

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE AGRONOMIA



GERMINACION Y CULTIVO DE TEJIDOS
DE ESPECIES CACTACEAS
IN VITRO

POR:

MARCO GERARDO HERAS CUEVAS

TESIS

Presentada Como Requisito Parcial
Para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTURA

Buena Vista, Saltillo Coahuila, México.

Junio de 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DIVISION DE AGRONOMIA



GERMINACION Y CULTIVO DE TEJIDOS
DE ESPECIES CACTACEAS
IN VITRO

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



BIBLIOTECA

POR:

MARCO GERARDO HERAS CUEVAS

TESIS

Presentada Como Requisito Parcial
Para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTOR

Buenvista Saltillo Coahuila. México.

Junio de 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

División de Agronomía.

Germinación y cultivo de tejidos de especies
cactáceas in vitro

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"

Por

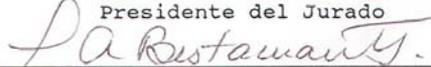
Marco Gerardo Heras Cuevas

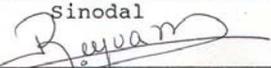
T e s i s

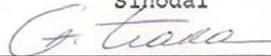
Que somete a la consideración del H. Jurado **BIBLIOTECA**
Examinador como requisito parcial,
para obtener el título de
INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTURA




Dr. Marco Antonio Bustamante García
Presidente del Jurado


Ing. M.S. Leticia A. Bustamante García
Sinodal


M.C. Clara Rosa Leyva Moreno
Sinodal


Ing. M.C. Cesar Estrada Torres
Coordinador de la División de Agronomía

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"



Junio 1990

División de Agronomía
Coordinación.

DEDICATORIA

Al Dr. Marco Antonio Sustantante Garcia, por su
estinidad y apoyo durante la realizacion de este trabajo.

A mis padres

Elvia y Filiberto

Al Ing. Mg. Luis por haberme dado la dicha de la vida.
participacion como Jurado Examinador.

Al M.C. Oscar Jose Reyes Moreno, por su intervencion como
Jurado

A mis hermanos

Filiberto

Deyanira

Francisco

Citlali

A mi Alma Mater.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Bustamante García, por su
atinada dirección durante la realización de este trabajo.

Al Ing. M.S. Leticia A. Bustamante García, por su
participación como Jurado Examinador.

Al M.C. Clara Rosa Leyva Moreno, por su intervención como
Jurado Examinador.

Indice	iii
INTRODUCCION	1
1.- Experimentos generales para la germinación	5
a. Humedad	5
b. Temperatura favorable	6
c. Oxígeno	7
d. Substrato adecuado	7
2.- Proceso de germinación	7
3.- Latencia	11
a. Factores ambientales	13

11.- Efecto de la luz	13
12.- Efecto de la temperatura	14
13.- Factores internos	15
14.- Teste dura	15
15.- INDICE GENERAL	15
16.- Presencia de inhibidores	16
	Pag.
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Indice General	iii
Indice de Figuras	iv
Resumen	ix
INTRODUCCION	21
REVISION DE LITERATURA	23
A.- Germinación de Semilla	23
MATERIA 1.- Requerimientos generales para la	26
A.- Ubicación germinación	5
B.- Germinación a. Humedad	25
C.- Germinación b. Temperatura favorable	26
D.- Germinación c. Oxígeno	27
E.- Germinación d. Substrato adecuado	27
B.- 2.- Proceso de germinación	27
CONCLUSION 3.- Latencia	12
LITERATURA a. Factores ambientales	13
APENDICE	28

1).- Efecto de la luz	13
2).- Efecto de la temperatura	14
b. Factores internos	15
1).- Testa dura	15
2).- Testa impermeable.....	15
3).- Presencia de inhibidores	16
4).- Embrión fisiológicamente	16
B.- Inducción de callo	16
1.- Efecto de las auxinas	18
C.- Inducción de tallos	21
1.- Efecto de las citocininas	22
D.- Inducción de raíces	24
1.- Efecto de las auxinas	24
MATERIALES Y METODOS	26
A.- Ubicación del experimento.....	26
B.- Germinación de semillas	26
C.- Cultivo de tejidos	29
RESULTADOS Y DISCUSION	30
A.- Germinación de semillas	30
B.- Cultivo de tejidos	46
CONCLUSIONES	58
LITERATURA CITADA	59
APENDICE	68

	<i>Chorezoria denegri</i> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	35
Figura 2.	Germinación de la semilla de <i>Mammillaria</i> INDICE DE FIGURAS MS con tres niveles de macroelementos	Pag
Figura 1.	Plantas de <i>Pelecyphora aselliformis</i> , mostrando el fruto donde se obtuvieron semillas para la germinación	28
Figura 2.	Germinación de la semilla de <i>Pelecyphora aselliformis</i> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	31
Figura 3.	Germinación de la semilla de <i>Mammillaria gumifera</i> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	32
Figura 4.	Germinación de la semilla de <i>Neolloydia lophophoroides</i> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	34
Figura 5.	Germinación de la semilla de	

	<u>Obregonia denegri</u> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	35
Figura 6.	Germinación de la semilla de <u>Aztekium ritteri</u> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	37
	normal	43
Figura 7.	Germinación de las semillas de <u>Epithelantha micromeris</u> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos, 90 días después de la siembra	38
	de la siembra	47
Figura 8.	Germinación de la semilla de <u>Epithelantha micromeris</u> , en un medio MS con tres niveles de macroelementos	39
	raíz de <u>Haplophygia lophophoroides</u> , a los	48
Figura 9.	Germinación de las semillas de seis especies cactáceas, en un medio MS con los macroelementos a 1/4 de la concentración normal	40
	<u>lophophoroides</u> , en respuesta a diferentes	
Figura 10.	Germinación de las semillas de seis especies cactáceas, en un medio MS con	51

Figura 10.	los macroelementos a 1/2 de la concentración normal	42
Figura 11.	Germinación de las semillas de seis especies cactáceas, en un medio MS con los macroelementos a la concentración normal	43
Figura 12.	Planta de <u>Neolloydia lophophoroides</u> germinada <u>in vitro</u> mostrando un desarrollo normal, a los 90 días después de la siembra	47
Figura 13.	Efecto del 2,4-D sobre la estimulación de callo a partir de explantes de tallo y raíz de <u>Neolloydia lophophoroides</u> , a los 32 días después de la siembra	48
Figura 14.	Estimulación de callo a partir de explantes de tallo de <u>Neolloydia lophophoroides</u> , en respuesta a diferentes concentraciones de 2,4-D, 90 días después de la siembra.	51

Figura 15. Efecto del 2,4-D sobre el peso de
callo por explante de tallo y raíz
de Neolloydia lophophoroides, a los 32
días después de la siembra 53

RESUMEN

Figura 16. Efecto del 2,4-D sobre el número de
areolas por explante de tallo de Neolloydia lophophoroides, a los 90 días
después de la siembra..... 54

Figura 17. Callo de explantes de tallo de Neolloydia lophophoroides, mostrando la
formación de areolas y emisión de nuevos tallos, después de 90 días en un medio
con 16 mM de 2,4-D. 55

Figura 18. Desarrollo de tallos de Neolloydia lophophoroides inducidos a partir de
callos de explantes de tallo, después de
120 días en un medio con 16 mM de 2,4-D 56

Fragmentos de tallos y raíces de plantas de Neolloydia lophophoroides producidas *in vitro*, fueron establecidas en un
medio MS conteniendo 0, 2, 4, 8, 16 y 32 mM de ácido

2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D): más 1 mM de
N-Benciladenina (BA). La formación de callo ocurrió en todos
los tratamientos, excepto en el pedic sin auxinas. Un 100% de
explantes de tallo con callo se logró con 4, 8, 16 y 32 mM;
mientras que con 2, 5 y **RESUMEN** se redujo en un 25% de
expiantes (de raíz) con callos. Para ambos tipos de

Las semillas de seis especies cactáceas se establecieron
en el medio MS con tres niveles de macroelementos (1/4, 1/2 y
la concentración normal). A los 45 días después de la
siembra, la especie Epithelantha micromeris presentó la mejor
respuesta a la germinación (100, 100 y 85%, respectivamente)
en los tres tipos de medios. A los 180 días la Neolloydia
lophophoroides presentó un 60% de germinación a la
concentración normal, un 50% a 1/4 y un 40% a 1/2 de la
concentración normal. Así tenemos también especies que
presentaron baja o nula respuesta a los tratamientos,
Obregonia denegri y Pelecypora aselliformis tuvieron un
porcentaje de germinación inferior al 10 % en todos los
tratamientos.

Segmentos de tallos y raíces de plantas de Neolloydia
lophophoroides producidas in vitro, fueron establecidas en un
medio MS conteniendo 0, 2, 4, 8, 16 y 32 mM de ácido

2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); más 1 mM de N⁶-Benciladenina (BA). La formación de callo ocurrió en todos los tratamientos, excepto en el medio sin auxinas. Un 100% de explantes de tallo con callo se logro con 4, 8, 16 y 32 mM; mientras que con 4, 8 y 16 mM se redujo en un 85% de explantes (de raíz) con callos. Para ambos tipos de explantes, con la concentración 16 mM se obtuvo el mayor peso de callo por explante. El color del callo varió entre blanco, verde y rojo. Además, los explantes de tallo; mostraron el mayor número (6 - 7) de areolas por explante, a una concentración 16 mM. El medio que solo contenía BA, se presentó la formación de tallos.

Alimentación (nopales, biznagas, tuná, pitayas, etc.), como : forraje para el ganado, remedios caseros, combustible y elementos de construcción, así como el cercado de sus viviendas.

Algunos cactus contienen elevadas de mucho beneficio, como en los tratamientos de ciertas dolencias cardíacas.

Sin dejar de mencionar el gusto que despiertan estas plantas por sus formas extraordinarias de raíz, tallo y hermosura de sus flores.

Sin embargo, la amenaza de extinción que se cierna sobre las cactáceas en México aumenta, día con día. Las principales causas son la destrucción del medio ecológico en que habitan y la recolección excesiva de ejemplares con fines comerciales.

INTRODUCCION

México, por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y clima, es el país que alberga posiblemente, la mayor cantidad de especies de cactáceas.

Las cactáceas han jugado un papel muy importante en la formación y culturización de grupos étnicos. En la actualidad siguen estando presentes en las actividades de comunidades aisladas, rurales y suburbanas; se encuentran en parte de su alimentación (nopales, biznagas, tunas, pitayas, etc.), como : forraje para el ganado, remedios caseros, combustible y elementos de construcción, así como el cercado de sus viviendas.

Algunos cactus contienen alcaloides de mucho beneficio, como en los tratamientos de ciertas dolencias cardíacas.

Sin dejar de mencionar el gusto que despiertan estas plantas por sus formas extraordinarias de raíz, tallo y hermosura de sus flores.

Sin embargo, la amenaza de extinción que se cierne sobre las catáceas en México aumenta, día con día. Las principales causas son la destrucción del medio ecológico en que habitan y la recolección excesiva de ejemplares con fines comerciales.

El desarrollo de las cactáceas es extremadamente lento en condiciones naturales, y en lo que respecta a la propagación por métodos convencionales, no todas estas técnicas son ideonas para cada una de las especies existentes como enraizamiento de esquejes de tallo, o el de ramificaciones de hijuelos.

Por eso es imprescindible buscar nuevos métodos que permitan una rápida multiplicación de las plantas y de esta manera su conservación. La micropropagación es una alternativa, por lo que Mauseth (1977) y Benson (1977), entre otros, han propuesto la metodología de cultivo de tejidos, como una forma de preservar especies de cactáceas en vías de extinción.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es establecer las metodologías para el cultivo de tejidos de algunas especies cactáceas, existentes en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".

diseminadas, y la presencia de latencia en algunas especies, dando como resultado que no se tenga un microclima que proteja el desarrollo de las plántulas, en tanto estas llegan a formar los tejidos protectores y de almacenamiento (Bravo, 1973).

REVISION DE LITERATURA

A. GERMINACION DE SEMILLAS. Las numerosas brotas o pueden enraizar fácilmente de cortes; sin embargo, en muchas especies. Una semilla está formada por un embrión y su provisión de alimento almacenado, rodeados por cubiertas protectoras. Durante la germinación de la semilla, el metabolismo celular se incrementa, el embrión reanuda su crecimiento activo, las cubiertas de las semillas se rompen y emerge la plántula (Hartmann y Kester, 1980). Como no es factible en caso de especies que tienen un crecimiento extraordinariamente lento y/o succe. La semilla de las cactáceas presenta variación en la forma, tamaño, estructura y color de la testa; así como en las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas. rurales, por lo que es imprescindible inducir un desarrollo rápido de individuos juveniles. Aunque los frutos de las cactáceas producen generalmente numerosas semillas, muy pocas son las que llegan a germinar y producir nuevas plantas, por el hecho de que son víctimas por parte de las hormigas, aves y mamíferos, al servirles de alimento; así como por las condiciones desfavorables para la germinación, a que quedan expuestas frecuentemente al ser

diseminadas, y la presencia de latencia en algunas especies, dando como resultado que no se tenga un microclima que proteja el desarrollo de las plántulas, en tanto éstas llegan a formar sus tejidos protectores y de almacenamiento (Bravo, 1978).

Muchos cactus producen numerosos brotes o pueden enraizar fácilmente de cortes; sin embargo, en muchas especies o en gran número de especies ninguno de estos métodos puede ser usado, por lo que la propagación debe hacerse por semilla. Las semillas pueden ser difíciles de obtener debido a la rareza de las plantas y a la autoesterilidad, teniéndose además que la propagación a partir de semillas a menudo no es factible en caso de especies que tienen un crecimiento extremadamente lento y/o susceptible al Damping off (Mauseth, 1979).

Plantas como las cactáceas presentan un desarrollo extremadamente lento en condiciones naturales, por lo que es imprescindible inducir un desarrollo rápido de individuos jóvenes, que puedan ocupar el lugar de los adultos a la muerte de estos últimos, y así, poder cumplir con sus funciones de retener suelo y agua, y evitar la desertificación de las zonas áridas, su hábitat natural (Harrington, 1980).

Como ejemplo, el crecimiento de Echinocactus grusonii es tan lento que las plantas obtenidas de una germinación realizada en 1966 por Nava y Chávez (1982), aún no han florecido.

Carey, (1980) menciona que Carnegiea gigantea, nativa del Desierto de Sonora, se reproduce con éxito en años de buenas lluvias y pueden pasar de 7 a 20 años entre las generaciones de plantas.

Cuando los cactos nacidos de semilla alcanzan un tamaño de más o menos 2 cm, es el momento de trasplantarlos, tardando esto aproximadamente uno o dos años, según la especie (Rivas, 1981).

1.- Requerimientos generales para la germinación.

Existen cuatro requisitos generales para la germinación de la mayor parte de las semillas. Estos son:

a. Humedad.- Para la germinación se requiere un suministro adecuado de humedad, el cual se da a través del medio de germinación o sustrato. Debe ser evitado un excesivo humedecimiento del sustrato o de las semillas, ya que interfiere con una adecuada aireación y disponibilidad de oxígeno.

la técnica para germinar.

Pilbeam (1980) al trabajar con semillas de cactáceas, encontró que al encerrar completamente las semillas con polietileno durante los 3, 6 ó 12 meses después de la siembra en caja con sustrato, se obtenía un buen control de la humedad. Para prevenir un Damping off se aplicó un riego con fungicida a base de cobre.

b. Temperatura favorable.- Las semillas varían ampliamente con relación a sus requerimientos de temperatura para la germinación. Para cada clase de semilla hay tres puntos cardinales de la escala de temperatura: mínima, óptima y máxima. La temperatura mínima es la temperatura por debajo de la cual no hay germinación. La temperatura óptima es la que permite obtener la máxima germinación en el menor tiempo. La temperatura máxima es la temperatura por encima de la cual no hay germinación.

En la actualidad no existen recomendaciones de los rangos de temperaturas requeridas para el 85% de las especies de cactáceas (Mrinskii, 1985). Sin embargo, Fearn (1981) indica que las temperaturas alternas parecen producir mejores resultados de germinación que las temperaturas constantes.

Por otra parte, Pilbeam (1980) menciona que se han hecho pruebas de germinación en cactáceas y se ha visto que 20°C es

la óptima para germinar.

c. Oxígeno.- El oxígeno es raramente un factor limitante, a menos que un humedecimiento excesivo de la semilla o del substrato restrinja la aireación. Sin embargo, este factor puede ser limitante en el suelo debido a una excesiva compactación.

d. Substrato adecuado.- El substrato es el medio utilizado para conservar la humedad y proveer un medio en el cual las semillas puedan germinar y crecer.

El substrato reportado por Avolio (1982) para germinación de semillas de cactáceas, consistía de compost de 1/2 de turba, 1/4 de tierra de hoja y 1/4 de arena, lavado todo y cernido finamente. La esterilización se realizó saturando el medio con agua y sometiéndolo a una temperatura de 100 a 125°C por 15 a 20 minutos aproximadamente, en el horno.

2.- Proceso de germinación

El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico y complejo, que está rigurosamente controlado, en donde los reguladores del crecimiento juegan un papel importante, no

únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973).

Los reguladores del crecimiento son sustancias mensajeras, la mayoría de las veces activas en muy pequeñas cantidades, en donde los lugares de síntesis y acción generalmente son distintos, siendo en algunos casos, activos en el mismo sitio de formación (Minocha, 1974). En general, presentan un espectro de acción muy amplio y diverso, además pueden influir en múltiples procesos, totalmente distintos y al mismo tiempo en diferentes partes de la planta.

El papel que desempeñan los reguladores del crecimiento en el proceso de germinación es:

a.- El agua del medio entra a la semilla, y tanto las células del embrión como del endospermo se hidratan y entran en actividad, por lo que la semilla se hincha. La absorción de agua es un proceso físico-químico y se lleva a cabo más rápidamente a altas temperaturas.

b.- El embrión empieza a producir ácido giberélico (GA_3) que actúa en la capa de aleurona que rodea al endospermo y la induce a secretar enzimas hidrolíticas como amilasa, glucosidasa, fosforilasa, lipasa, etc.

c.- Por acción de la amilasa y otras enzimas, el almidón pasa a glucosa, teniendo el embrión energía para su desarrollo.

d.- El embrión empieza a producir citocininas, hormonas que junto con el GA_3 , inducen síntesis de otras enzimas que degradan a las proteínas y lípidos en compuestos más simples.

e.- Por acción de las citocininas y contando con la energía de la glucosa y con proteínas solubles, las células del embrión se dividen activamente; en este momento termina la germinación al romper la raíz la testa de la semilla.

f.- Las células del endospermo y posteriormente las del embrión, sintetizan auxinas que inducen el alargamiento de los meristemas de la radícula, primero, y del talluelo después, con un rápido crecimiento; las auxinas determinan también el inicio de la diferenciación de los tejidos, así como el crecimiento direccional del talluelo hacia arriba, y el de la raíz hacia abajo (Overbeek, 1968).

Ruiz y Vidal (1989) obtuvieron un porcentaje de emergencia de 72.5% en semillas de durazno (Prunus persica L.), después de darles una estratificación de 800 horas frío y escarificación, más ácido giberélico (AG_3) a 150 ppm.

A las semillas de algarrobo (Ceratonia silicua L.) se les proporcionó un tratamiento óptimo con el objetivo de adelantar la germinación. Siendo una inmersión de 50 a 60 minutos en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). El medio de propagación utilizado fué una mezcla de 1/3 de tierra de hoja, 1/3 de tierra del lugar y 1/3 de arena, la cual se utilizó con el propósito de hacer el medio más suave y propio para la germinación (Salazar, 1989).

Al hacer un estudio sobre la germinación y calidad de la planta de capulín (Prunus serotina EHRH), se encontró que ésta no necesita de bajas temperaturas para germinar (estratificación), observándose que con la escarificación mecánica (eliminación del endocarpio), se aumentó la velocidad de germinación, apareciendo la radícula a los 10-12 días y presentándose las dos primeras hojas en los 20-22 días posteriores a la siembra (García y Pérez, 1987).

La aplicación de kinetina, etephon y giberelinas (GA_4-7) a las semillas de Ambrosia artemisiifolia L. resultó que para la primavera solo el 20% de las semillas estaban latentes. Cuando no se aplicó ningún producto, se observó un 89% de semillas latentes, entrando éstas a una latencia secundaria (Saminy y Khan, 1983).

Al tratar de germinar varias especies cactáceas en

compost, se obtuvo un porcentaje bajo de germinación; y las semillas que no germinaron, se les rompió la testa por el borde del hilio, se obtuvo el embrión; posteriormente se colocaron en un nuevo medio estéril, y a las 24 a 48 horas empezó la germinación, mejorándose los resultados hasta en un 100% (Novelli y Meregalli, 1982). Sin embargo, existen métodos más simples como el descrito por Mrinskii (1985). Un contenedor preparado con semillas de cactáceas es mantenido a una temperatura de 14-16°C durante 5-8 días, siendo esta temperatura ideal para ciertas cactáceas que empiezan a germinar. Después, la temperatura se eleva a 20-22°C, germinando rápidamente una porción de las semillas restantes en el curso de 2-4 días. La etapa final es otra elevación de temperatura a 30-35°C y las semillas que han quedado sin germinar lo hacen en 2-3 días. El porcentaje de germinación alcanza 90-95%, aún con especies francamente difíciles, en el curso de 9 a 15 días.

Avolio (1982) encontró que utilizando un medio estéril y saturándolo desde abajo por imbibición con agua esterilizada, sellando los semilleros con bolsas de celofán y manteniendo una temperatura de 18-20°C, obtuvo del 80 al 90% de germinación, aún en semillas como: Melocactus, Obregonia, Epithelantha, etc.

3.- Latencia *En condiciones ambientales. Si se mantiene seca o a baja temperatura las semillas no germinan*

Una semilla latente es una semilla que está viva pero que no germina bajo ciertas condiciones favorables para la germinación de otras semillas no latentes de la misma clase. La latencia puede manifestarse como la completa inhabilidad de las semillas para germinar o en un aumento específico en los requisitos de germinación (Delouche, 1965).

Sin embargo, Rojas y Ramirez (1987) mencionan que toda semilla ya formada tiene la posibilidad de germinar si las condiciones de humedad, temperatura y aireación son correctas, o de no germinar si el ambiente es frío o seco, sin morir por ello. Esta posibilidad de mantenerse en vida pero con el metabolismo suspendido, se denomina vida latente. A la incapacidad para germinar, aunque las condiciones del medio sean correctas, hasta cubrir ciertos requisitos (un determinado estímulo específico), se denomina letargo.

Bidwell (1979) define el letargo como un periodo forzoso de baja actividad metabólica, bajo contenido de agua y nulo crecimiento, durante el cual la semilla es muy resistente a los rigores del frío y de la sequía.

Fearn (1981) señala que hay dos tipos de latencia en las semillas: la latencia impuesta, la cual es indirectamente

inducida por factores ambientales. Si se mantiene seca o a baja temperatura, la mayoría de las semillas no germinan hasta que la humedad y temperatura apropiadas estén disponibles. Y la latencia verdadera que no es directamente impuesta por el ambiente y es imposible hacer que las semillas germinen, simplemente dando las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento. Esta latencia puede ser eliminada por la exposición a ciertas condiciones específicas que pueden tener muy poco en común con las condiciones óptimas del crecimiento.

Los principales mecanismos que causan letargo en las semillas o lo prolongan impidiendo la germinación, son los siguientes:

a. Factores ambientales

1).- Efecto de la luz. La necesidad de luz para la germinación es un mecanismo que impide la germinación de semillas pequeñas enterradas muy profundamente, tanto que agotarían sus reservas antes de alcanzar la superficie y poder ser autótrofas (Bidwell, 1979).

Fearn (1981) indica que hay tres tipos principales de respuesta de las semillas a la luz: I). Indiferente. Las semillas germinan iluminadas y no iluminadas. II). Sensitivo

a la luz. Las semillas que pertenecen a este grupo no germinan a menos que sean iluminadas en el estado embebido. El autor ha encontrado que la mayoría de las Cactáceas y Mesembryanthemaceae pertenecen a este tipo. III). Luz fuerte. La semilla no germina en la luz y deberá ser mantenida en la oscuridad durante la germinación. Dependiente de la edad de la semilla. Esto puede ser influenciado con los cambios de la

2).- Efecto de la temperatura.

En muchas plantas la temperatura es un factor que afecta tanto el rango como el porcentaje de germinación, y se ha demostrado que diferencias relativamente pequeñas pueden modificar grandemente la respuesta de la germinación (Roberts, 1972). Semillas de diferentes especies y edades también germinan con rangos variantes de temperatura (Thompson, 1968).

1).- Tratamiento térmico.

El tratamiento con bajas temperaturas es esencial para la germinación de muchas semillas, y la alta temperatura puede ser inhibitoria en el momento de la germinación. (Bidwell, 1979).

activa y Bidwell, 1979).

Algunas observaciones sobre los requerimientos de temperatura de las Cactáceas hechas por Fearn (1981) son:

Depende de la cantidad de agua al embrión y también de

I). Extremos de temperatura no favorecen a la germinación; menos o más de 12°C producen una germinación

pobre. activos y por lo tanto antes de que una semilla pueda germinar, el embrión necesita oxígeno (Bidwell, 1979).

II). Diferentes especies tienen diferentes rangos de temperatura.

III). El rango de temperatura es dependiente de la edad de la semilla. Esto puede ser influenciado con los cambios de la actividad metabólica.

IV). Las temperaturas fluctuantes parecen producir mejores resultados de germinación que las temperaturas constantes.

b.- Factores internos

1).- Testa dura.

El embrión no puede romperla, debe generar durante la germinación fuerza suficiente para romper la testa. Está claro que las fuerzas generadas por la imbibición no son suficientes por sí solas, se necesita también del crecimiento activo (Bidwell, 1979).

2).- Testa impermeable.

Impide la entrada del agua al embrión y también el intercambio de gases con el ambiente; el oxígeno es esencial para mantener la energía que estimula los procesos

germinativos y por lo tanto antes de que una semilla pueda germinar, el embrión necesita oxígeno (Feran, 1981).

3).- Presencia de inhibidores. una masa amorfa de tejido.

Se encuentran en la testa o en el endospermo, que reprimen el desarrollo inicial del embrión (Rojas y Ramírez, 1987).

Las semillas de las plantas desérticas generalmente contienen un mecanismo detector de la lluvia basado en los contenidos de inhibidores, esto habilita a las plantas a medir y responder a cantidades de lluvia adecuadas para su completo desarrollo. Solo cuando estas cantidades suficientes de agua han caído, suficientes inhibidores habrán sido lavados para permitir que las semillas germinen (Tevis, 1958).

4).- Embrión fisiológicamente inmaduro. Es aquel que no es capaz de poner en marcha ciertos sistemas enzimáticos (Rojas y Ramírez, 1987).

B.-INDUCCION DE CALLO callo a partir de una porción vegetal. Hurtado y Merino (1987) definen el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos

diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de gran variabilidad desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido.

En general, los callos derivados de raíces y plántulas

La formación de callos se puede iniciar a partir de diversos tejidos de la planta y el éxito del establecimiento del cultivo depende en gran parte del estado fisiológico en que ésta se encuentra y de las condiciones del medio (Loyola y Robert, 1985).

La auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico. La auxina se sintetiza

Ha habido algunos intentos de cultivo de tejidos en cactáceas. Con el cultivo de callos estériles, Steinhart (1962), estaba interesado en cultivar Trichocereus spachianus para investigar la biosíntesis de alcaloides. Por otra parte, se ha aprendido a utilizar el callo en la investigación en fisiología vegetal y organogénesis (Savidge, 1983), embriogénesis (Turnham y Northcote, 1982), fitotoxicología (Mumma y Hamilton, 1983) y estudios de ultraestructura celular (Sjolound, et al , 1983), así como también en la propagación de plantas (Abbott, 1978).

La inducción de callos en cactáceas se produce

La inducción de callo a partir de una porción vegetal, sucede cuando el inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua (Yeoman y Macleod, 1977).

Dependiendo del inóculo, la proliferación del callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal (hoja, raíz, polen, embriones, semillas, etc) o sus partes. En general, los callos derivados de embriones y plántulas tienen un mayor potencial para la morfogénesis (Laksmi, 1982).

1.- Efecto de las Auxinas

El término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico. La auxina se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes y en general en los meristemas (Rojas y Ramírez, 1987).

Las auxinas más ampliamente usadas son:

- Acido 3-indolacético (AIA).
- Acido 3-indolbutírico (AIB).
- Acido naftalenacético (ANA).
- Acido 4-clorofenoxiacético (CPA).
- Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
- Acido 4-amino-3,5,6-tricolopicolínico (Tordón producto comercial).

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de fenómenos

de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en las células o estructura vegetal. Hasta la fecha, se ha ido acumulando una enorme cantidad de datos sobre los efectos auxínicos en las plantas, encontrándose que éstos son muchos y muy variados, siendo los principales los que afectan el alargamiento y la división celular (Bidwell, 1979), la formación de brotes, raíces y tejido calloso, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical, embriogénesis, etcétera.

En el caso del callo se promueve una desdiferenciación celular, retornando las células a una fisiología de meristemo, tomando diversos caminos de rediferenciación, o formando masas de células indiferenciadas (Rojas y Ramírez, 1987).

Al hacer un estudio para la obtención de callo a partir de yemas y semillas germinadas de Neomammillaria profilera M. (cactácea), utilizando el medio Murashige y Skoog (1962), Minocha y Mehra (1974) reportan que los mejores resultados se obtuvieron a partir de una concentración de 2,4-D de 10 -20 mg/litro más 20 % de leche de coco.

Resultados similares fueron obtenidos por Johnson y Emimo (1979) con Mammillaria elongata, expuesta al 2,4-D

(2-10 mg/litro) con niveles complementarios de 1-2 mg/litro de una citocinina (N⁶ dimetil alil aminopurina - 2iP -), en un medio de Murashige y Skoog (1962).

Una respuesta satisfactoria a la formación de callo en Tricocereus spachianus se obtuvo con un nivel óptimo de leche de coco del 10% y una concentración de 2.5 mg/litro de 2,4-D (Steinhart, 1962).

La organización de callos, ya sea hacia la organogénesis o la embriogénesis, producirá un número casi ilimitado de plantas. No obstante, se ha observado (Robert y Loyola, 1985) que cuando los callos se mantienen durante largos periodos in vitro, van perdiendo su capacidad de responder a los reguladores del crecimiento, fenómeno conocido como habituación.

Por otro lado, se ha encontrado que una fase intermedia de callos inducida entre el inóculo y la planta diferenciada, puede dar origen a individuos diferentes a la planta original, producto de la clonación (Larkin y Scowcroft, 1981), no siendo del todo indeseable, ya que puede ser una técnica para obtener plantas resistentes a condiciones adversas, aun cuando se desconoce el mecanismo genético en la producción de estas variantes.

C.- INDUCCION DE TALLOS

El efecto de las citoquininas es empleado para el crecimiento de las plantas depende de la actividad de los meristemas. Algunos de éstos como el apical de tallo y raíz pueden permanecer en forma activa por mucho tiempo llamándoseles meristemas indeterminados. Los de las yemas de flor y hoja tienen un corto período de actividad, para luego diferenciarse en un órgano y se consideran meristemas determinados.

Como ya se mencionó con anterioridad, casi con cualquier parte de la planta se puede iniciar el cultivo in vitro sin embargo, los meristemas apicales han sido los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas en una amplia gama de cultivos económicamente importantes (Quak, 1979). Si se les proporciona un medio adecuado para su desarrollo (y Murashige, 1974), los meristemas pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes; las plantas regeneradas, usualmente retienen las características genéticas de los progenitores por su naturaleza diploide de las células meristemáticas.

1.- Efecto de las Citocininas. elongación del tallo, pero estimulan el desarrollo de las hojas, según en el retraso de

El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. La gran mayoría de éstas (naturales y/o sintéticas), son derivados de la adenina, pero las fenil-ureas siendo tan diferentes de las adeninas, también presentan actividad citocínica.

Entre las citocininas, las más ampliamente usadas son:

- N⁶ bencil aminopurina (BA).
- N⁶ dimetil alil aminopurina (2iP).
- N⁶ furfurilaminopurina (Cinetina).
- N⁶ 4-hidroxi, 3 metil, 2-butenil adenina (zeatina).

Las citocininas no se mueven en la planta con tanta facilidad como las giberelinas y las auxinas; sin embargo, hay evidencia de que se forman en las raíces y se transportan a las hojas y tallos (Bidwell, 1979). Es un movimiento acropétalo vía xilema principalmente (Torrey, 1976).

Las citocininas promueven la división celular y el efecto tiene lugar a concentraciones muy bajas; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones la iniciación del crecimiento de raíces

laterales; además, inhibe la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas; actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden inducir yemas o brotes en tejidos in vitro de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (Hurtado y Merino, 1987).

Rojas y Ramírez (1987) mencionan que un efecto de la citocininas es determinar la dominancia apical, por la que el crecimiento de las ramas se supedita al del tallo en velocidad y dirección; en este fenómeno interaccionan con las auxinas. debido a la falta de cualquiera de estos reguladores.

Johnson y Emino (1979) reportan que para el desarrollo de retoños de Mammillaria elongata in vitro se utilizó 10 mg/litro de 2iP y 1 mg/litro de AIA.

El cultivo de raíces fue uno de las primeras aplicaciones. El efecto de las citocininas sobre explantes con areolas de Opuntia polyacantha, fue activar al meristemo axilar y un brote de hojas verdes fue producido. Con 10 ppm de benzilaminopurina se activaron el 100% de las areolas (Halperin y Mauseth, 1975). por un periodo indefinido, en un medio líquido que contenía sales inorgánicas, sacarosa y A. A una concentración de 2 mg/litro de benciladenina, se obtuvo una mayor proliferación de brotes in vitro de zarzamora, utilizando las sales basales de Anderson (Ruíz y