



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Fitomejoramiento
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Biotecnología de Plantas				
Título del proyecto:	Micropropagación de <i>Mammillaria luethyi</i> (Hinton)				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	50,00	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica	e-mail del responsable: hgosuna@hotmail.com
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Fondos concurrentes:	40,000.00
Cooperante(s):	Museo del Desierto				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro				
A realizar durante el(los) año(s):	1 año				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dra. Hermila Trinidad García Osuna	0203	2440		
Colaborador:	Dra. Francisca Godina Ramírez	0203	1145		
Colaborador:	Dr. M. Humberto Reyes Valdés	0203	2174		
Colaborador:					
Colaborador:					
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Por asignar				
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo.		Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

PRODUCCIÓN DE SEMILLA SINTÉTICA DE *Mammillaria luethyi*(Hinton)

50,000.00

2.- Introducción

La tecnología de las semillas sintéticas combina las ventajas de la propagación clonal con la propagación por semilla y el almacenaje. Ha demostrado ser una estrategia viable para la conservación del germoplasma de plantas, y puede tener múltiples aplicaciones tanto científicas como industriales, permitiendo el manejo de los recursos naturales de forma sustentable. Dentro de las ventajas de la aplicación de esta tecnología se encuentra el mantener la uniformidad genética, almacenamiento por largos períodos, eliminación de la etapa final de la micropropagación (por ejemplo enraizamiento y aclimatización) permitiendo la entrega directa así como el desarrollo de sistemas de propagación rentables.

Las semillas sintéticas consisten en propágulos somáticos (yemas axilares, embriones somáticos, brotes u otros propágulos de desarrollo *in vitro*) capaz de conversión a plántulas en condiciones *in vitro* o *ex vitro*.

La aplicación de esta tecnología para la conservación de los miembros de familia Cactaceae no ha sido anteriormente propuesta.

Esta familia es originaria del Continente Americano, agrupa a cerca de 2000 especies, las cuales han logrado adaptarse a los climas desérticos. México es el país con mayor riqueza de estas plantas, con 913 taxones, de los cuales el 80 por ciento son endémicos del país. Tan solo la norma oficial emitida por la SEMARNAT en el 2010, incluye 275 especies de cactáceas en alguna categoría de protección, 92.3% son endémicas, donde la extracción ilegal de sus hábitats naturales es el problema fundamental de la disminución de las poblaciones de la familia Cactaceae. Otro factor es el cambio de uso de suelo.

Mammillaria luethyi es una especie endémica de Coahuila, aún no existe información sobre el estatus de esta especie dentro de la Norma Mexicana. Sin embargo es conocido que sus poblaciones son constantemente amenazadas por la extracción ilegal por coleccionistas, y cambio de uso de suelo, reflejando su vulnerabilidad. Por lo tanto, es urgente establecer medidas para su conservación y favorecer los mecanismos para su comercialización legal.

Objetivos

- Optimizar el protocolo de micropropagación
- Establecer la técnica para producir embriones somáticos de *M. luethyi*.
- Producir semilla sintética de *Mammillaria luethyi* a partir de embriones somáticos.

3.-Revisión de Literatura

México es el centro más importante del mundo en concentración de cactáceas. Los cactólogos reconocen la existencia de 913 taxones, conformando 669 especies, las cuales se encuentran agrupadas en 63 géneros, y se reconocen 244 subespecies. El estado de San Luis Potosí es el que posee una mayor diversidad, con un registro de 151 especies. Le siguen los estados de Coahuila con 126 especies y Nuevo León y Oaxaca con 118 especies cada uno (Guzmán *et al.*, 2003).

El género *Mammillaria* es probablemente el género más rico en especies y morfológicamente variable en las cactáceas. Este género presenta mayor sobreexplotación a nivel comercial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

Mammillaria luethyi es una especie endémica de Coahuila, aún no se encuentra registrada en la Norma Mexicana, la localidad tipo se encuentra en el municipio de Múzquiz y sus parámetros poblacionales son desconocidos hasta el momento. Por lo que se hace urgente medidas de conservación y de estudios poblacionales, para disminuir el impacto sobre sus poblaciones naturales.

El uso de la tecnología de semilla artificial para el rescate y la conservación de *M. luethyi* aún no ha sido desarrollado, ya se cuenta con el protocolo para su propagación. También existe antecedentes de propagación de cactáceas por la ruta de la embriogénesis somática, organogénesis directa e indirecta (Angulo-Bejarano *et al.*, 2011; Estrada-Luna *et al.*, 2013) que permite su propagación masiva y la obtención de material ideal para la encapsulación.

La encapsulación tecnológica presenta múltiples ventajas al reducir el costo de micropropagación de plantas y favorecer el almacenamiento a corto y mediano plazo. La semilla sintética (semillas artificiales o semillas somáticas) son análogas a las verdaderas o semillas botánicas y consisten en cubrir embriones somáticos, plántulas, meristemos..etc con capas formando una cápsula de alginato o polímeros (Nieves *et al.*, 2003; Shing, 2006; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2007; Poobathy *et al.*, 2009 Dhir y Shekhawat, 2013). Éstas presentan ventajas como: uniformidad en la producción, alta capacidad de sobre-escalonamiento, potencial para automatización de producción, fácil manejo en el transporte y almacenamiento de germoplasma de élite, o en peligro de extinción (Singh *et al.*, 2007; Mallón *et al.*, 2007; Maqsood *et al.*, 2015).

4.- Procedimiento Experimental

El experimento se llevará a cabo en diferentes etapas:

Establecimiento de *Mammillaria luethyi*.

Se obtendrán los explantes de planta madre. Se determinarán pretratamientos para su establecimiento con tratamientos

fitosanitarios. Se establecerán explantes de mamilas en medio Murashige y Skoog (MS) a mitad de su concentración suplementados con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCL, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar(SIGMA®,A-1296) ajustando a un pH de 5.7 y se esterilizará a 120° C durante 15 minutos y se transferirán al cuarto de incubación a una temperatura de 25±1° C, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux.

Producción de callo

Para esta etapa se utilizarán brotes obtenidos en la etapa de establecimiento. Se sembrarán en medio basal MS adicionado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (SIGMA®,I-3011), 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCL, 1 mg L⁻¹ de piridoxina- 80 mg L⁻¹ de adenina, 30 g L⁻¹ (SIGMA®,K-0753) de sacarosa, 4 g L⁻¹ de phytigel y Picloram a diferentes concentraciones (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) se ajustará a un pH de 5.7. Se evaluará las características de callo.

Inducción de células embriogénicas a partir de callo

Los brotes se trasvasarán a medio de cultivo PCL2, suplementado con 0.1 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0.001 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.001 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0.1 mg L⁻¹ de riboflavina, 0.002 g L⁻¹ de glicina más 80 mg L⁻¹ de adenina, 1 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 4 g L⁻¹ de phytigel a un pH de 5.7. Se colocarán 20 ml de medio de cultivo en frascos tipo gerber y se esterilizará en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se establecerán 9 tratamientos con la combinación de Kinetina y Ácido Giberélico en las siguientes concentraciones 0.0, 0.5 y 1 mg L⁻¹. Una vez solidificado el medio se trasvasarán 0.5 g de callo por frasco bajo la campana de flujo laminar. Se llevarán a la cámara de incubación a una temperatura de 25°C ± 2°C, con un fotoperíodo de 18 h luz por 6 h de oscuridad durante 1 mes.

De los embriones somáticos generadas en esta fase del cultivo, se tomarán los embriones que se encuentren en etapa de torpedo con la finalidad de llevar a cabo la producción de semilla sintética.

Protocolo para la producción de semilla sintética

1. Dentro de la campana de flujo laminar, se tratará de individualizar los embriones somáticos en la medida de lo posible dentro de una caja Petri.
2. Los explantes serán sumergidos en el medio de cultivo (MS modificado libre de calcio). Se agregará alginato de calcio en tres concentraciones (2, 3 y 4% p/v).
3. Con ayuda de una pipeta se tomarán las plántulas, y se depositarán, en el medio líquido con el cloruro de Calcio a diferentes concentraciones (75, 100 y 120 mM).
4. Las cápsulas se dejarán dentro del cloruro de calcio en tres tiempos (5, 15 y 30 m).
5. Con ayuda de una coladera de metal y agua destilada y esterilizada, se enjugarán las esferas para eliminar los restos de medio de cultivo con sustancias de encapsulamiento.
6. Las semillas obtenidas se acomodarán en grupos de 5 a 10 semillas en frascos con medio de cultivo MS al 50% y adicionado con carbón activado.

Las variables a evaluar serán relación entre diámetro mayor/ menor de la cápsula y firmeza.

Reconversión a suelo

Se abrirán las cápsulas de alginato a las 4 y 8 semanas de formadas las semilla sintéticas. Se sembrarán en sustrato (peat-moss:perlita 1:1) . Se determinará el porcentaje de sobrevivencia.

Todos los datos serán analizados con una ANOVA y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico de R®.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Colecta del material vegetal	X					X						
Establecimiento del cultivo		X										
Producción de embriones somáticos			X	X	X							
Estandarización de la técnica para obtención de semilla sintética						X	X					
Producción de semilla sintética de <i>M. luethyi</i>							X					
Siembra en sustrato (% de sobrevivencia)								X	X	X		
Análisis estadístico											X	
Evaluación de resultados											X	
Informe												X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Salidas a campo	X					X						
Compra de reactivos		X	X	X								

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Tesis de Licenciatura
- 1 Artículo científico
- Asistencia a congreso

6.-Literatura Citada

Angulo -Bejarano P. I., Paredes -López O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae*. 128: 283-288.

Estrada-Luna, A.A., Arrellano-Perusquia, A.A., López-Peralta, M.C.G., Chablé-Moreno, F. 2013. Effect of Regulators on the Organogenesis and Multiplication of *Ortocactus macdougallii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*, 13(4): 160-167.

Cangahuala-Inocente GC, Dal Vesco LL, Steinmacher D, Torreos AC, Guerra MP (2007). Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Biuret). Induction, conversion and synthetic seeds. *Science Horticulturae* 111:228-234.

Dhir R., Shekhawat., G.S. 2013. Production, storability and morphogenic response of alginate encapsulated axillary meristems and genetic fidelity evaluation of in vitro regenerated *Ceropegia bulbosa*: A pharmaceutically important threatened plant species. *Industrial Crop and Products* 47:139-144.

Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. CONABIO, UNAM. México, D.F.

Mallón, R., Barros P., Luzardo, P. and González M.L. 2007 Encapsulation of moss buds: an efficient method for the in vitro conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.88, p.41-49, 2007

Maqsood M., Mujib, A. Khusrau, M. 2015. Preparation and low Temperature Short-term Storage for Synthetic of *Caladium bicolor*. *Notulae Scientia Biologicae*, 7 (1): 2067-3264.

Nieves, N., Y. Zambrano, R. Tapi, M. Cid, D. Pina and R. Castillo. 2003. Field Performance of Artificial Seed-Derived Sugarcane Plant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75(3): 279-282.

Poobathy R., Nair, H., Subramainam, S. 2009. Optimisation of Encapsulation-dehydration protocol for the orchid Hybrid *Ascocenda* "Princess Mikasa". *Advances in Environmental Biology* 3(1): 69-83.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-ECOL-2010. *Diario Oficial de la Federación* (Segunda sección: 6 de marzo). 1-78.

Singh, A.K. 2006. Plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 42:109-113.

Singh B, Sharma S, Rani G. 2007. In vitro response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. Deliciosa* Tenora). *Plant Biotechnology Repository* 1:101-107.