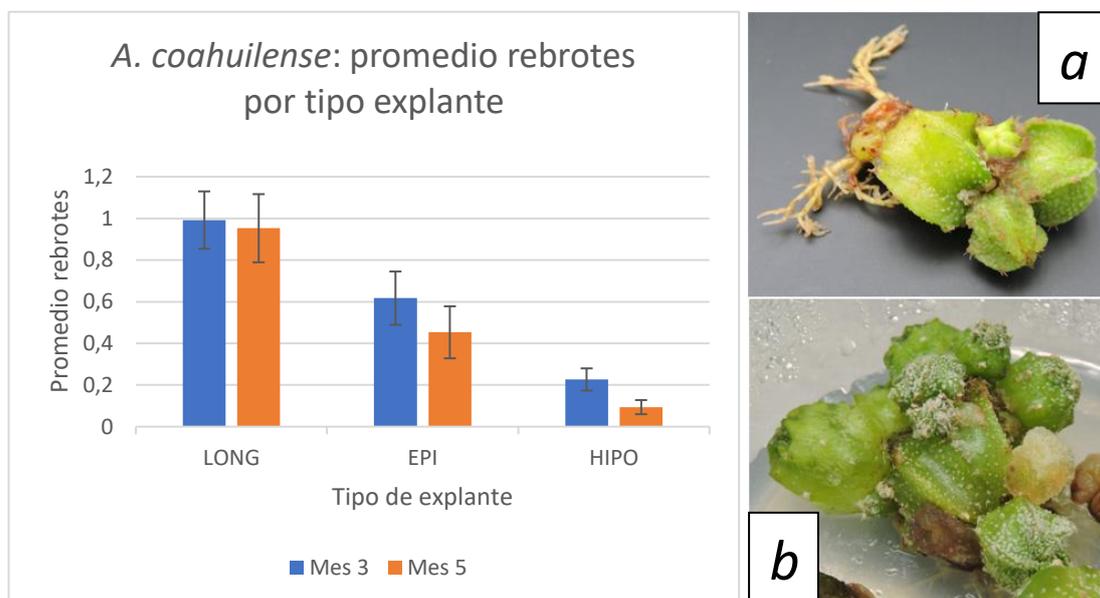


Figura 22. Grafica: representación visual de la respuesta de los diferentes tipos de explantes en cuanto a promedio de rebrotes por explante para la especie *A. coahuilense*. Fotos: explantes de *A. coahuilense* con alta producción en rebrotes ((a) explante longitudinal, medio A; (b) explante longitudinal, medio B).

En *A. asterias* destacaron también los explantes longitudinales, pero, a diferencia de *A. coahuilense*, entre los explantes de plántulas los hipocótilos fueron los que presentaron la respuesta más elevada (**Tabla 11; Figura 23**).

Tabla 11. Diferencias en promedio de rebrotes entre los diferentes explantes en *A. asterias*.

Tipo explante	Tot. explantes	Promedio mes 3	P-valor	Promedio mes 4	P-valor	Promedio mes 5	P-valor
LONG	128	0,81±0,13 b	0,0005	0,93±0,16 b	0,0008	1,04±0,18 b	0,0003
EPI	128	0,18±0,04 a		0,14±0,06 a		0,13±0,05 a	
HIPO	128	0,47±0,14 a		0,68±0,20 b		0,73±0,20 b	

Nota. Nota. Los valores son medias ± errores estándar. Además, valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes para P =0.05; el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

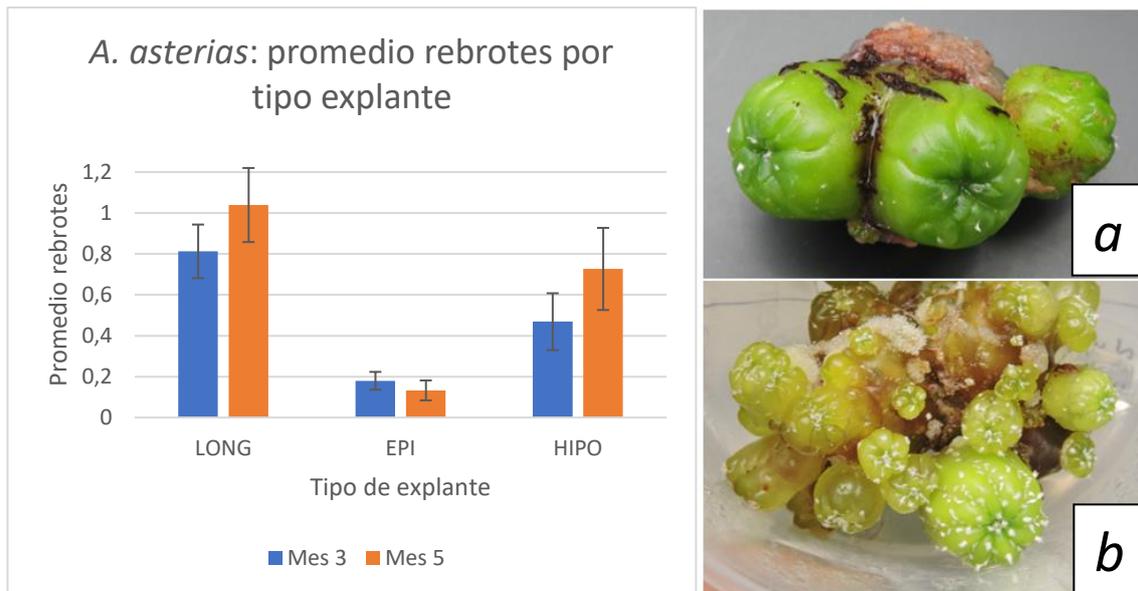


Figura 23. Grafica: respuesta de los diferentes tipos de explantes en cuanto a promedio de rebrotes por explantes activos por la especie *A. asterias*. Fotos: explantes de *A. asterias* con alta producción en rebrotes ((a) explante epicotilo, medio E; (b) explante hipocotilo, medio E).

Estos resultados sugieren que el tipo de explante influye de manera determinante en la capacidad de regeneración de *Astrophytum*. El hecho de que los explantes longitudinales muestren una mayor actividad regenerativa en ambas especies podría estar relacionado con una mejor exposición a las hormonas del medio de cultivo; de hecho, la orientación y la porción específica del explante pueden afectar significativamente el éxito de la organogénesis (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). La diferencia en la respuesta entre los epicótilos en *A. coahuilense* y los hipocótilos en *A. asterias* podría reflejar variaciones en la susceptibilidad de estas zonas a las condiciones del cultivo *in vitro*, lo cual es crucial para optimizar los protocolos de propagación y conservación de estas especies amenazadas.

Los resultados obtenidos contrastan con otros estudios previos donde se había observado una mayor respuesta en plantas más jóvenes. El estudio de Molphe-Balch & Dávila-Figueroa (2002) destaca que en cactáceas como *Astrophytum*, los tejidos más jóvenes responden más favorablemente a las condiciones *in vitro*, lo que conduce a una regeneración más eficiente de los brotes. Un estudio de Cortés-Olmos *et al.* de 2023 sobre la micropropagación de *Gymnocalycium* sugiere que el potencial de producción de rebrotes podría estar inversamente relacionado con el endurecimiento de la epidermis a medida que la plántula se desarrolla (Cortés-Olmos *et al.*, 2023). El estudio de Rubluo *et al.*, (2002) sobre *Mammillaria* muestra que los explantos más jóvenes tienen un mayor potencial de organogénesis en comparación con los más viejos debido a su mayor plasticidad celular.

Sin embargo, en nuestro caso, parece que las plantas más desarrolladas muestran un mayor potencial, lo que podría indicar que la madurez de la planta influye positivamente en su capacidad de regeneración bajo las condiciones de cultivo *in vitro* que se han empleado o que los explantes derivados de plántulas pequeñas eran demasiado jóvenes y no habían desarrollado plenamente las estructuras necesarias, como un número suficiente de areolas, para responder eficazmente a los estímulos hormonales presentes en los medios de cultivo. Esta segunda hipótesis sugiere que el potencial organogénico podría ser más elevado en los explantes longitudinales debido al mayor número de areolas presentes en ellos. Este mayor número de puntos de crecimiento podría facilitar la producción de rebrotes, compensando cualquier desventaja causada por el endurecimiento de la epidermis.

Al comparar la productividad del explante longitudinal con los de epicótilo e hipocótilo, es crucial considerar que, aunque el explante longitudinal produjo más rebrotes, requirió un mayor tiempo para obtenerse (5 meses frente a 4 semanas), trabajo y recursos (lo que supone refrescar el medio de cultivo cada mes). Por otro lado, aunque durante esos 5 meses podrían haberse obtenido 5 tandas de plántulas, esto implicaría un costo adicional significativo por la compra de semillas. Por tanto, se debe balancear la mayor productividad del explante longitudinal con los menores recursos necesarios para los otros explantes, considerando el costo y el tiempo como factores determinantes en la elección del método más eficiente.

4.2.1.2 Dominancia apical

Otro factor importante por considerar en la elección del tipo de corte realizado en las plantas, es la existencia de un fenómeno llamado dominancia apical presente en la mayoría de cactus (Clayton *et al.*, 1990).

La dominancia apical concentra el crecimiento en la parte superior de la planta, lo que suprime el desarrollo de brotes laterales y mantiene las formas columnares o esféricas características de estas especies. Este control hormonal, principalmente a través de la auxina producida en el meristemo apical, limita la proliferación de nuevos brotes laterales (Mauseth, 2006). Para contrarrestar esta dominancia apical en un entorno *in vitro*, se puede recurrir a técnicas como el corte del ápice o la aplicación de reguladores de crecimiento que inhiban la acción de la auxina endógena (Bouzroud *et al.*, 2022; Vyskot & Jára, 1984). Estas estrategias buscan romper el control que el meristemo apical ejerce sobre el resto de la planta, promoviendo así la formación de rebrotes a partir de yemas laterales u otras zonas de la planta. Con este propósito, en las plantas grandes de nuestro ensayo se realizó un corte longitudinal teniendo cuidado de cortar en dos mitades la yema apical.

En el caso de nuestro ensayo, muchos explantes de tipo longitudinal respondieron como si fuesen esquejes, intentando reconstruir las partes del meristemo dañadas. Esto se debe probablemente a que el corte inicial no llegó a fragmentar completamente las células del meristemo, que tendieron a recuperar la estructura apical y, con ello, la dominancia de desarrollo. De hecho, en algunos de estos explantes, en lugar de una activación de las demás areolas con producción de rebrotes o de callo, la yema apical volvió a formar la planta entera (**Figura 24**).



Figura 24. Restructuración de las plantas en explantes de tipo longitudinal de *A. asterias* (a, b) y *A. coahuilense* (c, d).

Las plantas que consiguieron revertir su morfología se distribuyeron aleatoriamente en todos los medios, incluso en el control. Esto sugiere que la restrucción del meristemo apical se debe al corte realizado, que no ha conseguido romper la yema en dos partes exactas, o a la presencia de auxinas endógenas en estas especies. De hecho, el corte de la yema apical puede no ser suficiente para romper completamente la dominancia apical porque las auxinas producidas en los tejidos cercanos pueden continuar promoviendo la inhibición de las yemas laterales. Este efecto hormonal puede ser tan fuerte que incluso la intervención manual no logra contrarrestarlo, manteniendo la dominancia sobre las yemas laterales y controlando el patrón de crecimiento de la planta. Este efecto de las auxinas en la dominancia apical ha sido documentado ampliamente en la literatura, como se observa en los estudios de Cline (1997), donde se describe cómo la presencia de auxinas endógenas puede mantener la dominancia apical incluso después de intervenciones físicas como el corte.

La recuperación de la dominancia apical en los explantes longitudinales es, por tanto, un reflejo de la capacidad de las plantas para mantener sus mecanismos de crecimiento regulados internamente, a pesar de intervenciones externas.

La recuperación de la dominancia apical en explantes de *Astrophytum* es un resultado que ya se había obtenido en el trabajo de Ramírez-Serrano y Teixeira (2008). Estos autores señalan que las cactáceas con un crecimiento monopodial (crecimiento que se desarrolla a lo largo de un solo eje principal), como *A. asterias* y *A. coahuilense*, poseen una dominancia apical fuerte debido a su alto contenido de auxinas endógenas. Para propagar cactáceas con este tipo de crecimiento, recomiendan el uso de un medio sin auxinas pero con

citoquininas, además de la eliminación o daño del ápice para favorecer la activación de las yemas laterales o areolas para que puedan desarrollarse nuevos brotes.

En nuestro estudio, las hormonas empleadas no lograron revertir eficazmente el fenómeno de la dominancia apical. Este efecto se observó incluso en los medios que contenían kinetina y presentaban concentraciones bajas o nulas de auxinas, lo que sugiere que la intervención hormonal no fue suficiente para superar la dominancia apical inherente de los explantes.

4.2.1.3 Respuesta específica en producción de rebrotes: condición de cultivo

En general en el ensayo, las condiciones de cultivo empleadas para promover la organogénesis en los explantes de *Astrophytum* han demostrado ser altamente efectivas. Este resultado es consistente con estudios previos desarrollados en cactáceas, donde las hormonas seleccionadas, como la kinetina y las auxinas IBA y 2,4-D, han mostrado un desempeño favorable en la inducción de respuestas morfológicas similares. Por ejemplo, Hernández-Alva (2013) y González y Martínez (2020) documentaron la eficacia de estas hormonas en la organogénesis y rizogénesis en diversas especies de cactáceas, incluyendo *Astrophytum*.

El objetivo principal de este ensayo era, no solo confirmar la sensibilidad de *Astrophytum* a estas hormonas, sino también identificar un protocolo más específico y optimizado para su propagación. El análisis ANOVA determinó que las diferencias observadas en las respuestas de los explantes a los medios de cultivo eran estadísticamente significativas.

En la especie *Astrophytum coahuilense*, los mejores resultados en producción de rebrotes se obtuvieron con medios que presentaban baja o nula concentración de auxina, lo que da lugar a una alta relación citoquinina/auxina, como en los medios A, B, y E (Figura 25). Este resultado sugiere que un equilibrio hormonal que favorece a las citoquininas sobre las auxinas es más efectivo para estimular el desarrollo de rebrotes en esta especie.

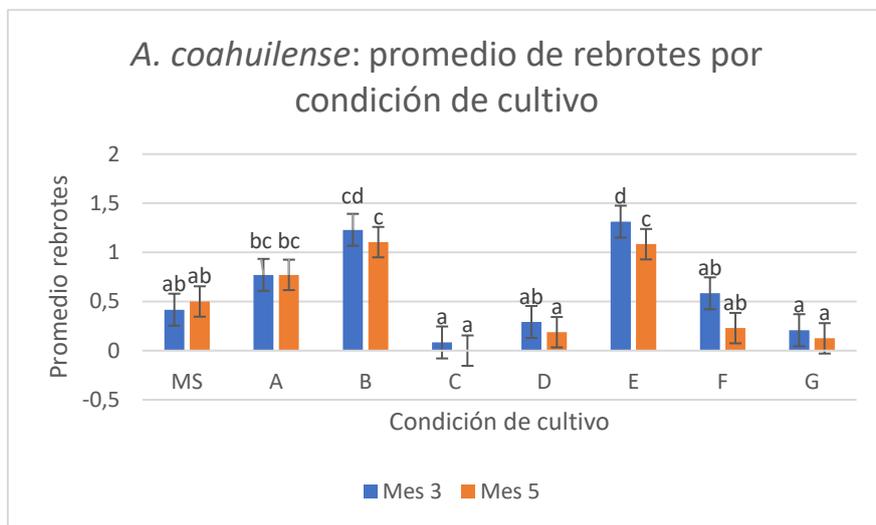


Figura 25. Representación visual de la respuesta de los explantes a los diferentes medios de cultivo en cuanto a promedio de rebrotes por explante por la especie *A. coahuilense*. Nota. Letras de significación: las mismas letras no son estadísticamente diferentes para $P=0.05$; el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

La alta relación citoquinina/auxina podría estar promoviendo una mayor actividad en los procesos de diferenciación celular, favoreciendo la organogénesis, lo que podría ser crucial para la regeneración eficiente de tejidos en *A. coahuilense*. Este hallazgo abre la puerta a optimizar aún más las condiciones de

cultivo, ajustando las concentraciones hormonales para maximizar los resultados y minimizar los recursos necesarios.

Este resultado concuerda con estudios previos, como el de Ramírez-Serrano y Teixeira (2008), que indican que una alta relación citoquinina/auxina favorece la organogénesis en cactáceas monopodiales, al reducir la dominancia apical y promover la diferenciación celular. La alta relación citoquinina/auxina parece ser crucial en este proceso, facilitando una regeneración eficiente de tejidos en *A. coahuilense*, lo que sugiere que ajustar estas proporciones hormonales podría optimizar los protocolos de propagación.

En *Astrophytum asterias*, la respuesta en cuanto a producción de rebrotes ha sido positiva en todos los medios de cultivo probados, excepto en el control y el medio G (kinetina con una alta concentración de 2,4-D) (Figura 26). Destaca entre todos el medio suplementado con sola kinetina (A) ya que parece ser la condición más óptima para la producción de rebrotes en esta especie.

Estos resultados sugieren que la especie posee una buena capacidad de respuesta al cultivo in vitro, mostrando una considerable adaptabilidad a diferentes condiciones hormonales. La capacidad de *A. asterias* para generar rebrotes en la mayoría de los medios indica que esta especie podría ser favorable para programas de propagación in vitro, lo que es un hallazgo prometedor para su conservación y multiplicación en entornos controlados.

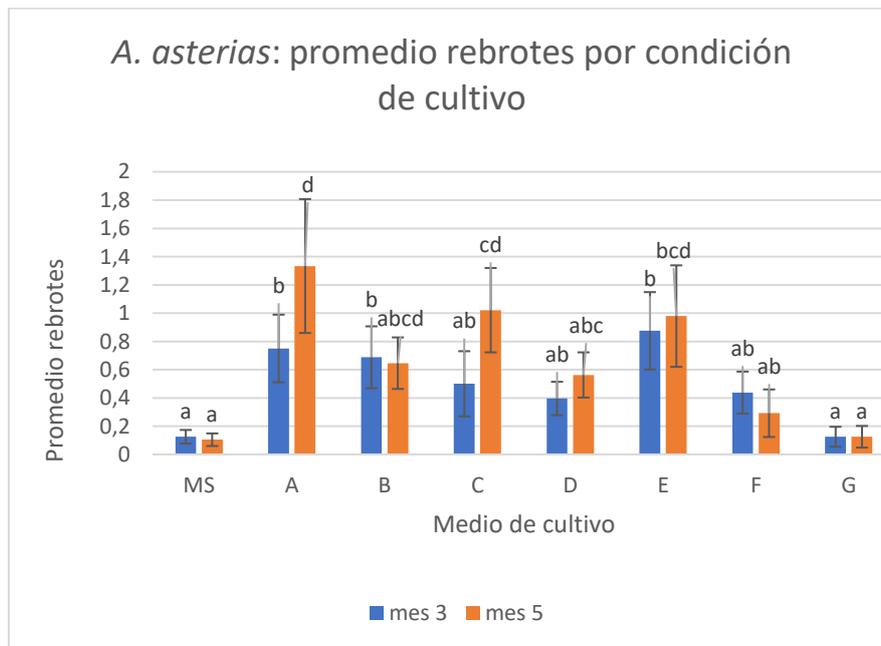


Figura 26. Representación visual de la respuesta de los explantes a los diferentes medios de cultivo en cuanto a promedio de rebrotes por explante por la especie *A. asterias*. Nota. Grupos homogéneos: las mismas letras no son estadísticamente diferentes para $P=0.05$; el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Esta capacidad de *A. asterias* para responder favorablemente a una variedad de condiciones hormonales coincide con lo reportado por Lema-Rumińska y Kulus (2012), quienes observaron que esta especie tiene una notable habilidad para regenerar brotes en medios con diferentes combinaciones de citoquininas y auxinas. No obstante, el bajo rendimiento observado en el medio con alta concentración de 2,4-D podría estar relacionado con el efecto inhibitorio que esta auxina tiene sobre la organogénesis cuando se emplea en dosis elevadas, un comportamiento ya documentado en estudios anteriores sobre cactáceas (Cassells & Curry, 2001).

La adaptabilidad de *A. asterias* a múltiples condiciones hormonales sugiere que esta especie es particularmente adecuada para programas de propagación in vitro, lo que es alentador para su conservación y multiplicación en entornos controlados.

Este enfoque permitió identificar las combinaciones de hormonas que mostraron un rendimiento superior, proporcionando una base sólida para optimizar los protocolos de propagación en las dos especies de *Astrophytum* y una eventual aplicación a otras especies de cactáceas.

4.2.2 Rizogénesis

Otra respuesta observada en los explantes ha sido la rizogénesis, que es el proceso de formación de raíces (**Figura 27**). Si bien la rizogénesis no era el resultado buscado, se tuvo en cuenta su ocurrencia debido al posible impacto en el desarrollo global de los explantes.

Algunos explantes desarrollaron raíces de manera similar a los esquejes, comportándose como si fueran fragmentos de planta destinados a la propagación vegetativa, generando las raíces a partir de las zonas donde normalmente se esperarían. Sin embargo, en otros casos, las raíces se desarrollaron en áreas de la planta que no estaban diferenciadas o especializadas para este propósito, lo que indica una capacidad de la planta para adaptar su crecimiento en respuesta a las condiciones del cultivo in vitro, posiblemente como un mecanismo de supervivencia (**Figura 27c**). Esta capacidad refleja la plasticidad de los explantes vegetales para generar nuevas estructuras incluso desde tejidos que no tienen una función predefinida para el desarrollo de raíces.

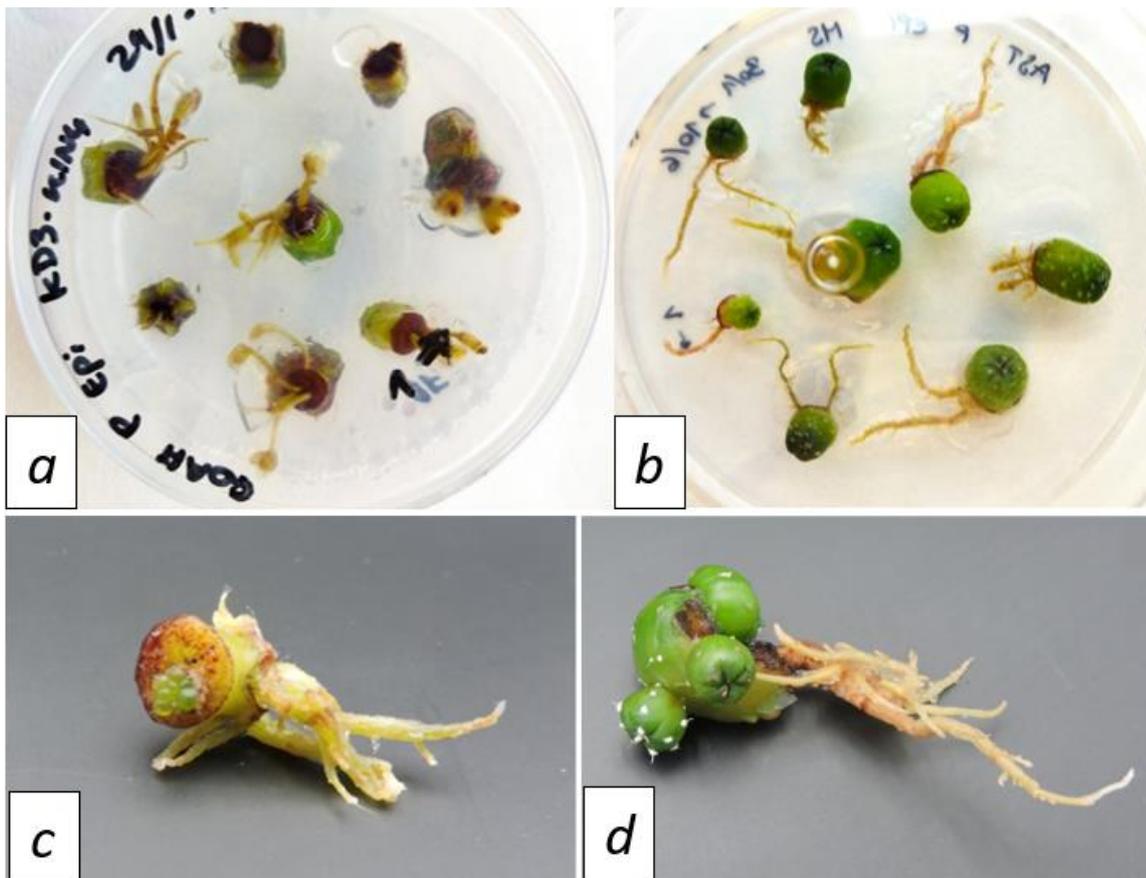


Figura 27. Explantes que han dado respuesta rizogénica. (a, b) Placas con explantes que han desarrollado raíces: epicótilos de *A. coahuilense* en medio F, epicótilos de *A. asterias* en medio A; (c) hipocotilo y (d) explante longitudinal de *A. asterias* en medio C.

En *A. asterias*, los explantes longitudinales fueron los que mostraron una mayor aptitud de enraizamiento, mientras que en *A. coahuilense* destacaron los epicótilos. Los hipocótilos mostraron una menor propensión a la formación de raíces, lo cual podría estar relacionado con la ausencia de areolas, que juegan un papel clave en la regulación hormonal local y en la inducción del enraizamiento, pero sobre todo es importante destacar que estos explantes fueron cultivados en una posición antinatural, lo que probablemente afectó su capacidad para desarrollar raíces de manera efectiva.

Se evaluó una posible relación entre la formación de raíces y la producción de rebrotes en los explantes, comparando los porcentajes de enraizamiento con los porcentajes de explantes que habían dado respuesta organogénica (**Tabla 12**), análisis que reveló algunas observaciones interesantes en las especies estudiadas. En *A. asterias*, los datos mostraron que la distribución de raíces fue bastante homogénea entre los diferentes tipos de explantes, lo que indica que la presencia de raíces no parece influir directamente en la tendencia a formar rebrotes. A pesar de que los explantes longitudinales fueron los más efectivos para generar rebrotes, esta tendencia no parece reflejarse en la presencia de raíces en estos explantes.

En la especie *A. coahuilense* los epicótilos destacaron por su capacidad para formar raíces, aunque su respuesta organogénica fue baja en comparación con otros explantes. Esto sugiere que los epicótilos en esta especie pueden estar activando una respuesta endógena diferente, similar a la de un esqueje, donde el énfasis está en la producción de raíces en lugar de rebrotes. Esta hipótesis se basa en la idea de que las hormonas endógenas en los epicótilos pueden estar promoviendo la rizogénesis en lugar de la organogénesis, lo que podría explicar por qué la formación de raíces no favorece necesariamente la aparición de nuevos brotes.

Tabla 12. Frecuencia de aparición de rizogénesis comparada con la aparición de organogénesis directa en los diferentes explantes de *A. asterias* y *A. coahuilense*.

	Tipo explante	Total explantes	% explantes enraizados	% explantes con rebrotes
<i>A. asterias</i>	LONG	128	57%	44%
	EPI	128	46%	13%
	HIPO	128	41%	37%
<i>A. coahuilense</i>	LONG	128	59%	52%
	EPI	128	72%	29%
	HIPO	128	48%	19%

En cuanto a los medios de cultivo, la respuesta de rizogénesis fue relativamente uniforme, aunque se observaron variaciones notables. En general, los medios que presentaron menores tasas de enraizamiento fueron aquellos que contenían 2,4-D. Esto es consistente con el conocimiento de que el 2,4-D, una auxina sintética, favorece más la formación de callo que la rizogénesis (George *et al.*, 2008), lo que sugiere que las condiciones hormonales del medio juegan un papel crucial en la determinación del tipo de respuesta morfogénica en los explantes (**Figura 28**).

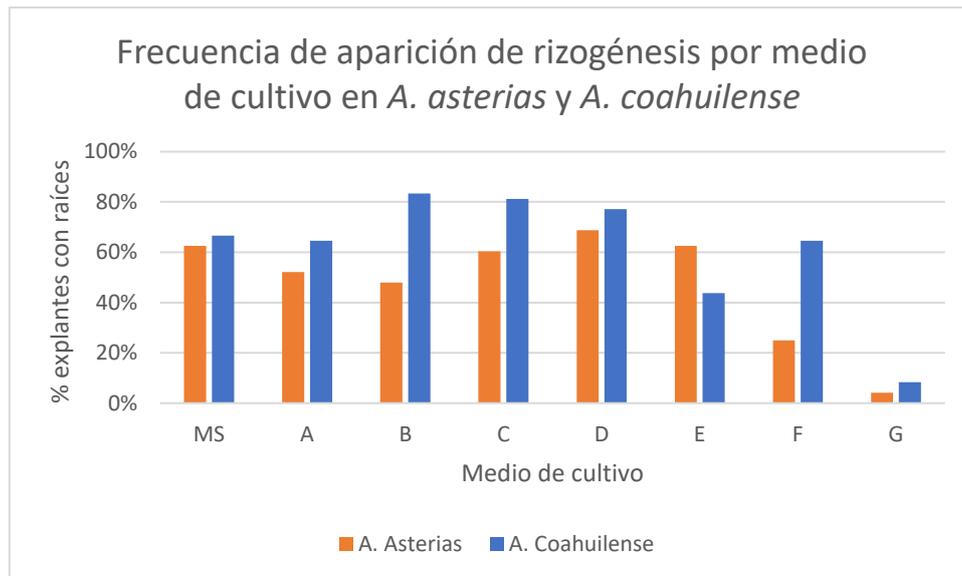


Figura 28. Frecuencia de aparición de rizogénesis según los diferentes medios de cultivo en *A. asterias* y *A. coahuilense*.

4.2.3 Callogénesis

Durante el ensayo, se observó una formación de callo exitosa en todas las especies (*A. asterias* y *A. coahuilense*), en todos los tipos de explantes y en todos los medios de cultivo evaluados. El callo generado por los explantes de *A. coahuilense* y *A. asterias* fue en la mayoría de los casos de color blanquecino y de consistencia friable, lo que es típico de callos que tienen un alto potencial para regeneración (Yoshida & Kojima, 2002). En algunos casos (en explantes de tipo longitudinal) el callo derivó de areolas presentes en el explante (**Figura 29a**), pero en general se generó en la zona de corte del explantes, estuviese esa en contacto o no con el medio de cultivo (**Figura 29b, c**). En algunos casos la proliferación del callo fue muy importante llegando a ocupar buena parte de la placa (**Figura 29d**). En muy pocos casos la formación de callo dio lugar a morfogénesis o embriogénesis, si bien al revés como hemos visto en el apartado anterior hubo rebrotes que con el pasar del tiempo revirtieron a callo.

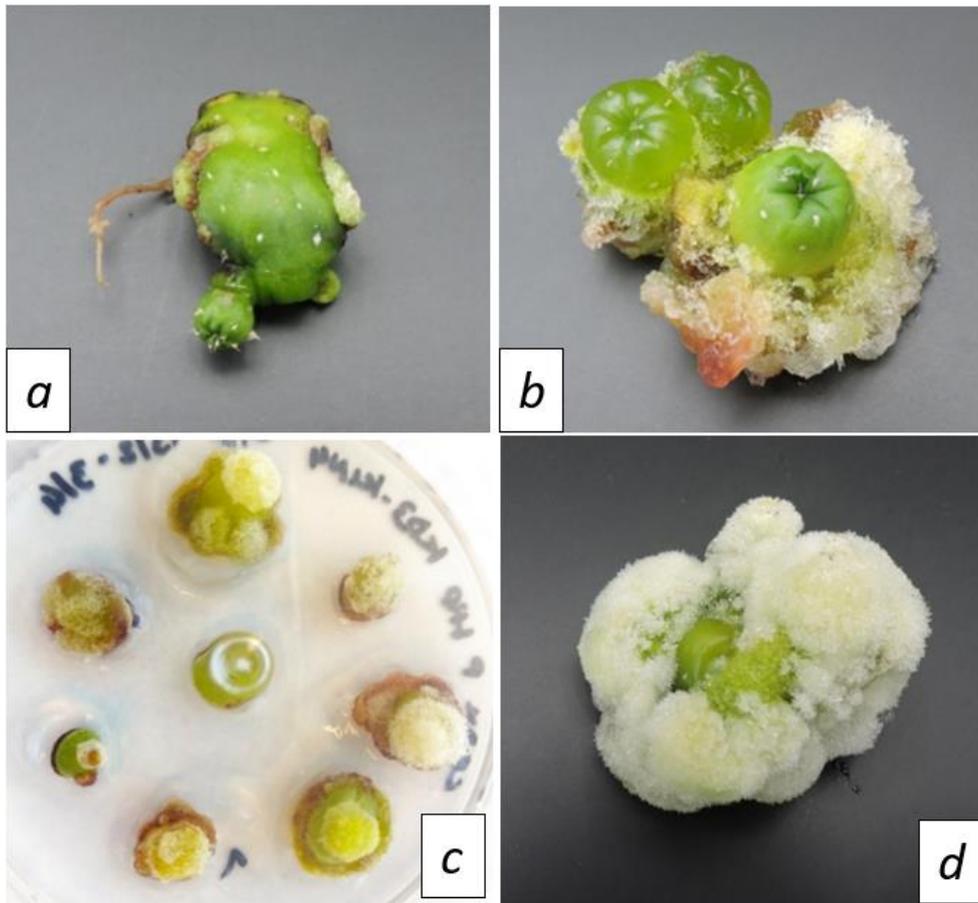


Figura 29. Formación de callo en explantes durante el ensayo: (a) callo areolar en explante longitudinal de *A. asterias*; (b) callo en zona de contacto con el medio en epicótilos de *A. asterias*; (c) callo en zona de corte y zona de contacto con el medio en hipocótilos de *A. coahuilense*; (d) gran proliferación de callo en explante longitudinal de *A. coahuilense*.

Aunque los resultados indican que ambas especies de cactáceas responden favorablemente a las condiciones de cultivo in vitro, hubo variaciones en la formación de callo según el tipo de explante y la composición hormonal del medio.

Los explantes longitudinales mostraron una mayor eficiencia en la formación de callo en *A. coahuilense*, con una tasa de formación de callo del 76%, mientras epicótilos e hipocótilos generaron callo en el 24% y 41% de los explantes respectivamente (**Figura 29a**). El explante longitudinal posiblemente favorece una mayor superficie de interacción con el medio de cultivo, facilitando la inducción callogénica. En *A. asterias*, todos los tipos de explantes produjeron una gran cantidad de callo, con porcentajes entre el 65 y el 87%, lo que sugiere una mayor plasticidad en la respuesta de esta especie al cultivo in vitro (**Figura 29b**). La capacidad de regeneración de *A. asterias* a partir de cualquier tipo de explante es ventajosa, ya que facilita la elección del material inicial para la propagación y mejora la eficiencia del proceso.

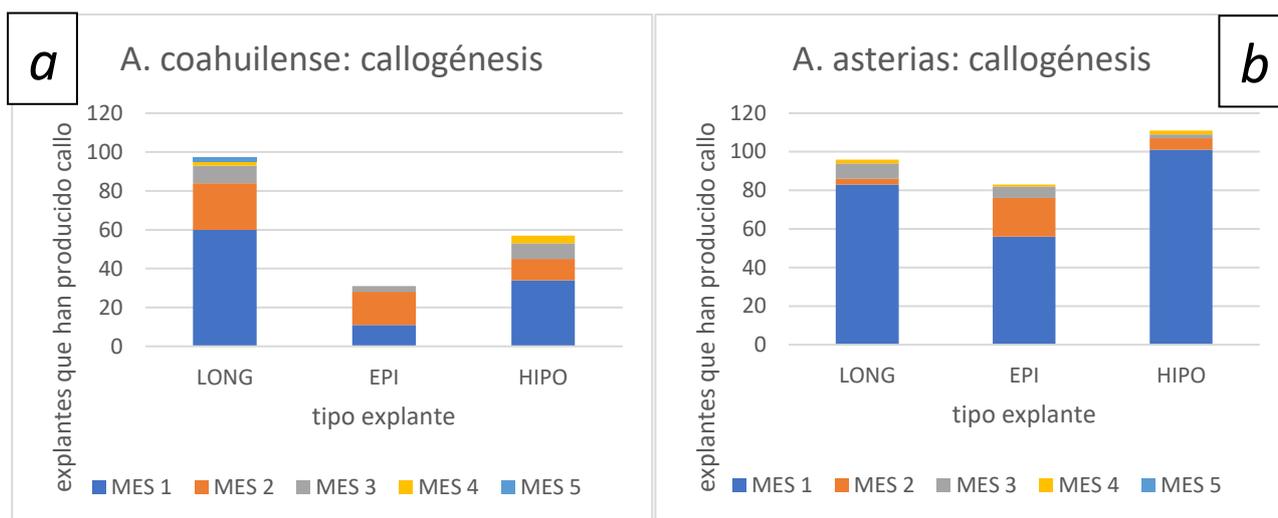


Figura 30. Sumatorio del número de callos por tipo de explante estudiado: (a) calogénesis en *A. coahuilense*; (b) calogénesis en *A. asterias*.

Entre los medios de cultivo evaluados, el medio G (KIN 4 μM + 2,4-D 0.6 μM) destacó significativamente como el más eficaz para la inducción de callo en ambas especies. No obstante, todos los medios utilizados, ya sea con solo kinetina, kinetina en combinación con 2,4-D o con ácido indolbutírico (IBA), presentaron altos porcentajes de respuesta calogénica (**Tabla 13**). Este hallazgo resalta la efectividad general de los reguladores de crecimiento empleados, aunque la combinación de kinetina y 2,4-D ofrece una ventaja adicional en términos de eficiencia.

Tabla 13. Promedio de formación de callo en *A. coahuilense* y *A. asterias* según el medio de cultivo.

	Tratamiento	Total explantes	Calogénesis MES 3	Calogénesis MES 5
<i>A. asterias</i>	MS	48	0,54 \pm 0,07 a	0,56 \pm 0,07 a
	A	48	0,81 \pm 0,06 cd	0,83 \pm 0,05 cd
	B	48	0,73 \pm 0,06 bc	0,73 \pm 0,06 abc
	C	48	0,77 \pm 0,06 bcd	0,77 \pm 0,06 bcd
	D	48	0,85 \pm 0,05 cd	0,85 \pm 0,05 cd
	E	48	0,60 \pm 0,07 ab	0,65 \pm 0,07 ab
	F	48	0,71 \pm 0,07 abc	0,73 \pm 0,06 abc
	G	48	0,92 \pm 0,04 d	0,92 \pm 0,04 d
<i>A. coahuilense</i>	MS	48	0,31 \pm 0,07 ab	0,33 \pm 0,07 ab
	A	48	0,48 \pm 0,07 bcd	0,50 \pm 0,07 bc
	B	48	0,50 \pm 0,07 cd	0,50 \pm 0,07 bc
	C	48	0,17 \pm 0,05 a	0,17 \pm 0,05 a
	D	48	0,33 \pm 0,07 abc	0,33 \pm 0,07 ab
	E	48	0,54 \pm 0,07 d	0,60 \pm 0,07 c
	F	48	0,44 \pm 0,07 bcd	0,50 \pm 0,07 bc
	G	48	0,92 \pm 0,04 e	0,92 \pm 0,04 d

Nota. Los valores de calogénesis son medias \pm errores estándar. Además, valores seguidos de letras distintas son estadísticamente diferentes para $P=0.05$; el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

El 2,4-D es una auxina sintética altamente eficaz para la inducción de callo, ya que promueve la división celular y el crecimiento desorganizado de los tejidos. En este caso, su alta concentración fue un factor decisivo en la formación masiva de callo en ambas especies de *Astrophytum*.

Estos resultados coinciden con los hallazgos de Sato e Inoue (2011), quienes demostraron que el medio de cultivo que contenía 2,4-D en combinación con kinetina fue el más efectivo para inducir la formación de callo en *Astrophytum myriostigma* y con los resultados de Martínez-Vázquez *et al.* (2012), que observaron que concentraciones altas de 2,4-D favorecían una formación de callo rápida y abundante en *A. capricorne*.

Se puede observar también que el desarrollo de callos es mucho más evidente durante el periodo de inducción que durante el de desarrollo, siendo el primer mes el que muestra el mayor incremento en el número de callos acumulados (**Figura 31 a, b**). Este efecto parece deberse principalmente a la presencia de la presión hormonal ejercida por los reguladores de crecimiento; una vez que esta presión disminuye, la inducción de callos se reduce considerablemente, sugiriendo que las concentraciones hormonales juegan un papel clave en la regulación temporal del proceso de organogénesis. Este efecto se observa en diferentes estudios de callogénesis en cactáceas (Anisworth & Johnson, 2014; Cortés-Olmos *et al.*, 2018) los cuales refuerzan la observación sobre el rol crucial de las hormonas en la inducción temprana de callos y cómo su disminución afecta la continuidad del proceso.

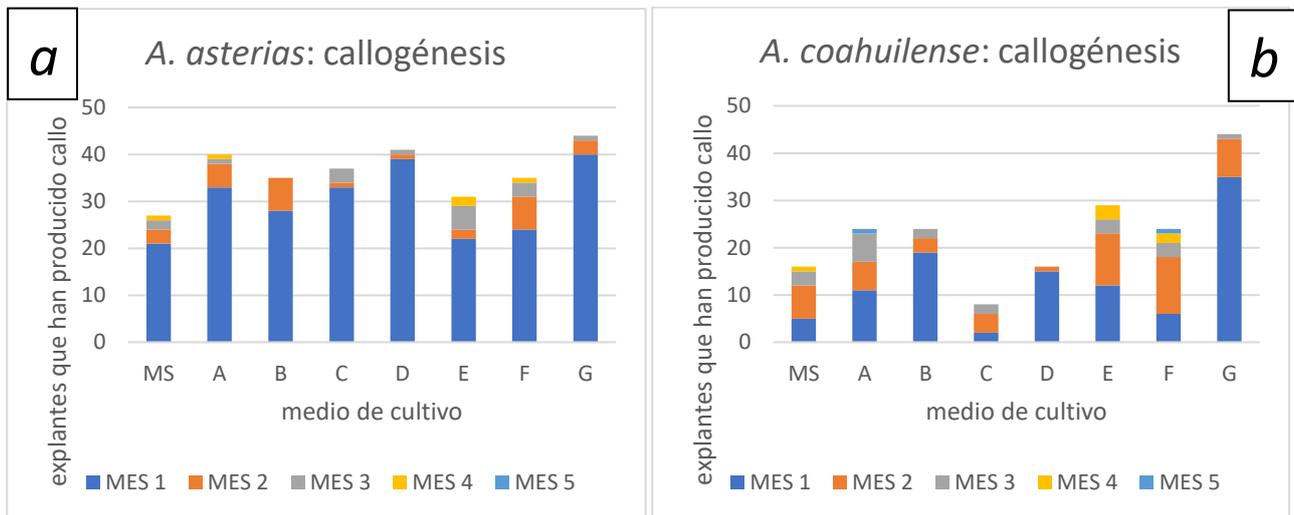


Figura 31. Sumatorio del número de callos por condición: (a) callogénesis en *A. coahuilense*; (b) callogénesis en *A. asterias*.

La capacidad de ambas especies para formar callo de manera eficiente en una variedad de condiciones de cultivo es fundamental para establecer sistemas de producción masiva. La combinación de kinetina y 2,4-D podría ser utilizada como una estrategia central para mejorar la propagación de *Astrophytum*, debido a su capacidad para inducir un crecimiento robusto de callo, lo que puede derivar en la regeneración eficiente de brotes y plantas completas.

4.2.3.1 Inducción de organogénesis a partir de callo

Para avanzar en la producción a gran escala, es fundamental no solo la formación y proliferación de callo, sino también dirigir los esfuerzos hacia la inducción de organogénesis, es decir, la formación de brotes y raíces que permitan obtener plantas completamente funcionales. En este ensayo, se exploró esta respuesta en segmentos de callo originados a partir de material con callogénesis espontánea. Los fragmentos se cultivaron en medios que contenían citoquininas (KIN a 4 μM o TDZ a 1 μM) combinadas con auxinas (IBA a 4,9 μM y 2,4-D a 0,3 μM).

En general hubo observaciones positivas en la especie *A. coahuilense*. Algunos explantes lograron organogénesis, desarrollando brotes y raíces (medio con solo kinetina y medio con kinetina e IBA) (**Figura 32a, b, c**), mientras que otros mostraron un aumento en el tamaño del callo (medios con 2,4-D), evidenciando un potencial de proliferación (**Figura 32d**). Aunque los resultados fueron limitados, estos hallazgos proporcionan una base alentadora para optimizar futuras investigaciones y mejorar la eficiencia del proceso.

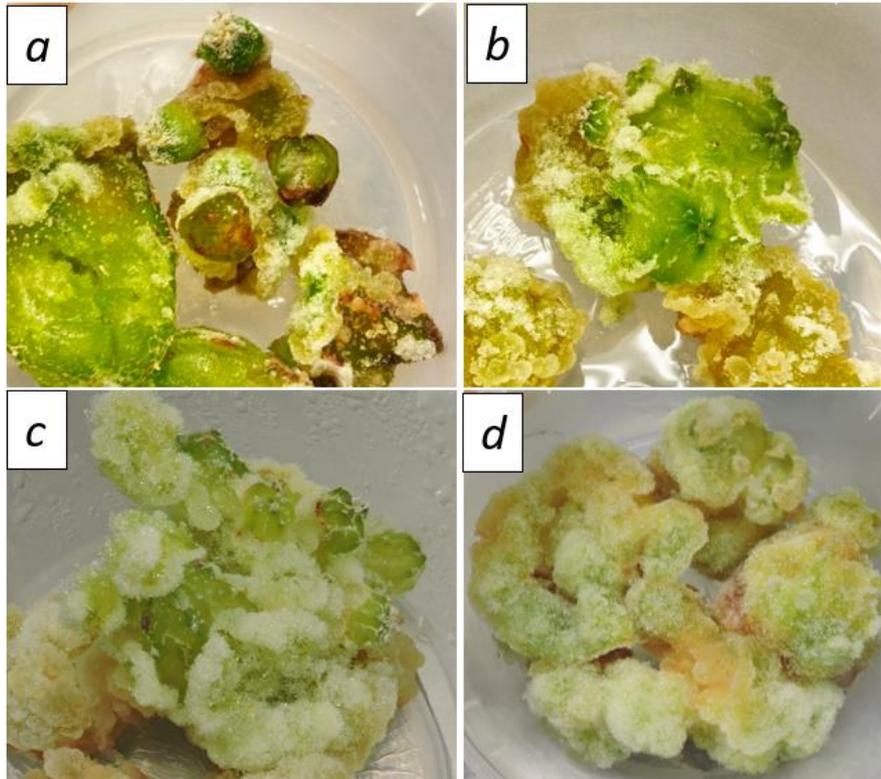


Figura 32. *A. coahuilense*: detalles de rebrotes (a) en medio A (solo kinetina 4 μM) y (b, c) en medio C (kinetina 4 μM con IBA 4,9 μM); (d) gran proliferación de callo en medio I (TDZ 1 μM con 2,4-D 0,3 μM).

4.2.3.2 Interacción genotipo x ambiente

En muchos casos, los explantes cultivados bajo las mismas condiciones mostraron respuestas muy diferentes: en una misma placa, algunos explantes presentaron organogénesis, mientras que otros formaron callo o raíces (**Figura 33a, b, c**). Además, después de cinco meses de cultivo en idénticas condiciones, se observó en algunos casos una notable diferencia en el tamaño de los explantes (**Figura 33d**).

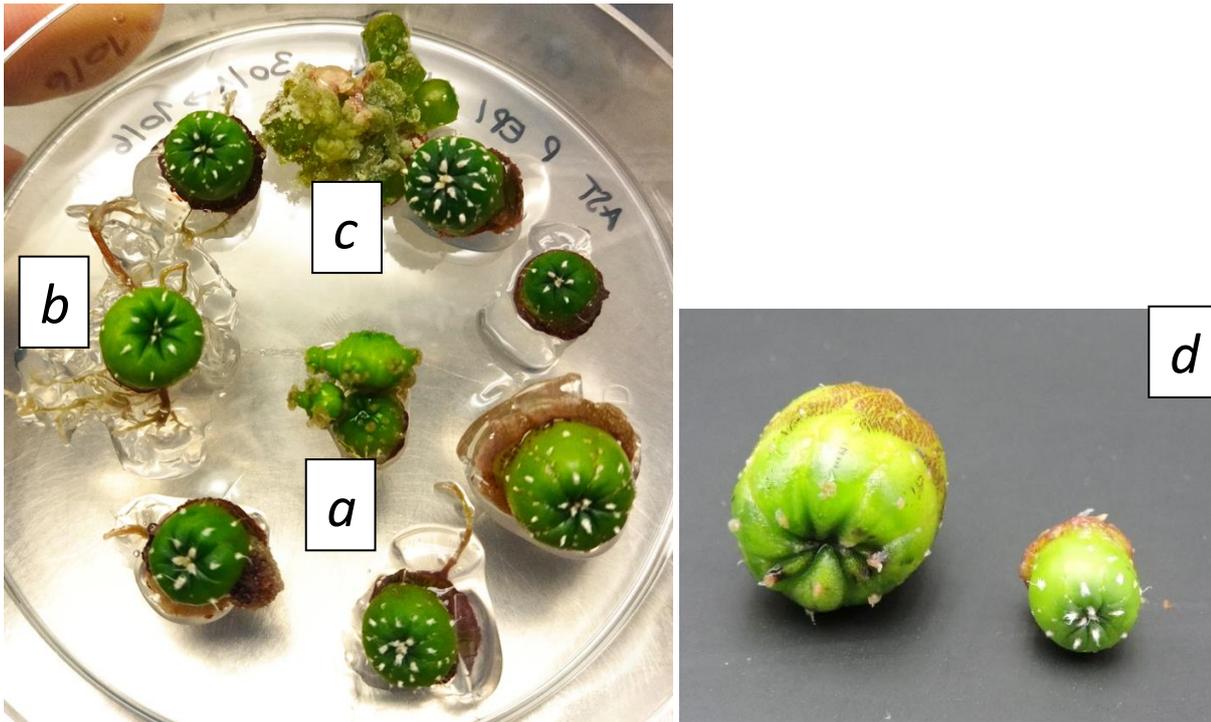


Figura 33. En una misma placa de epicótilos de *A. asterias* se observa una multitud de respuestas: (a) organogénesis por activación areolar, (b) rizogénesis, (c) callogénesis. (d) Diferencia de tamaño observado a mes 5 en dos explantes de *A. asterias* cultivados en las mismas condiciones.

La variabilidad en la respuesta de los explantes sugiere que, a pesar de mantener un entorno homogéneo, cada planta tiene una capacidad intrínseca para reaccionar de manera diferente a los factores externos. Este fenómeno puede explicarse a través de la interacción genotipo x ambiente, en la cual el material genético de los explantes interactúa de forma única con las condiciones del cultivo, influyendo en su desarrollo (George *et al.*, 2008). Esta hipótesis es crucial, ya que resalta que no solo es importante encontrar un protocolo de cultivo adecuado, sino también seleccionar genotipos específicos que ofrezcan una mejor respuesta en términos de crecimiento, organogénesis o formación de callos. Esta interacción sugiere que, para mejorar la eficiencia de los protocolos de propagación *in vitro*, sería ventajoso identificar aquellos genotipos que tengan una capacidad mayor de adaptación o que sean más receptivos a las condiciones hormonales y ambientales del cultivo. Así, combinar un protocolo optimizado con la elección de genotipos superiores podría maximizar los resultados, haciendo más eficiente el proceso de micropropagación y potencialmente aumentando las tasas de éxito en la producción de plantas sanas y viables.

4.2.4 *Astrophytum caput-medusae*

En general, la respuesta predominante en los explantes de *Astrophytum caput-medusae* fue la formación de callo (callogénesis). Este proceso se observó de manera consistente en todos los medios suplementados con hormonas de crecimiento. A diferencia del grupo control, donde no se observó formación de callo, los medios hormonales demostraron una clara capacidad inductora, destacando la importancia de las condiciones hormonales para promover el desarrollo desorganizado de tejidos en esta especie.

El callo fue en general de tipo friable y se rompía fácilmente. En casi todos los explantes el callo empezó a aparecer desde el primer mes del ensayo y durante los sucesivos cuatro meses las células proliferaron, aumentando de tamaño (**Figura 34**).

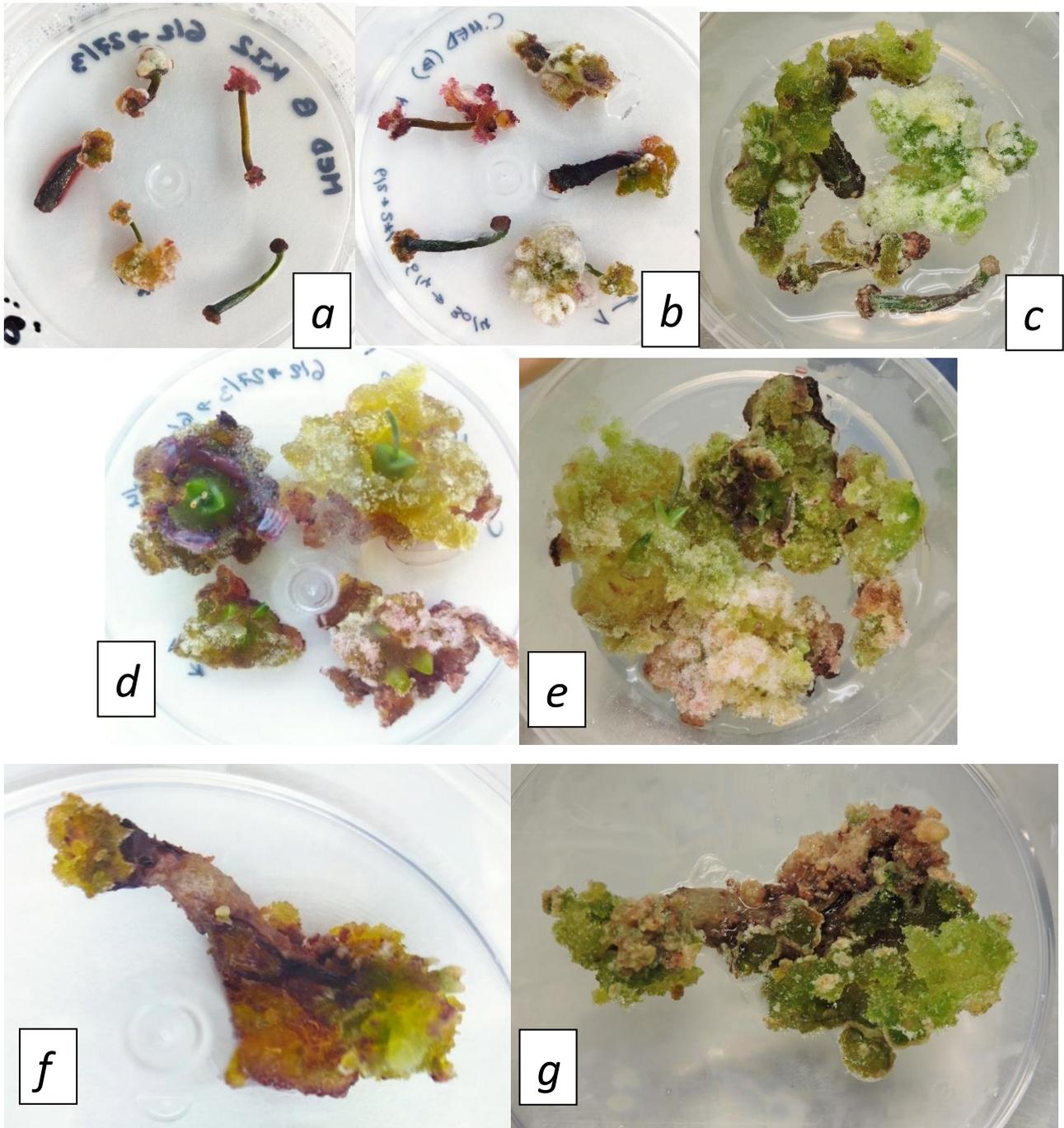


Figura 34. Formación y proliferación de callo en explantes tipo B (parte central de los tubérculos) de *A. caput-medusae* en medio C a mes 2 (a), a mes 3 (b) y a mes 5 (c). Desarrollo en explantes tipo C (cuerpo de la planta con cotiledones) en medio C a mes 1 (d) y mes 5 (e). Explantes de tipo D (raíces) en medio C a mes 1 (f) y mes 5 (g). Nota: medio C = kinetina 4 μM con IBA 4,9 μM

La mayor respuesta en callo, calculada como número de explantes que han producido callo y aumento de tamaño del mismo, se dio en el medio C (kinetina 4 μM con IBA 4,9 μM) donde el 81% de los explantes produjeron callo, y en explante tipo C (cuerpo de la planta con cotiledones), donde el 100% de explantes produjeron callo (**Figura 35**).

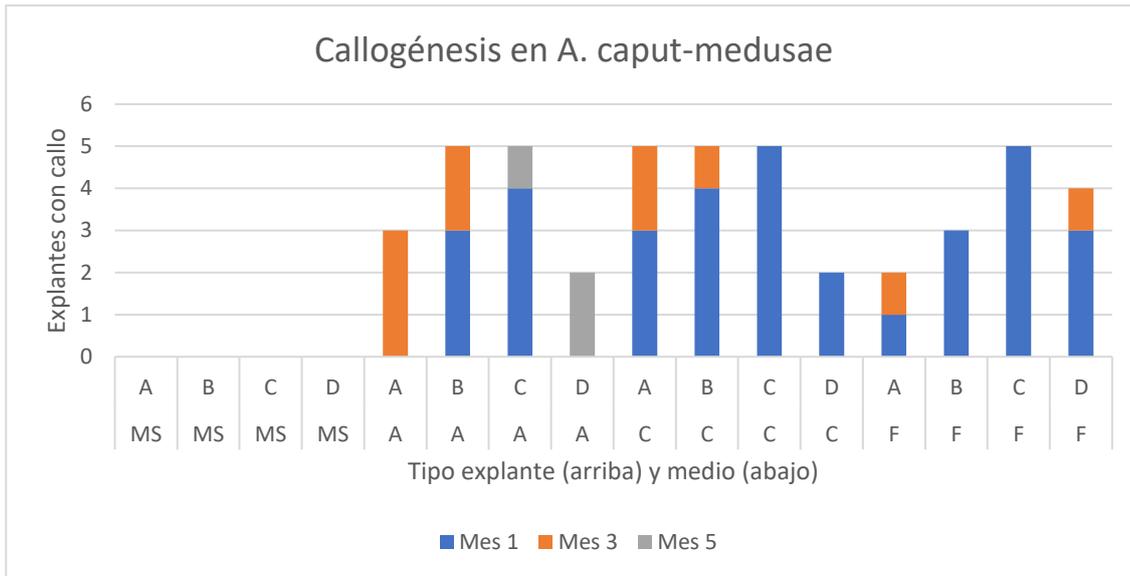


Figura 35. Frecuencia de aparición de calogénesis acumulada por meses, en los diferentes explantes de *A. caput-medusae*. Nota: Tipo explante: A=ápices de los tubérculos, B=parte central de los tubérculos, C=cuerpo de la planta con cotiledones y D=raíces. Medios: MS=control; A= kinetina 4 μ M; C=kinetina 4 μ M con IBA 4,9 μ M; F= kinetina 4 μ M con 2,4-D μ M;

En las placas control (sin hormonas), la respuesta de los explantes fue diversa: ninguno de ellos formó callo, el 38% desarrolló raíces (**Figura 36a**) y dos explantes mostraron desarrollo de tejido incipiente (**Figura 36b, c**).



Figura 36. Medio MS (control): (a) rizogénesis en explantes de tipo C; desarrollo incipiente de tejido en explante (b) A y (c) D.

Los resultados obtenidos en este ensayo con *Astrophytum caput-medusae* pueden compararse con los hallazgos de las tesis de Camargo-Sánchez (2017) y Hernández-Alva (2013), que investigaron aspectos relacionados con el cultivo y la regeneración de esta especie.

En el presente ensayo, al igual que en los estudios de Camargo-Sánchez y Hernández-Alva, la formación de callo se observó en todos los medios que contenían hormonas, mientras que los medios sin hormonas no produjeron callo. Este patrón sugiere que *A. caput-medusae* responde a las auxinas y citoquininas aplicadas, aunque la respuesta a estos reguladores fue variable.

En todos los estudios, la organogénesis directa fue limitada. Camargo-Sánchez destacó que *A. caput-medusae* podría ser recalcitrante al cultivo in vitro, debido a su lento crecimiento y alto contenido de compuestos fenólicos, lo cual dificulta la regeneración morfológica en medios estándar. Asimismo, observó

que el aumento de la concentración de reguladores de crecimiento llevó a una alta oxidación y una respuesta morfogénica mínima. Hernández-Alva también encontró abundante formación de callo, pero la regeneración efectiva fue escasa, indicando desafíos similares en términos de recalcitrancia y respuesta morfogénica.

Los hallazgos obtenidos son significativos, sobre todo debido a la limitada cantidad de estudios previos sobre esta especie. La formación de callo en todos los medios hormonales sugiere que *A. caput-medusae* responde bien a las auxinas y citoquininas aplicadas, lo cual indica que debe seguirse investigando en esta línea para tratar de optimizar las condiciones necesarias para estimular la respuesta organogénica. La rizogénesis observada en los explantes de las placas control indica que los explantes tienen cierta capacidad de desarrollar raíces, por tanto, podría esperarse que el ajuste de condiciones de cultivo favoreciera el desarrollo de rebrotes bajo ciertas condiciones. Estos resultados, aunque preliminares, son un punto de partida sobre el que fundamentar nuevos ensayos con el objetivo de desarrollar protocolos de regeneración más eficientes.

Aunque puedan parecer limitados en comparación con los estudios en *A. coahuilense* y *A. asterias*, estos datos son cruciales desde el punto de vista de la conservación. *A. caput-medusae* es una especie en grave peligro de extinción, y el desarrollo de protocolos efectivos para su cultivo y regeneración in vitro puede contribuir significativamente a su sobrevivencia. A pesar de las limitaciones del estudio, cada avance en la investigación proporciona una base importante para futuras estrategias de propagación y preservación de la especie.

4.3. Ensayo de enraizamiento y aclimatación

4.3.1 Enraizamiento

Al final del ensayo se aislaron 60 rebrotes de *A. asterias* y 60 de *A. coahuilense* con objetivo el enraizamiento y la sucesiva aclimatación; la mayoría de ellos tuvieron éxito en enraizar en las primeras semanas desde el subcultivo a los medios de enraizamiento. Durante 6 semanas se realizó un seguimiento semanal para notificar los eventos de rizogénesis que se muestran gráficamente en las **Figuras 37 y 38**.

A excepción de unos pocos explantes que no mostraron ninguna respuesta, la mayoría desarrolló raíces en pocas semanas, alcanzando altos porcentajes de éxito en los tres medios de cultivo utilizados, tanto para *Astrophytum coahuilense* como para *Astrophytum asterias* (entre el 80% y el 90% al finalizar el ensayo).

Se realizó un análisis ANOVA para evaluar si había diferencias significativas entre los medios de cultivo en cuanto a la velocidad de enraizamiento (es decir, si alguno de los medios favorecía un enraizamiento más rápido). En la especie *A. coahuilense* se encuentran diferencias significativas entre los medios a partir de la segunda semana de ensayo (**Figura 37**, ver letras de significación).

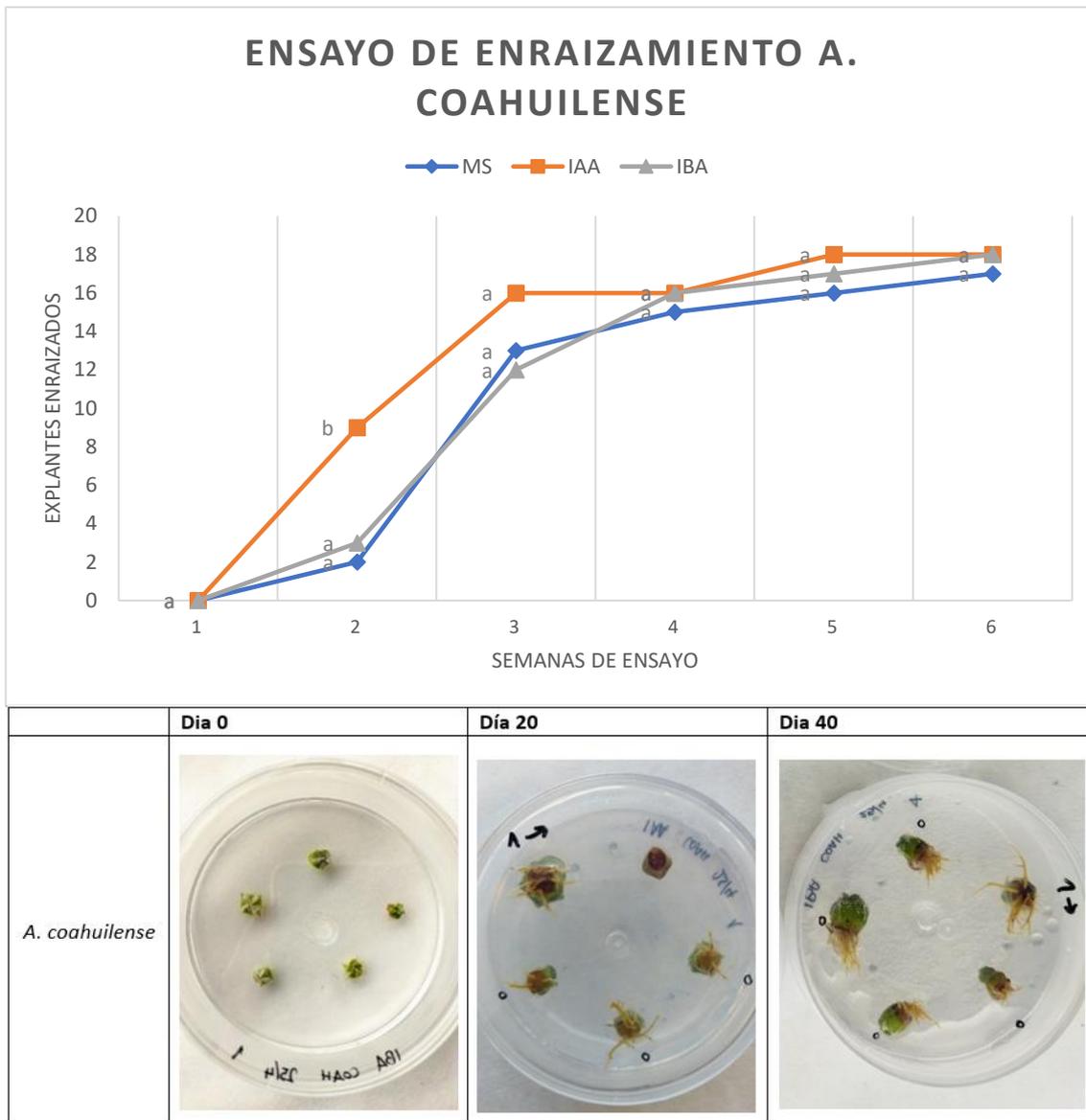


Figura 37. Enraizamiento en *A. coahuilense*: en la gráfica se muestran los datos recopilados durante las seis semanas del experimento con objeto los 20 explantes cultivados en cada uno de los tres medios. En el caso de *A. coahuilense* las tasas de enraizamiento son muy elevadas y hay diferencias significativas exclusivamente en la segunda semana de ensayo (letras distintas son estadísticamente diferentes para $P=0.05$). En la parte inferior se muestra el desarrollo de raíces a día 0, día 20 y día 40 del ensayo de enraizamiento. Se puede ver el incremento del número de explantes enraizado.

El medio suplementado con IAA parece acelerar la formación de raíces en esta especie, ya que en la segunda semana el 45% de los rebrotes sacaron raíces en IAA frente al 10% en MS y 15% en IBA; en la tercera semana la tendencia es similar, con el 80% de rizogénesis en IAA frente al 60% en MS y el 65% en IBA. Aunque al final del ensayo (semanas 4, 5, 6) los resultados de eventos de rizogénesis por medio no son significativamente diferentes, podemos hipotetizar que la hormona IAA tenga un efecto positivo en la rizogénesis en *A. coahuilense* ya que parece acelerar el desarrollo de raíces y podría permitir una aclimatación más rápida y eficiente.

Comparando estos resultados con otros ensayos, se observa una coherencia con estudios previos que han demostrado la precocidad del IAA en la inducción de raíces en cactáceas. Por ejemplo, trabajos como los de Casas et al. (1999) y Villalobos-Amador et al. (2019) indican que el ácido indolacético puede acelerar el

desarrollo de raíces en varias especies (como *Mammillaria albilanata*, *Stenocereus queretaroensis*), promoviendo una mejor respuesta inicial.

Por otro lado, en *A. asterias* no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos, lo que sugiere que, en esta especie, la presencia de hormonas exógenas no favorece el desarrollo de raíces (**Figura 38**). En cambio, los rebrotes aislados parecen comportarse como esquejes, enraizando gracias a las hormonas endógenas que ya poseen, las cuales parecen ejercer una influencia más fuerte que las hormonas exógenas. Estos resultados son consistentes a los obtenidos en el ensayo principal (párrafo 4.2.2).

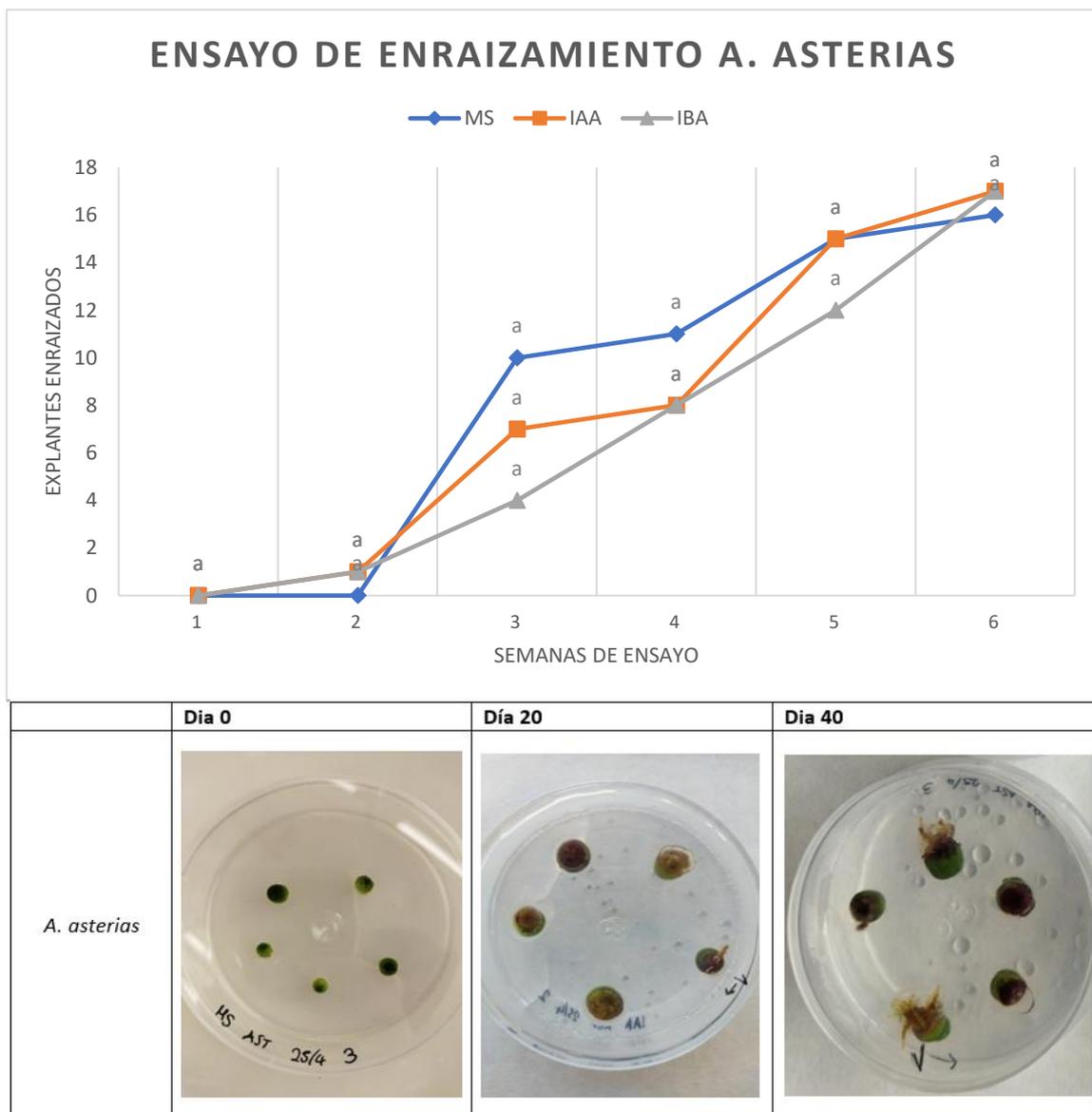


Figura 38. Enraizamiento en *A. asterias*: en la gráfica se muestran los datos recopilados durante las seis semanas del experimento con objeto los 20 explantes cultivados en cada uno de los tres medios. En el caso de *A. asterias* las tasas de enraizamiento son muy elevadas pero no hay diferencias significativas entre los medios en ninguna semana de ensayo (letras iguales no son estadísticamente diferentes para $P = 0.05$). En la parte inferior se muestra el desarrollo de raíces a día 0, día 20 y día 40 del ensayo de enraizamiento. Se puede ver el incremento del número de explantes enraizado.

Los resultados obtenidos en *A. asterias* sugieren que tanto el IBA como el IAA pueden ser utilizados de manera intercambiable para inducir el enraizamiento en esta especie, lo que proporciona flexibilidad en el

diseño de protocolos de propagación. De hecho, el porcentaje de enraizamiento en el grupo control es comparable al obtenido en presencia de reguladores de crecimiento, lo que apoya la hipótesis de que este proceso puede ocurrir de manera espontánea, un fenómeno que ha sido documentado en otras especies de cactáceas (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

4.3.2 Aclimatación

Posteriormente los explantes enraizados fueron aclimatados según se describe en el apartado 3.2.5. La aclimatación resultó exitosa en ambos sustratos utilizados, con ratios de supervivencia de 35/40 en fibra de coco al 100% y 38/40 en la mezcla de 50% turba y 50% vermiculita (**Figura 39a**).

Los cinco explantes de *A. caput-medusae* provenientes del ensayo principal que habían enraizado espontáneamente también tuvieron éxito en la aclimatación (**Figura 39b**).



Figura 39. Explantes aclimatados a condiciones ex vitro: (a) explantes de *A. coahuilense* y *A. asterias*; (b) exlantes de *A. caput-medusae*.

Generalmente, la aclimatación es un proceso crítico en los protocolos de propagación in vitro, dada la dificultad que supone adaptar el material procedente de in vitro a unas condiciones ex vitro. No obstante, en el presente estudio, se ha observado un notable éxito en la aclimatación de los explantes de todas las especies de *Astrophytum* investigadas. Este resultado indica que los sustratos empleados, como la fibra de coco y la mezcla de turba con vermiculita, proporcionan las condiciones ideales para la transición de los

explantes del entorno controlado del cultivo in vitro a condiciones ambientales ex vitro. La capacidad de los explantes para adaptarse y desarrollarse adecuadamente en estos sustratos sugiere un ajuste fisiológico y estructural efectivo, fundamental para su supervivencia prolongada.

Estos resultados no solo confirman la eficacia del protocolo de cultivo in vitro hasta la etapa de aclimatación, sino que también demuestran la viabilidad del mismo para ser utilizado en programas de conservación y propagación masiva de *Astrophytum*. La siguiente etapa de este estudio debería centrarse en la rusticación, es decir, la adaptación de las plantas al hábitat natural. Esto permitiría demostrar la eficacia del protocolo para generar plantas capaces de integrarse adecuadamente en su entorno natural o en condiciones de cultivo más amplias. De todas formas, los excelentes resultados obtenidos en la fase de aclimatación nos permiten ser optimistas y anticipar un éxito en el proceso de rusticación.

Dado que la aclimatación puede ser una barrera significativa que afecta la eficacia de las técnicas de cultivo in vitro, estos hallazgos son cruciales para la integración exitosa de las plantas en su hábitat natural o en condiciones de cultivo más extensas. Esta capacidad de aclimatar con éxito explantes de especies amenazadas como *Astrophytum* subraya el potencial de los protocolos in vitro para contribuir a su conservación. La eficiencia en la aclimatación no solo mejora la viabilidad de los programas de propagación, sino que también ofrece una herramienta valiosa para la reintroducción y preservación de estas especies en sus ecosistemas originales. La implementación efectiva de estos protocolos puede jugar un papel vital en la mitigación del riesgo de extinción y en la restauración de poblaciones naturales, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad y a la protección de especies que enfrentan amenazas significativas en sus hábitats nativos.

5. Conclusiones

Los resultados revelaron que los procesos organogénicos dependían tanto del tipo de explante, como del medio de cultivo, siendo diferentes para las distintas especies estudiadas. Así, los explantes longitudinales mostraron una mayor producción de rebrotes que los explantes de epicotilo e hipocotilo en *A. asterias* y *A. coahuilense*, produciendo un promedio por explante activo de 4,13 en el medio A (kinetina 4 μM) y 3,25 en el medio B (kinetina 4 μM + IBA 2,45 μM), respectivamente. La especie *Astrophytum caput-medusae* no mostró respuesta morfológica, lo que evidencia su recalcitrancia al cultivo in vitro.

La capacidad de desarrollar callo fue notable en las tres especies, destacando especialmente la eficiencia de los explantes longitudinales en *A. coahuilense*, de los hipocótilos en *A. asterias* y de los explantes tipo C (parte central de los tubérculos) de *A. caput-medusae*. El uso de 2,4-D (0,6 μM) en combinación con kinetina 4 μM resultó ser altamente eficaz para la inducción de callo en *A. coahuilense* y *A. asterias*, mientras que para *A. caput-medusae*, destacó el medio con kinetina 4 μM + IBA 4,9 μM . Aunque la organogénesis a partir de callo fue muy limitada en *A. asterias* y nula en *A. caput-medusae*, se observaron resultados alentadores en *A. coahuilense*, sugiriendo que, con optimizaciones adicionales, podrían desarrollarse sistemas de propagación más eficientes.

El ensayo de enraizamiento de los rebrotes de *A. coahuilense* mostró que la presencia de la hormona IAA a 1mg/L, además de favorecer la aparición de raíces (45% a las dos semanas) aceleró la emergencia de las mismas, originando sistemas radicales más desarrollados para iniciar el subsecuente proceso de aclimatación. En la especie *A. asterias* un hubo diferencias significativas entre los medios ensayados, obteniendo en todos óptimos resultados de enraizamiento (85% a las seis semanas).

Por otra parte, la aclimatación a las condiciones ex vitro resultó muy efectiva. Empleando un sustrato constituido por una mezcla del 50% de turba y 50% de vermiculita llegó a obtenerse un porcentaje de supervivencia alrededor del 95% en todas las especies, evidenciando la eficacia del protocolo desarrollado.

Se ha demostrado que la optimización del protocolo de micropropagación en las tres especies estudiadas es crucial para avanzar en la conservación y producción eficiente de *Astrophytum*. En el caso de *Astrophytum asterias* y *Astrophytum caput-medusae* la micropropagación efectiva puede convertirse en una herramienta fundamental no solo para clonar material y propagarlo a gran escala, sino también para preservar la diversidad genética y abordar programas de reintroducción en el hábitat natural. Además, los hallazgos realizados con *Astrophytum coahuilense* son especialmente significativos, ya que no existían estudios previos sobre esta especie en la literatura, lo que aporta un nuevo conocimiento crucial para su conservación y propagación sostenible.

6. Referencias

- Alejandra Vázquez-Lobo, Gisela Aguilar Morales, Salvador Arias, Jordan Golubov, Tania Hernández-Hernández, and María C. Mandujano "Phylogeny and Biogeographic History of *Astrophytum* (Cactaceae)," *Systematic Botany* 40(4), 1022-1030, (15 December 2015). <https://doi.org/10.1600/036364415X690094>
Published: 15 December 2015
- Américas, R. L. (2024, July 9). Un cactus en Florida es la primera especie de EEUU en desaparecer por aumento de nivel del mar. *diariolasamericas.com*. <https://www.diariolasamericas.com/ecoequilibrio/un-cactus-florida-es-la-primera-especie-eeuu-desaparecer-aumento-nivel-del-mar-n5359610>
- Anderson, 2001: Anderson, E.F. (2001). *The Cactus Family*. Portland, E.U.A: Timber Press.
- Anderson, E. F., Arias Montes, S., Taylor, N. P., y Cattabriga, A. (1994). Threatened cacti of Mexico. 135. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>
- Arias, S., Terrazas, T., Arreola-Nava, H. J., Vázquez-Sánchez, M., & Cameron, K. M. (2005). Phylogenetic relationships in the Cactaceae based on rpl16 intron sequence variation. *American Journal of Botany*, 92(7), 1178-1188. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1178>
- Bárcenas-Argüello, M. L., & González, R. V. (2009). In vitro propagation of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(1), 122-126. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9187-5>
- Becerra-López JL, Romero-Méndez U, Berumen-Padilla S y Martínez-García E (2010) Análisis morfológico de la semilla se *Astrophytum myriostigma* Lem. (1839). *Boletín Nakari* 21(3): 39-45.
- Berger, A. (1924). *The Cactaceae, Descriptions and illustrations of plants of the cactus family*. by N. L. Britton and J. N. Rose. The Carnegie Institution of Washington. Vol. I, 1919; Vol. II, 1920; Vol. III, 1922; Vol. IV, 1924. *Science*. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.60.1542.66>
- Birnbaum, S. J. (2009). Habitat Characterization and Pilot Reintroduction of Star Cactus (*Astrophytum asterias*). *Conservation Evidence Journal* 8. <https://digital.library.txstate.edu/handle/10877/9027>
- Birnbaum, S. J., Wisely, S. M., Smith, M. A., & Meffe, G. K. (2011). *Reintroduction of the Endangered Star Cactus (Astrophytum asterias) into Southern Texas*. *The Southwestern Naturalist*, 56(3), 322-328. <https://doi.org/10.1894/F03-APAJ-13.1>
- Blair, A. W., & Williamson, P. S. (2008). Effectiveness and Importance of Pollinators to the Star Cactus (*Astrophytum asterias*). *The Southwestern Naturalist*, 53(4), 423–430. <https://doi.org/10.1894/jb-04.1>
- Bouzroud S, El Maaiden E, Sobeh M, Devkota KP, Boukcim H, Kouisni L, El Kharrassi Y. Micropropagation of *Opuntia* and Other Cacti Species Through Axillary Shoot Proliferation: A Comprehensive Review. *Front Plant Sci*. 2022 Jul 7;13:926653. doi: 10.3389/fpls.2022.926653. PMID: 35873968; PMCID: PMC9301454.
- Bouzroud, S., Savy, C., Farineau, S., Breitel, D., Djafri, K., & Bendahmane, M. (2022). *Interplay between auxin and cytokinin in apical dominance*. *Journal of Plant Physiology*, 269, 153584. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153584>
- Bravo-Hollis, H., & R, H. S. (1991). *Las cactáceas de México*.
- Bregman, R. (1988). Forms of seed dispersal in Cactaceae. *Plant Biology*, 37(3), 395-402.

Britton, N. L., & Rose, J. N. (1923). *The Cactaceae: Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family*.

Cactaceae de Jussieu, 1789, *Genera Plantarum* di Carlo Linneo (Von Linné, C. (1737). *Genera plantarum*.)

Camargo-Sánchez, V. (2017). *Cultivo in vitro y conservación de Astrophytum caput-medusae*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Cárdenas, J., Vargas, S., & De la Cruz, R. (1993). *Propagación in vitro de Astrophytum capricorne*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 64, 23-31.

Cardoza-Martínez, G.F. *et al.* (2019) 'Shifts in climatic niche occupation in *Astrophytum Coahuilense* (H. Möller) Kayser and its potential distribution in Mexico', *Sustainability*, 11(4), p. 1138. doi:10.3390/su11041138.

Carrillo-Angeles, I. G., Suzán-Azpiri, H., Mandujano, M. C., Golubov, J., & Martínez-Ávalos, J. G. (2016). Niche breadth and the implications of climate change in the conservation of the genus *Astrophytum* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments*, 124, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.09.001>

Casas, A., Barbera, G., & Pimienta-Barrios, E. (2002). In vitro propagation of the columnar cactus *Myrtillocactus geometrizans*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(4), 479-484. <https://doi.org/10.1290/082007>

Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 145-157. <https://doi.org/10.1023/A:1010694302625>

Castro-Gallo, J. L., Villaseñor, J. L., & Rojas, P. (2002). *Regeneración in vitro de Astrophytum ornatum*. *Acta Horticulturae*, 569, 175-180.

Cerca de 1500 cactus extraídos ilegalmente en el Desierto de Atacama fueron incautados en Italia. (n.d.). <https://www.agendasustentable.cl/cerca-de-1500-cactus-extraidos-ilegalmente-en-el-desierto-de-atacama-fueron-incautados-en-italia/>

Chukwuma, N. M., & Nwosu, M. O. (2010). In vitro propagation of *Opuntia microdasys* (Cactaceae). *Journal of Applied Biosciences*, 33, 2055-2060.

CITES. (2023). Appendices. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. <https://cites.org/eng/app/appendices.php>

Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips, G. C., & Butler-Nance, S. A. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(2), 337-343.

Cline, M. G. (1997). *Concepts and terminology of apical dominance*. *American Journal of Botany*, 84(8), 1064-1069. <https://doi.org/10.2307/2446149>

Cortés-Olmos, C., Guerra-Sandoval, V., Blanca-Giménez, V., & Rodríguez-Burruezo, A. (2023). Micropropagation and Acclimatization of *Gymnocalycium* cv. Fancy (Cactaceae): Developmental Responses to Different Explant Types and Hormone Conditions. *Plants*, 12(23), 3932. <https://doi.org/10.3390/plants12233932>

Cortés-Olmos, C., Gurrea-Ysasi, G., Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A., & Fita, A. (2018). In vitro germination and growth protocols of the ornamental *Lophophora williamsii* (Lem.) Coult. as a tool for

protecting endangered wild populations. *Scientia Horticulturae*, 237, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.064>

Departamento de Parques y Vida Silvestre de Texas. (2012). *Informe anual de conservación y recuperación de especies amenazadas*. Texas Parks and Wildlife Department.

Euronews. (2024, June 30). Los delincuentes que robaron cactus en Chile denunciados por una ONG: Especie en peligro de extinción. *Euronews*. <https://es.euronews.com/green/2024/06/30/los-delincuentes-que-robaron-cactus-en-chile-denunciados-por-una-ong-especie-en-peligro-de>

Gaona, A. (2018). Regeneración in vitro de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Cactácea en peligro de extinción. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11165.56803>

García-Osuna, H., Pérez-Molphe-Balch, E., & Dávila-Figueroa, C. A. (2011). Effect of different factors on in vitro vitrification and survival of *Pilosocereus chrysacanthus* and *Myrtillocactus geometrizans*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(4), 537-543. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9352-0>

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Springer.

Gisbert-Doménech, R., Sánchez, C., & Simón, M. (2008). *Variación somaclonal en plantas regeneradas in vitro: Implicaciones para la biotecnología vegetal*. *Plant Cell Reports*, 27(5), 767-776

Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., y Tucci, M. (2002). In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95(4), 319-332. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00031-6)

Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernández, H. M., Inger, R., Pollock, C., Schipper, J., Superina, M., Taylor, N. P., Tognelli, M., Abba, A. M., Arias, S., Arreola-Nava, H. J., Baker, M. A., Bárcenas, R. T., Barrios, D., Braun, P., . . . Gaston, K. J. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, 1(10). <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.142>

González, R., & Martínez, A. (2020). *Optimización del enraizamiento in vitro en cactáceas mediante auxinas*. *Journal of Plant Sciences*, 45(3), 567-579. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.04.003>.

Hernández, H.M. and Gómez-Hinostrosa, C. 2011. Mapping the cacti of Mexico. *Succulent Plant Research* 7: 1-128.

Hernández, H.M., Smith, M., Terry, M., Fitz Maurice, W.A. & Fitz Maurice, B. 2017. *Astrophytum asterias* (amended version of 2013 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T40961A121438670. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T40961A121438670.en>. Accessed on 06 July 2024.

Hernandez, Tania & Hernández, Héctor & De-Nova, J. Arturo & Puente-Martinez, Raul & Eguiarte, Luís & Magallon, Susana. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American journal of botany*. 98. 44-61. 10.3732/ajb.1000129.

Hernández-Alva, E. (2013). *Estudio del cultivo in vitro de Astrophytum caput-medusae*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández-Alva, Miguel & Ávila, V.M. & Reyes, M.. (2011). *Digitostigma caput-medusae* Velazco et Nevárez. *Cact. Suc. Mex.*. 56.

Hernández-Alva, Miguel, 2013, Repositorio de Tesis DGBSDI: Análisis de la variabilidad genética y cultivo in vitro de Digitostigma caput-medusae (Cactaceae): como estrategia integral de conservación. (n.d.). https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000705769

<https://www.botanicohub.com/plant-species/Astrophytum-asterias;>

Hunt, D. R., & Charles, G. (2006). *The new Cactus lexicon: text.*

INTERPOL, 2021; https://cites.org/esp/prog/imp/wildlife_crime_linked_to_the_internet

INTERPOL, 2021; *Informe sobre el tráfico ilegal de especies protegidas.* INTERPOL.

IUCN, S. (2020). The IUCN red list of threatened species.

IUCN. 2013. IUCN Red List of Threatened Species (ver. 2013.1). Available at: <http://www.iucnredlist.org>. (Accessed: 12 June 2013).

Ivannikov, R., Lobova, O., Ivannikova, N., & Krasnienkova, I. (2021). MICROPROPAGATION AND ORGANOGENESIS OF ASTROPHYTUM ASTERIAS (ZUCC.) LEM. (CACTACEAE JUSS.), BLOSSFELDIA LILIPUTIANA WERDERM. AND STROMBOCACTUS DISCIFORMIS (DC.) BRITTON & ROSE. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, e2201. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.2201>

La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) regula la recolección y el comercio de especies protegidas por el gobierno mexicano (Diario Oficial de la Federación, 5 de marzo, 2002). Junto con la Ley General de Vida Silvestre (Diario Oficial de la Federación, 3 de julio, 2000),

Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). *Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement.* *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4), 197-214.

Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. Arias, Salvador; Guzmán, Ulises; Mandujano, María C.; Soto Galván, Miriam & Golubov, Jordan. 2005

Lemaire, C. (1839b). *Cactearum genera nova speciesque novae etc.*

Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2012). Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-d concentrations. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 11(4), 77–87. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123294089>

Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2012). Regeneration of *Astrophytum asterias* in vitro in response to various hormonal treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(3), 367-375. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0048-1>

Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2012). *Somatic embryogenesis and organogenesis in cactus.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(2), 345-359. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0155-8>

Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti—a review. *Haseltonia*, 19, 46–63. <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>

Mancilla-Villanueva, E. (2014). *Propagación in vitro de Astrophytum asterias.* *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3), 215-223.

Martínez-Ávalos, J., Golubov, J., Mandujano, M., & Jurado, E. (2007). Causes of individual mortality in the endangered star cactus *Astrophytum asterias* (Cactaceae): The effect of herbivores and disease in Mexican populations. *Journal of Arid Environments*, 71(2), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.03.017>

Martínez-Vázquez, A., Flores, R., & Mora, A. (2012). *Inducción de callo en Astrophytum capricorne utilizando 2,4-D y kinetina.* *Bioteología Vegetal*, 12(1), 55-63.

Martínez-Vázquez, C., Hernández-Guzmán, A., & Galván-González, A. (2012). *Effect of 24-D and kinetin on callus induction and plant regeneration in *Astrophytum capricorne**. *Ciencia y Tecnología*, 10(3), 87-95.

Mauseth, J. D. (2006). *Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae*. *Annals of Botany*, 98(5), 901-926. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl139>

Mauseth, J. D. (2017). An Introduction to Cactus areoles Part II. *Cactus and Succulent Journal*, 89(5), 219–229. <https://doi.org/10.2985/015.089.0503>

Moebius-Goldammer, K.G., Mata-Rosas, M. & Chávez-Avila, V.M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 39, 388–393 (2003). <https://doi.org/10.1079/IVP2003427>

Natural Press. (2023, August 5). *Vuelven a Chile casi 1.000 cactus decomisados en Italia*. <https://www.naturalpress.ca/vuelven-a-chile-casi-1-000-cactus-decomisados-en-italia/>

Niclos, M. J. D., Doménech, C. G., & Fernández, A. M. F. (2008). *PRÁCTICAS DE CULTIVO IN VITRO y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS*.

NORMA Oficial Mexicana nom-059-Semarnat-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30/12/2010.

Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila-Figueroa, C. A., & Avila-Castañeda, L. (2002). Micropropagation of Cactaceae Species: A Review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 4, 3-22.

Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila-Figueroa, C.A. In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (cactaceae). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 38, 73–78 (2002). <https://doi.org/10.1079/IVP2001248>

Pérez-Molphe-Balch, E., Del Socorro Santos-Díaz, M., Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, 72(6), 540–561. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>

Pérez-Molphe-Balch, E., Mendoza, J., & Dávila, P. (2015). *Conservación de cactáceas mexicanas: bancos de germoplasma y cultivo in vitro*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(1), 263-276.

Pérez-Molphe-Balch, E., Villavicencio-Espinosa, G., & Dávila, P. (2002). *A method to improve in vitro acclimatization of plantlets*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(6), 653-657. <https://doi.org/10.1079/IVP2002342>

Pérez-Molphe-Balch, Martha Evelia Pérez-Reyes, MA. De Lourdes De La Rosa-Carrillo "In Vitro Conservation of *Turbincarpus* (Cactaceae) Under Slow Growth Conditions," *Haseltonia*, 2012(17), 51-57, (1 January 2012)

PROFEPA. (2000). *Informe sobre las incautaciones de especies protegidas en México*. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.

Proyecto Digitostigma, Nevarez,

<https://www.flickr.com/photos/totalmentenorestense/albums/72157594240624615/>

Ramírez-Malagón, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Perez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo "In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae)," *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(6), 660-665, (18 October 2007)

Ramirez-Malagon, R., Uscanga, N. G., Mendoza-Espinoza, J. A., & Villanueva-Couoh, E. (2008). In vitro propagation and rooting of Mammillaria spp. (Cactaceae). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83(3), 319-322.

Ramírez-Serrano, M., & Teixeira, D. (2008). *Regeneration and in vitro conservation of Astrophytum species*. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 181-187. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0067-5>

Ramírez-Serrano, P. A., & Teixeira, J. A. (2008). Propagation and conservation of cacti: A practical and theoretical review. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1791-1799.

Reemts, C. M., Conner, P., Janssen, G. K., & Wahl, K. (2014). Survival of planted star cactus, *Astrophytum asterias*, in southern Texas. *The Southwestern Naturalist*, 59(1), 122–125. <https://doi.org/10.1894/n05-jb-40.1>

Robbins, TRAFFIC Norteamérica, 2003: Robbins, Christopher S., ed. 2003. Prickly Trade: Trade and Conservation of Chihuahuan Desert Cacti, por Christopher S. Robbins y Rolando Tenoch Bárcenas Luna. Norteamérica. Washington D.C.: Fondo Mundial para la Naturaleza.

Sato, Y., & Inoue, M. (2011). *Callus induction and plant regeneration in Astrophytum myriostigma*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 56(1), 21-29.

Silva, J. A., & Cordeiro, M. F. (2017). *Efectos de auxinas en la formación de raíces en cactáceas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(1), 55-67. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-4>

Strong, A. W., & Williamson, P. S. (2007). BREEDING SYSTEM OF ASTROPHYTUM ASTERIAS: AN ENDANGERED CACTUS. *The Southwestern Naturalist*, 52(3), 341–346. [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2007\)52](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2007)52)

Summary and Evaluation. U.S. Fish and Wildlife Service, Corpus Christi Ecological Services

Terry, Martin & Price, Dana & POOLE, J. (2007). A Tale of Two Cacti: The Complex Relationship between Peyote (*Lophophora williamsii*) and Endangered Star Cactus (*Astrophytum asterias*).

Torres-Silva, G., Correia, L. N. F., Koehler, A. D., Batista, D. S., Faria, D. V., Resende, S. V., Strickler, S. R., Fouracre, J., Romanel, E., Specht, C. D., y Otoni, W. C. (2021). Expression of *Melocactus glaucescens* SERK1 sheds new light on the mechanism of areolar activation in cacti. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(3), 437-451. <https://doi.org/10.1007/S11240-021-02137-9/FIGURES/9>

Torres-Silva, H., García-Moya, E., & Valiente-Banuet, A. (2021). *Ecología y conservación de cactáceas: desafíos y perspectivas*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, 102-115.

U.S. Fish and Wildlife Service. 1993. Endangered and Threatened Wildlife and Plants: Determination of Endangered Status for the Plant *Astrophytum asterias* (Star Cactus), Federal Register, Rules and Regulations 58 199: 53804-53807

U.S. Fish and Wildlife Service. 2003. Recovery Plan for Star Cactus (*Astrophytum asterias*). U.S. DOI Fish and Wildlife Service, Albuquerque, New Mexico. i-vii + 38pp., A1-19, B 1-8.

U.S. Fish and Wildlife Service. (2013). *Revised Recovery Plan for Star Cactus (Astrophytum asterias)*. U.S. Fish and Wildlife Service.

U.S. Fish and Wildlife Service. (2018). *Updated Recovery Plan for Star Cactus (Astrophytum asterias)*. U.S. Fish and Wildlife Service.

Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T., Arias, S., & Ochoterena, H. (2013). Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity*, 11(1), 103–116. <https://doi.org/10.1080/14772000.2013.775191>

Velazco Macías CG, Nevárez de los Reyes M. 2002. Nuevo género de la familia Cactaceae en el Estado de Nuevo León, México: *Digitostigma caput-medusae* Velazco et Nevárez sp. nov. *Cact Suc Mex* 4:76-86.

Velazco, J., & Nevárez, C. (2002). *Proyecto Digitostigma: Conservación y cultivo de Astrophytum caput-medusae*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Vyskot, B., & Jára, P. (1984). *Inhibition of apical dominance by cytokinins*. *Biologia Plantarum*, 26(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/BF02898003>

Vyskot, B.; Jára, Z. Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro. *J. Hort. Sci.* 1984, 59, 449–452.

Yoshida, K., & Kojima, M. (2002). "In Vitro Callus Formation and Plant Regeneration in Cacti." *Journal of Plant Research*, 115(3), 223-229.

Yoshida, Y., & Kojima, M. (2002). *Callus formation and plant regeneration in Astrophytum asterias*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(1), 27-33. <https://doi.org/10.1023/A:1015293913006>

Zepeda-Martínez, V., Mandujano, M., Mandujano, F., & Golubov, J. (2013). What can the demography of *Astrophytum ornatum* tell us of its endangered status? *Journal of Arid Environments*, 88, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.08.006>

Ziv, M. (1991). Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 27(2), 64-69. <https://doi.org/10.1007/BF02632131>

Agradecimientos

Se agradece Cactusloft OE (Valencia, España) por su generosa colaboración al permitir el acceso al invernadero y facilitar la realización de las fotografías necesarias para el estudio. Su apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de la investigación y se valora profundamente su contribución al trabajo.

Apéndices

Anexo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.				X
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.		X		
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto:

ODS 13: Acción por el clima. El cambio climático afecta la biodiversidad, incluyendo las cactáceas, y el desarrollo de técnicas de propagación in vitro permite la preservación de especies que son vulnerables a las alteraciones climáticas. El protocolo contribuye a la resiliencia de los ecosistemas al preservar especies que pueden adaptarse mejor a los cambios en el clima y ser reintroducidas en áreas afectadas por la desertificación o el cambio climático.

ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres. El trabajo realizado aborda la propagación in vitro de cactáceas, en particular de especies amenazadas del género *Astrophytum*. Se alinea con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 15 de la Agenda 2030, que busca "proteger, restaurar y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar de manera sostenible los bosques, combatir la desertificación, detener e invertir la degradación de la tierra y detener la pérdida de biodiversidad."

Astrophytum asterias y *A. caput-medusae* son especies de cactus en peligro de extinción debido a la pérdida de hábitat, el comercio ilegal y la recolección indiscriminada. El desarrollo de un protocolo de micropropagación permite la producción en masa de estas plantas sin necesidad de extraerlas de su entorno natural, lo que ayuda a detener la pérdida de biodiversidad. Además, con la propagación in vitro es posible producir plántulas que pueden ser reintroducidas en sus hábitats naturales, y esto contribuye a la restauración de ecosistemas degradados y ayuda a combatir la desertificación.

Finalmente, el desarrollo de técnicas eficientes de micropropagación puede ser un paso fundamental para mitigar los riesgos de extinción de estas especies, al aumentar su disponibilidad para proyectos de conservación ex situ, jardinería sostenible y uso en viveros comerciales, reduciendo así la presión sobre las poblaciones silvestres.

Anexo II. Productividad de *A. coahuilense* en rebrotes a lo largo del ensayo.

		Periodo de inducción (con PGRs)						Periodo de crecimiento (sin PGRs)			
		MES 1		MES 2		MES 3		MES 4		MES 5	
		P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio
Tipo explante	CASOS	0,034		0,3482		0,000		0,000		0,000	
LONG	128		0,09±0,02 b		0,25±0,05 a		0,99±0,11 c		0,84±0,11 c		0,95±0,11 c
EPI	128		0,02±0,01 a		0,19±0,05 a		0,62±0,11 b		0,42±0,11 b		0,45±0,11 b
HIPO	128		0,05±0,02 ab		0,16±0,05 a		0,23±0,11 a		0,09±0,11 a		0,09±0,11 a
Condición		0,001		0,001		0,000		0,000		0,000	
MS	48		0±0 a		0,1±0,06 a		0,42±0,17 ab		0,48±0,17 ab		0,5±0,18 ab
A	48		0,02±0,02 a		0,38±0,11 c		0,77±0,17 bc		0,71±0,17 bc		0,77±0,18 bc
B	48		0±0 a		0,38±0,11 c		1,23±0,17 cd		1,04±0,17 c		1,1±0,18 c
C	48		0±0 a		0,02±0,02 a		0,08±0,17 a		0±0,17 a		0±0,18 a
D	48		0,04±0,03 ab		0,06±0,04 a		0,29±0,17 ab		0,13±0,17 a		0,19±0,18 a
E	48		0,13±0,05 bc		0,33±0,1 bc		1,31±0,17 d		1,08±0,17 c		1,08±0,18 c
F	48		0,15±0,05 c		0,17±0,05 abc		0,58±0,17 ab		0,06±0,17 a		0,23±0,18 ab
G	48		0,08±0,04 abc		0,15±0,05 ab		0,21±0,17 a		0,1±0,17 a		0,13±0,18 a
EXP X MEDIO		0,3458		0,355		0,010		0,002		0,002	
Casos tot.	384		0,05±0,01		0,2±0,03		0,61±0,06		0,45±0,06		0,5±0,07

Nota. Medios de cultivo: MS=medio control sin hormonas; A=KIN 4 µM; B= KIN 4 µM+IBA 2,45 µM; C= KIN 4 µM+IBA 4,9 µM; D= KIN 4 µM+IBA 9,8 µM; E=KIN 4 µM+2,4-D 0,15 µM; F= KIN 4 µM+2,4-D 0,3 µM; G= KIN 4 µM+2,4-D 0,6 µM; H=TDZ 1 µM+IBA 4,9 µM; I=TDZ 1 µM+2,4-D 0,3 µM. Tipo de explante: LONG=longitudinal; EPI=epicótilo; HIPO=hipocótilo. Promedio calculado como total rebrotes por explante en las mismas condiciones ± error estándar. P-value=significativo a P ≤ 0.05. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes para P =0.05 según la Student-Newman-Keuls.

Anexo III. Productividad de *A. asterias* en rebrotes a lo largo del ensayo.

		Periodo de inducción (con PGRs)						Periodo de crecimiento (sin PGRs)			
		MES 1		MES 2		MES 3		MES 4		MES 5	
		P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio	P-value	Promedio
Tipo explante	CASOS	0		0,057		0,000		0,001		0,000	
LONG	128		0,29±0,04 b		0,38±0,08 b		0,81±0,11 b		0,93±0,15 b		1,04±0,16 b
EPI	128		0,07±0,04 a		0,12±0,08 a		0,18±0,11 a		0,14±0,15 a		0,13±0,16 a
HIPO	128		0,04±0,04 a		0,3±0,08 ab		0,47±0,11 a		0,68±0,15 b		0,73±0,16 b
Condición		0,019		0,033		0,025		0,005		0,003	
MS	48		0,04±0,03 a		0,1±0,04 a		0,13±0,18 a		0,08±0,24 a		0,1±0,26 a
A	48		0,35±0,12 b		0,5±0,13 bc		0,75±0,18 b		1,17±0,24 c		1,33±0,26 d
B	48		0,19±0,09 ab		0,29±0,11 abc		0,69±0,18 b		0,63±0,24 abc		0,65±0,26 abcd
C	48		0,08±0,05 a		0,33±0,21 abc		0,5±0,18 ab		0,83±0,24 bc		1,02±0,26 cd
D	48		0,1±0,07 a		0,13±0,07 a		0,4±0,18 ab		0,52±0,24 abc		0,56±0,26 abc
E	48		0,19±0,07 ab		0,58±0,23 c		0,88±0,18 b		1,06±0,24 c		0,98±0,26 bcd
F	48		0,1±0,06 a		0,17±0,07 ab		0,44±0,18 ab		0,27±0,24 ab		0,29±0,26 ab
G	48		0±0 a		0,04±0,03 a		0,13±0,18 a		0,1±0,24 a		0,13±0,26 a
EXP X MEDIO		0,752		0,418		0,125		0,812		0,725	
Casos tot.	384		0,13±0,02		0,27±0,05		0,49±0,06		0,58±0,09		0,63±0,09

Nota. Medios de cultivo: MS=medio control sin hormonas; A=KIN 4 µM; B= KIN 4 µM+IBA 2,45 µM; C= KIN 4 µM+IBA 4,9 µM; D= KIN 4 µM+IBA 9,8 µM; E=KIN 4 µM+2,4-D 0,15 µM; F= KIN 4 µM+2,4-D 0,3 µM; G= KIN 4 µM+2,4-D 0,6 µM; H=TDZ 1 µM+IBA 4,9 µM; I=TDZ 1 µM+2,4-D 0,3 µM. Tipo de explante: LONG=longitudinal; EPI=epicótilo; HIPO=hipocótilo. Promedio calculado como total rebrotes por total explante en las mismas condiciones ± error estándar. P-value=significativo a P ≤ 0.05. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes para P =0.05 según la Student-Newman-Keuls.