

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Micropropagación de *Turbinicarpus hoferi*,

T. pseudomacrochele ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y

T. schmiedickeanus ssp. *klinkerianus*

Por:

Lucía Rosales Marines

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

Ingeniero en Agrobiología

Buenvista, Saltillo, Coahuila

Diciembre de 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Micropropagación de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*,
T. schmiedickeanus ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*

Por:

Lucía Rosales Marínes

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como

Requisito Parcial para Obtener el Título de:

Ingeniero en Agrobiología

Aprobada por:

M.C. Leticia Escobedo Bocardo
Presidente del Jurado

Biol. Hermila T. García Osuna
Sinodal

M.C. Francisca Ramírez Godina
Sinodal

M.C. Ricardo Requejo López
Sinodal

M.C. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía

Buenvista, Saltillo, Coahuila. Diciembre de 2005

“Cuando una persona realmente desea algo, el Universo entero conspira para que realice sus sueños. Así sucede si aprendemos a escuchar la voz del corazón y comprendemos aquel lenguaje que trasciende las palabras, el que muestra aquello que los ojos no pueden ver...”

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", por abrirme sus puertas y darme todos los medios que me permitieron formarme como profesionista.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, por haber depositado en mi toda su confianza para realizar este trabajo. Porque sin su ayuda la culminación de esta etapa no hubiera sido posible. Por brindarme su amistad y su afecto en todo momento. ¡Gracias, Maestra!

A la Biol. Hermila T. García Osuna, porque gracias a su apoyo he podido llegar a una de las metas más grandes de mi vida. Por darme su confianza y su amistad sincera. ¡Gracias, Hermila!

Al M.C. Ricardo Requejo López, por las sugerencias durante el desarrollo del trabajo para que éste resultara más completo.

A la M.C. Francisca Ramírez Godina, por sus aportaciones y sugerencias, y por el tiempo invertido para la revisión del trabajo.

A la Biol. Ana María Ochoa Rivera, por toda su ayuda en cuanto a la realización del trabajo de laboratorio.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT), por darme el apoyo económico para poder llevar a cabo esta investigación.

DEDICATORIA

A mis papás:

Sra. María del Socorro Marines Gómez

Sr. Jaime Rosales López

Por haberme dado la vida y por heredarme la más valiosa de las fortunas: la educación. Porque me han enseñado que lo más grande que tiene un ser humano en el mundo es la familia y sus valores, y porque me regalaron la mejor de todas. Porque me han enseñado, también, que las cosas sólo se logran con mucha dedicación, esfuerzo y trabajo. Porque admiro enormemente el amor que tienen por su profesión y la entrega con que siempre se han dedicado a su trabajo. Porque lo que soy, es gracias a ellos.

Gracias por darme todo su apoyo, su confianza y su amor, y porque nunca me dejaron sola, aún cuando me equivoqué en el camino y sentí que todo se había perdido... ¡Los amo!

A mis hermanos:

Lucero

Ricardo

Porque aunque somos muy diferentes siempre han estado para escucharme, entenderme y apoyarme. Porque me han hecho ver las cosas buenas que tengo, y porque siempre han creído en mí. Porque tampoco me dejaron sola... ¡Los quiero mucho!

A Cuauhtémoc R. F.:

Porque contigo he pasado los momentos más bonitos de mi vida. Porque, aunque no me lo digas, sé que he sido alguien importante en tu vida. Porque me has hecho crecer y ser más fuerte... Y quiero que sepas que siempre estás en mi mente y en mi corazón, a pesar de que no estás junto a mí...

Te admiro, te respeto, pero sobre todo TE AMO... ¡Gracias por estar conmigo!

A Eduardo A. R.:

Alguien muy especial para mí, que me ha enseñado que la verdadera amistad sobrevive a pesar de la distancia y el tiempo... Gracias por estar siempre ahí para escucharme y apoyarme...

A mis amigos:

José Luis L., José Luis M., Miguel S., Javier E., Sandino V., Paulina V., Corintia O. Por haberme brindado su amistad y su cariño y por permitirme formar parte de su vida durante este tiempo. Nunca los voy a olvidar...

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia de las Cactáceas	4
Consideraciones del Género <i>Turbinicarpus</i>	5
Clasificación Taxonómica y Descripción Botánica	6
<i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i>	7
<i>Turbinicarpus hoferi</i>	8
<i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i>	11
<i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i>	12
El Cultivo de Tejidos Vegetales	14
Micropropagación	15
<i>Fase 0 Preparación de la planta madre</i>	15
<i>Fase 1 Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia</i>	16
<i>Fase 2 Multiplicación de brotes</i>	17
<i>Fase 3 Enraizamiento</i>	18
<i>Fase 4 Aclimatización</i>	19

	Pág.
Factores que afectan el éxito en la producción de plantas por micropropagación	19
Ventajas y desventajas de la micropropagación	20
<i>Ventajas</i>	20
<i>Desventajas</i>	21
Medio de cultivo	22
a) Sales inorgánicas	22
b) Compuestos orgánicos	23
<i>Fuentes de carbono</i>	23
<i>Vitaminas</i>	23
<i>Sustancias hormonales</i>	24
• Auxinas	24
• Citocininas	26
c) Complejos naturales	27
d) Materiales inertes de soporte	28
La Micropropagación en Cactáceas	28
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Limpieza General del Laboratorio de Cultivo de Tejidos	38
Esterilización de la Cristalería e Instrumental a Utilizar	38
Preparación del Medio Nutritivo de Murashige y Skoog (1962)	39
Preparación de soluciones madre	39
Preparación de medio nutritivo	41

	Pág.
Esterilización y Siembra de las Semillas de <i>Turbinicarpus hoferi</i> , <i>T. pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i> , <i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i> y <i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i>	42
Establecimiento de las Vitroplantas a partir de las Semillas Germinadas <i>In Vitro</i>	43
Determinación de la Combinación y Concentración de Reguladores de Crecimiento para la Micropropagación de <i>Turbinicarpus hoferi</i> , <i>T. pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i> , <i>T.</i> <i>schmiedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i> y <i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i>	45
Evaluación de Resultados y Análisis Estadístico	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	61
RESUMEN	63
BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición basal del medio nutritivo Murashige y Skoog (1962).	40
Cuadro 2. Análisis de varianza para número de brotes por explante de <i>Turbinicarpus hoferi</i> , <i>T. pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i> , <i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i> y <i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i> a los 60 días.	47
Cuadro 3. Comparación de medias (DMS, 0.05) para número de brotes por explante correspondiente a especies de <i>Turbinicarpus</i> a los 60 días.	48
Cuadro 4. Comparación de medias (DMS, 0.05) entre citocininas para número de brotes por explante a los 60 días.	49
Cuadro 5. Comparación de medias (DMS, 0.05) entre auxinas para número de brotes por explante a los 60 días.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i>	7
Figura 2. <i>Turbinicarpus hoferi</i>	9
Figura 3. <i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>Klinkerianus</i>	11
Figura 4. <i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i>	13
Figura 5. Comparación de medias para número de brotes por explante de <i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i> a los 60 días con diferentes citocininas	52
Figura 6. Comparación de medias para número de brotes por explante de <i>Turbinicarpus hoferi</i> a los 60 días con diferentes citocininas	53
Figura 7. Comparación de medias para número de brotes por explante de <i>Turbinicarpus schmedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i> a los 60 días con diferentes citocininas	54
Figura 8. Comparación de medias para número de brotes por explante de <i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i> a los 60 días con diferentes citocininas	55

- Figura 9. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con 2IP (5 mg/l) a los 60 días 56
- Figura 10. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *Gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con Zeatina (1 mg/l) a los 60 días 57
- Figura 11. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *Gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con BAP (1 mg/l) a los 60 días 58
- Figura 12. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *Gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con Kinetina (1 mg/l) a los 60 días 59

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son plantas perennes, suculentas, generalmente espinosas; las espinas varían en tamaño, forma, consistencia, color y disposición; presentan un fruto seco o jugoso con numerosas semillas. Sorprenden por la forma de sus tallos y hermosura de sus flores; interesan también por la anatomía de sus estructuras, las modalidades de su fisiología, indicadoras ambas de su admirable adaptación a la sequía; por último, son de gran importancia debido a la variedad de sustancias que se pueden extraer de ellas y que tienen amplio uso en las industrias alimentaria, farmacéutica y química (como néctares, que a veces contienen aceites esenciales que juegan un papel importante en la polinización, gomas y sustancias análogas como mucílagos, alcaloides, etcétera) (2).

Se registran, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, 269 especies en alguna de las siguientes categorías de protección: amenazada (A), rara (R), peligro de extinción (P), protección especial (Pr) y endémica (*).

La disminución de las especies silvestres ha hecho que el gobierno las proteja con leyes que prohíben la exportación, comercialización y con programas de reproducción. Existen diferentes sitios en donde se estudia la propagación de las cactáceas ya sea por la forma vegetativa y el empleo de semillas en invernaderos, o experimentalmente por cultivo de tejidos; la finalidad es recuperar algunas especies en vías de extinción, mantener los paisajes de las zonas áridas y utilizarlas como ornato sin tener problemas legales (2).

El género *Turbinicarpus* se compone de 20 especies distribuidas en la Sierra Madre Oriental y las altas planicies de los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Hofer, 1994).

Muchas de las especies de *Turbinicarpus* son muy apreciadas y buscadas pues son consideradas especies raras y muy bellas, por lo que han sido extraídas de su medio natural causando casi su extinción, desafortunadamente el pillaje no ha cesado en nuestros días y los hábitats naturales de *T. pseudomacrochele* var. *lausseri*, *T. ysabelae* y *T. hoferi*, por citar solo tres, han sido salvajemente diezmados, razón por la cual todas las especies del género *Turbinicarpus* están incluidas en la lista roja del CITES (Apéndice I) y en la NOM-059-ECOL-2001.

Por lo anteriormente expuesto es urgente el desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* que contribuya al posible aprovechamiento comercial de dichas especies y a su conservación como recurso genético, ya que primero permite romper el letargo que presentan sus semillas para luego acelerar el proceso de propagación, tanto en tiempo como en número de plántulas generadas, pues con este sistema de micropropagación se pueden propagar todas las plántulas deseadas a partir de una sola semilla (Malda *et al.*, 1999).

OBJETIVO

Determinar la combinación y concentración de reguladores de crecimiento del medio de cultivo para propagar *in vitro* brotes de diferentes especies de *Turbinicarpus*: *T. hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*.

Hipótesis

Con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (citocininas y auxinas) en el medio nutritivo es posible producir brotes de explantes obtenidos de vitroplantas de *T. hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de las Cactáceas

El 50% de todas las especies de flora y fauna existentes en el planeta se concentran en cinco países, México es uno de ellos, reconociéndosele como un sitio con megadiversidad biológica con un alto índice de endemismos, considerados los más importantes del Continente Americano.

Cactaceae es la familia de plantas más representativa de las zonas áridas y semiáridas de México, aunque también es común encontrarlas en las zonas tropicales, subtropicales y templadas. Son originarias de América; por su situación geográfica y conformación geológica, México es el país que alberga la mayor cantidad de especies; de las 1 500 especies existentes en el mundo, el 70% se encuentra en territorio mexicano (Paredes *et al.*, 2000).

Los frutos, semillas y hojas de las cactáceas son ampliamente utilizados como alimento humano, por ejemplo *Opuntia*, *Acantohocereus*, *Cephalocereus*, *Hylocereus*; otras son cultivadas por sus hojas para alimentar al ganado; para construir cercados o separar los campos. En lugares áridos y ventosos se utilizan para fijar el suelo y prevenir la erosión de las lluvias que se producen de forma torrencial en algunas épocas del año (1).

Entre las adaptaciones más notables que las cactáceas han adquirido en relación con la aridez, hay que mencionar aquellas que les permiten almacenar y conservar agua en sus tejidos, la reducción de la superficie transpiratoria al tomar formas globosas, la atrofia de las hojas o su transformación en escamas y espinas, el engrosamiento de la cutícula y de las membranas celulósicas, la excrescencia de sustancias cerosas y la gran longitud que adquieren sus raíces (2).

Por su gran capacidad de adaptación a diferentes climas y por sus formas llamativas, las cactáceas han sido, desde mediados del siglo XX, objeto de colectas exhaustivas para ser comercializadas en los mercados nacionales y sobre todo internacionales (Paredes *et al.*, 2000).

Consideraciones del Género *Turbinicarpus*

El género *Turbinicarpus* se compone de 20 especies distribuidas en la Sierra Madre Oriental y las altas planicies de los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo. El representante más septentrional es *Turbinicarpus valdezianus*, que crece cerca de Monclova (Coahuila), y el más meridional es *Turbinicarpus pseudomacrochele* var. *kranzianus*, que ha sido encontrado cerca de Ixmiquilpan (Estado de Hidalgo); así pues su extensión norte-sur es superior a los 750 km y se sitúa entre los 20° y 27' de latitud norte (Hofer, 1994).

Son cactáceas de grisáceas a verde - azulado o café, usualmente pequeñas, con espinas papiráceas (finas como papel), vellosas o plumosas. Las flores son expuestas y muy hermosas, el fruto es una baya lateralmente llena con la forma de un trompo.

En su hábitat natural algunas especies crecen en grietas de rocas, en cultivo requieren de un suelo rico en minerales y permeable y en verano un lugar cálido y brillante, pero no en el sol directo. Algunas de ellas florecen muy pronto en primavera, por lo tanto deben mantenerse en un lugar lleno de luz pero fresco (5° - 8°C) en el invierno. Las plantas crecen lentamente y no deben ser forzadas, pues de otra manera lucen anormales y blandas y hasta puede ser posible que se partan. La propagación por semilla no es difícil, pero las plántulas crecen lentamente (Collmann *et al.*, 1987).

Clasificación Taxonómica y Descripción Botánica

De acuerdo a Bravo y Sánchez (1991), el género *Tarbinicarpus* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

REINO	Metaphyta
DIVISIÓN	Embryophyta
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Cactales
FAMILIA	Cactaceae

TRIBU	Cacteae
GÉNERO	<i>Turbinicarpus</i>
ESPECIE	spp.

Turbinicarpus schmedickeanus ssp. *gracilis*

Condición actual

Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001 Categoría P* (en peligro de extinción, endémica).

Distribución y hábitat

Aramberri, Nuevo León (Anderson, 2001).

Descripción botánica



Figura 1. *Turbinicarpus schmedickeanus* ssp. *gracilis*

Planta: tallo simple, 15 - 20 mm de diámetro, 30 mm en total incluyendo los tubérculos. Éstos, de aproximadamente 7 mm de longitud, 1.8 mm de diámetro, en el ápice, de 3 - 5 mm de anchura en la base, delgados, casi rollizos, un tanto angulados, de color verde grisáceo brillante. Espinas delgadas, papiráceas; la central más larga, 18 - 23 mm de longitud, 1 mm de ancho, gris, flexible y curvada. Presenta 1- 3 espinas cortas, 2 mm de longitud, blancas, deflexas en la porción baja de la areola, perpendiculares al eje del tubérculo.

Flores: angostamente infundibuliformes, 2 cm de longitud, 1.5 cm de diámetro; segmentos exteriores del perianto blancos con la línea media de café verdoso pálido a cereza verdoso; segmentos interiores del perianto color blanco puro o con un trazo rosa tenue sobre la línea media; estilo blanquecino con 4 lóbulos más bien largos y blanquecinos; filamentos blanquecinos o con tintes de lavanda; anteras amarillo - anaranjadas.

Fruto: pequeño, color canela, globoso, dehiscente por una ranura longitudinal. Semillas pequeñas, 1 mm de longitud, 0.5 mm de diámetro; testa negra, finamente tuberculada, rugosa (Glass, 1997).

Turbinicarpus hoferi

Condición actual

Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001 Categoría A* (amenazada, endémica).

Distribución y hábitat

Aramberri, Nuevo León, México.

Descripción botánica



Figura 2. *Turbinicarpus hoferi*

Planta: plantas solitarias, aplanadas, 3 - 5 (7) cm de diámetro. Asentada 5 mm por encima del suelo. Epidermis verde - grisáceo, sin brillo, con superficie alveolada y estomas profundamente hundidos, cubierta con una espesa capa de cera, la cual se descompone en estructuras aplanadas. La hipodermis tiene varias capas, donde las paredes celulares son menos espesas que en otras especies de *Turbinicarpus*. La raíz se forma en la parte subterránea del cuerpo, débilmente ramificada, tuberosa. Cuerpo con costillas, las cuales están divididas en pequeños tubérculos, a 4 mm de altura. Tubérculos con base rómbica amplia, de 4 - 10 mm por 4 - 7 mm. Superficies laterales cóncavas más pequeñas, encima convexas.

Areolas en la punta de los tubérculos, alrededor de 1 mm de diámetro, en la cúspide de las plantas con fieltro blanco, que más tarde se vuelven desnudas. Espinas dimórficas, en plantas juveniles 6 - 13, blancas, pectinadas, 2 (3) mm de longitud; en plantas adultas 4 - 7 espinas, en forma de aguja, rectas, dirigidas hacia abajo y hacia los lados, 3 - 5 mm de longitud, el resto más o menos rectas a un poco curvadas, aplanadas y un poco en forma de espiral, de 2 cm de longitud. Superficie de las espinas rugosa.

Flores: en la punta, en forma de embudo, de 25 mm de longitud y 15 - 20 mm de diámetro. Pericarpelo blanquecino - verde brillante, desnudo, elíptico, 3 mm de longitud, 2 mm de diámetro. Receptáculo 3 mm de longitud, 2 mm en la base, 4 mm de diámetro, rojo - marrón brillante. 2 - 3 segmentos exteriores del perianto, lanceolados, rojo - marrón con bordes brillantes. Segmentos exteriores del perianto (tépalos exteriores) 10 mm de longitud, 3 - 4 mm de ancho, lanceolados estrechos, puntiagudos, los interiores de blanco o blanco - crema con medias rayas coloreadas de rosa - carmín. Los exteriores rojo - marrón con bordes brillantes. Segmentos interiores del perianto (tépalos internos) lanceolados, con frecuencia desiguales con punta probablemente a través de la adherencia a segmentos adyacentes, blancos, 12 mm de longitud, 3 - 6 mm de ancho. En conjunto, alrededor de 12 - 16 segmentos del perianto. Estambres 60 - 80, en 4 - 6 series, filamentos blancos, anteras amarillo brillante. Estilo 8 mm de longitud, blanco, situado por encima de las anteras. Estigma blanco, con 5 lóbulos no extendidos, 1 mm de longitud.

Fruto: verdoso, más tarde con líneas longitudinales color marrón, 5 - 7 mm de longitud y 3.5 - 4 mm de diámetro, conteniendo, aproximadamente, 50 semillas,

divididas por un lado, como en otras especies del género *Turbinicarpus*. Período de floración corto. Polinización cruzada probablemente obligatoria. Semillas más o menos de 0.9 mm de longitud, en forma de capuchón, 0.7 mm de ancho, 0.5 mm de grosor. Testa color café oscuro, sin brillo, casi negro, con células muy arqueadas. Embrión oval (6).

Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus

Categoría actual

Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001 Categoría Pr* (sujeta a protección especial, endémica).

Distribución y hábitat

El Huizache, San Luis Potosí (Anderson, 2001).

Descripción botánica



Figura 3. *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*

Planta: plantas simples, a veces algo cespitosas. Tallo globoso algo aplanado, hasta de 3 cm de altura y 4 cm de diámetro; ápice algo lanoso. Tubérculos dispuestos en series espiraladas, de sección transversal algo redondeada, con la base aquillada, de cerca de 1 cm de anchura y 6 mm de altura, en la base de 4 mm de espesor, de color verde claro con tinte castaño. Areolas dispuestas en la punta de los tubérculos, provistas de mechones de lana caduca. Espinas generalmente 3, a veces 4, la inferior de 9 mm de longitud, las dos superiores más pequeñas y pronto caducas; todas aplanadas hacia la base y redondeadas hacia la punta, con la superficie agrietada transversalmente, encorvadas hacia el ápice, de color gris con la punta oscura.

Flores: alrededor de 14 mm de longitud y diámetro, segmentos exteriores del perianto con la franja media oscura; segmentos interiores del perianto de color blanco puro o ligeramente crema.

Fruto: muy pequeño. Semillas de 1 mm de diámetro, en forma de mitra; hilo circular un poco hundido; micrópilo grande; testa finamente tuberculada, de color castaño rojizo hasta negro (Bravo y Sánchez, 1991).

Turbincarpus pseudomacrochele ssp. krainzianus

Condición actual

Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001 Categoría P* (en peligro de extinción, endémica).

Distribución y hábitat

Hidalgo y Querétaro (Anderson, 2001).

Descripción botánica



Figura 4. *Turbinicarpus pseudomacroechele* ssp. *krainzianus*

Planta: el tallo tiene 2 - 3.5 cm de diámetro, 3 - 4 cm de longitud, color verde oscuro. Costillas divididas en unas 11 hileras espiraladas de tubérculos romboidales en la base, cónicos arriba. El ápice y las areolas con lana blanca; éstas últimas quedan desnudas con el tiempo. Espinas, 6 - 8, más o menos tortuosas, 12 - 30 mm de longitud, la superior más larga, en un principio café amarillenta y después gris y la punta más oscura.

Flores: brotan desde el ápice; infundibuliformes, delgadas, 2 cm de longitud; segmentos exteriores del perianto de color verdoso; segmentos interiores del

perianto de verdoso a crema amarillo; pericarpelo verde; estilo blanco; lóbulos del estigma, 4, de color blanco.

Fruto: de ovado a globoso, 3 - 5 mm de diámetro, verde primero y luego rojizo.

Semillas, 1 mm de longitud; testa finamente tuberculada, negra (Glass, 1997).

El Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas, y en un medio nutritivo, de células, tejidos u órganos. A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos (3, 4).

La técnica consiste en tomar una sección de tejido vegetal (explante) y desinfectarlo superficialmente de todo microorganismo, mediante la inmersión total en una solución de hipoclorito de sodio. Posteriormente, el tejido es lavado con agua estéril y es sembrado en condiciones asépticas dentro de un recipiente que contiene un medio nutritivo. Para poder obtener plántulas a partir del tejido, el medio nutritivo contiene los nutrientes, vitaminas, aminoácidos y azúcares, complementado con fitohormonas necesarias para dirigir la formación de las plántulas. La siembra se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, que asegura un ambiente aséptico. El tejido sembrado es trasladado a una cámara de incubación donde proliferan las células.

En el tratamiento de la célula, tejido u órgano, que se desarrolla mediante esta técnica, se controlan aspectos como temperatura y fotoperíodo, con el objetivo de crear las condiciones ideales para un rápido desarrollo (5).

El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales (4).

Micropropagación

Toda célula vegetal, si está viva, es capaz de reproducir la planta de la que procede de una forma íntegra. La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en recipientes en que se pueden controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Yuste, 1998; Hartmann y Kester, 1999).

Por medio del proceso de micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme. Esta técnica incluye varias fases:

Fase 0 Preparación de la planta madre.

- Elección de plantas típicas, vigorosas, sanas.

- Puede ser necesaria la detección y eliminación de virus.

El explante es un factor crítico en esta fase, y su elección ha de hacerse de forma cuidadosa, teniendo en cuenta: tipo de órgano y su posición en la planta; fase de desarrollo y edad de la planta, ya que los tejidos juveniles son mucho más reactivos que los adultos; genotipo, que juega un papel determinante en la capacidad morfogénica del material elegido; tamaño, que va a afectar claramente el porcentaje de supervivencia y la posibilidad de infección (Lindsey y Jones, 1989; Ramos y Rallo, 1992).

Fase 1 Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.

- Esterilización en superficie y transferencia de los explantes al cultivo (Lindsey y Jones, 1989).

El ambiente generado por explante - medio de cultivo - condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de microorganismos; en el mejor de los casos, éstos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien los modifican.

Para evitar la contaminación en los medios de cultivo es necesario:

- o Conocer el material vegetal con que se trabaja.
- o Realizar una adecuada preparación de la planta madre.

- o Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos, en los casos en que se utilicen plántulas crecidas *in vitro* como plantas madre es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación.
- o Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados. La esterilización, en la mayoría de los casos, se hace utilizando calor.
- o Cultivar los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril, localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire. La mesa de trabajo y las paredes de la cámara deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%, de la misma manera, deben desinfectarse exteriormente todos los recipientes que ingresen en el área de aire estéril (Echenique *et al.*, 2004).

Fase 2 Multiplicación de brotes.

- Multiplicación de estructuras capaces de dar lugar a plantas intactas con los procedimientos adecuados.
- Los cultivos podrán reciclarse varias veces para obtener las tasas de crecimiento necesarias (Lindsey y Jones, 1989).

Echenique *et al.* (2004) mencionan que el objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. En esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal.

La etapa de multiplicación comprende dos periodos: 1) la fase de inducción, que implica el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente más auxinas que citocininas) para favorecer la desdiferenciación y 2) la fase de multiplicación, que requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación (en este caso el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas).

Fase 3 Enraizamiento.

- Elongación de tallos y preparación para enraizamiento.

El objetivo de esta fase es la obtención de tallos uniformes y con buenas características para el enraizamiento.

- Enraizamiento.

El enraizamiento se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*. En el primer caso, la auxina es un suplemento importante del medio de cultivo, pudiéndose incorporar a éste durante todo el proceso de enraizamiento o durante un periodo corto. Una reducción de sales minerales, fundamentalmente macronutrientes, puede favorecer el proceso. Es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de los explantes. Durante la fase de enraizamiento *in vivo* se suele

sumergir las plántulas en una solución de auxina antes de su colocación en el sustrato (Ramos y Rallo, 1992; Echenique *et al.*, 2004).

Fase 4 Aclimatización.

- Lavado del agar de las raíces, transferencia a un medio estéril de enraizamiento o a un suelo artificial.
- Mantenimiento inicial de una humedad elevada (a niveles cercanos al 90% durante una o dos semanas).
- Regulación del nivel de iluminación en el invernadero con objeto de hacer el cambio de la forma gradual más posible (Lindsey y Jones, 1989).

Factores que afectan el éxito en la producción de plantas por micropropagación

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

- Constitución genética de la planta: determina si una planta es monocotiledónea o dicotiledónea, qué forma van a tener las hojas, qué temperatura es la óptima para el crecimiento y la floración, la forma y el color de las flores. La expresión de la constitución genética depende también de condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro*.
- Factores fisicoquímicos que influyen sobre el crecimiento: luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂. Los factores físicos ambientales influyen

en todo tipo de procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración.

- Nutrientes: agua, macro y microelementos, y azúcares.
- Algunas sustancias orgánicas: vitaminas y reguladores. Los reguladores, que se necesitan en mínimas concentraciones, regulan la distribución de todo tipo de sustancias en el interior de la planta y son responsables de la división celular y el crecimiento de las células (Pierik, 1990).

Ventajas y desventajas de la micropropagación

Ventajas.

- Pequeña necesidad de espacio.
- Esterilidad: no hay pérdidas por plagas o enfermedades y las plántulas producidas finalmente están libres de bacterias, hongos y nematodos.
- Certificación de ausencia de virus.
- Condiciones controladas: pueden controlarse estrictamente luz, composición del medio, niveles de reguladores del crecimiento, temperatura.

- Producción continua: la producción puede mantenerse sin variaciones estacionales.
- Trabajo: no se necesitan atenciones entre los subcultivos (riego, eliminación de malas hierbas, fumigación).
- El espacio de invernadero es menor.
- Espectro de especies: algunas plantas propagadas *in vitro* son difíciles o imposibles de propagar *in vivo*.
- Mecanización: se pueden automatizar los procesos de propagación de algunas especies para reducir el trabajo.

Desventajas.

- Instalaciones y trabajadores muy especializados.
- Contaminación: si se produce contaminación bacteriana o fúngica en las fases tempranas de la multiplicación pueden perderse muchos propágulos potenciales.
- Condiciones de micropropagación: puede ser necesario desarrollar métodos específicos para cada especie con el fin de conseguir una micropropagación eficaz.

- Tamaño: las plántulas producidas inicialmente son pequeñas.
- Estabilidad genética: las técnicas de propagación no deben introducir inestabilidad genética.
- Costos: el costo de las plántulas es relativamente alto y debe compensarse con una producción a gran escala y con un valor añadido elevado de las plántulas producidas (Lindsey y Jones, 1989).

Medio de cultivo

El medio de cultivo tiene dos funciones principales. La primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuado de los explantes aislados y los propágulos subsiguientes. La segunda función es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante control hormonal (Hartmann y Kester, 1999).

Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte (Hurtado y Merino, 2001).

a. Sales inorgánicas

Hartmann y Kester (1999) mencionan que las sales inorgánicas proporcionan los macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (boro, cobalto, manganeso, yodo, hierro y zinc).

Existen diversas formulaciones minerales de composición química muy variable. Las diferencias radican, fundamentalmente, en los niveles de macroelementos, bajos en algunos casos, y muy altos en otros. Normalmente, la solución mineral idónea para una planta se obtiene haciendo un barrido entre formulaciones diversas o modificando la mezcla de sales Murashige y Skoog (usualmente mediante dilución de los macroelementos), ya que esta formulación ha sido la más ampliamente utilizada (Ramos y Rallo, 1992).

b. Compuestos orgánicos

Se pueden clasificar en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente, se obtienen buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

Fuentes de carbono.

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3%; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa, así como la fructosa y el almidón (Hurtado y Merino, 2001).

Vitaminas.

Las vitaminas más utilizadas han sido tiamina e inositol, aunque el ácido nicotínico y piridoxina también se han utilizado con relativa frecuencia. Existen varios complejos vitamínicos de formulación conocida que se han incorporado a

los medios de cultivo conservando la composición original o tras pequeñas modificaciones (Ramos y Rallo, 1992).

Sustancias hormonales.

Una hormona es un compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo, que actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o deprimir algún proceso del desarrollo. La acción fundamental de las hormonas parece ser bastante similar en los diversos grupos y consiste en actuar sobre los ácidos nucleicos para reprimir o desreprimir genes, sea al nivel de la transcripción o de la traducción (Rojas, 1993).

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas, que controlan la formación de la raíz, el tallo y el callo (Hartmann y Kester, 1999). Las concentraciones varían de especie a especie, pero, generalmente, las auxinas se usan en una concentración de 0.1 a 10.0 mg/l y las citocininas de 0.03 a 30.0 mg/l.

Las giberelinas se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, en cultivos de ápices o meristemos (Hurtado y Merino, 2001).

- **Auxinas**

El término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico, pero a menudo se usa como sinónimo del ácido indolacético (IAA) que es la principal auxina natural.

Se han propuesto varios mecanismos de acción. Según uno de ellos actúa removiendo la capa de histonas que envuelve a la cadena de ADN y descubre mensajes que, sin su acción, quedarían reprimidos (Rojas y Ramírez, 1987).

Los efectos de las auxinas son múltiples. Es típica su acción inductora del alargamiento, división y diferenciación de las células, en interacción con otras hormonas, promoviendo la formación de órganos adventicios. Además, incrementan la respiración y el metabolismo energético, así como cambios en el tipo de ARN, enzimas y proteínas (Rojas y Ramírez, 1987; Rojas, 1993).

El crecimiento es incrementado por bajas concentraciones y deprimido por dosis altas. Las auxinas deprimen la dominancia apical o subordinación de las ramas al tallo, de modo que a menudo dejan a la planta con el tallo corto pero muy ramificada (Rojas, 1993).

Las auxinas más usadas son:

- Auxinas:*
- Ácido 3 - indolacético (AIA)
 - Ácido 3 - indolbutírico (AIB)
 - Ácido naftalenacético (ANA)
 - Ácido 4 - clorofenoxiacético (CPA)
 - Ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D)
 - Ácido 4 - amino - 3, 5, 6 - tricloropicolínico (Tordón, comercial)

- **Citocininas**

Rojas (1993) menciona que son hormonas cuya acción típica es activar la división celular y retardar la senescencia de los órganos. Se trata de derivados de la adenina, algunos de los cuales se han encontrado en forma natural en las plantas y otras moléculas son sintéticas.

En tejidos cultivados *in vitro*, y en presencia de concentraciones óptimas de auxina, las citocininas promueven la citocinesis (división celular). Si se corta el parénquima de algunas dicotiledóneas y se cultiva asépticamente en un medio de agar con auxina y los nutrimentos adecuados, se forma una masa de células no especializadas a las que se conoce como callo. Si se agrega también citocinina se promueve, en gran medida, la citocinesis.

Si se mantiene una relación alta de citocinina a auxina, se producen células meristemáticas en el callo; estas células se dividen y generan otras que se desarrollan para formar yemas, tallos y hojas. Pero si se reduce la relación de citocinina a auxina, se favorece la formación de raíces. Seleccionando la relación adecuada, se puede hacer que los callos de muchas especies, sobre todo dicotiledóneas, se desarrollen hasta formar una nueva planta completa (Salisbury y Ross, 1994).

Las citocininas también tienen influencia positiva sobre el transporte de nutrientes, tal vez como efecto de la activación del metabolismo (Rojas, 1993).

Las citocininas más ampliamente usadas son:

Citocininas: N⁶ bencil aminopurina (BAP)

N⁶ dimetil alil aminopurina (2IP)

N⁶ furfural aminopurina (kinetina)

N⁶ (4 - hidroxil, 3 - metil, 2 - butenil) adenina (zeatina)

c. Complejos naturales

Debe ser el último recurso a utilizar en un medio de cultivo, ya que existe una enorme variabilidad en un compuesto dado al cambiar las fuentes de donde ha sido obtenido. Entre los complejos naturales, el más conocido es el endospermo de coco. Existe otro compuesto, el carbón activo, que se suele incorporar a los medio de cultivo cuando hay problemas de exudaciones; en estos caso, las concentraciones de auxinas y/o citocininas se deben aumentar puesto que el carbón activo no sólo absorbe los compuestos fenólicos, sino también los reguladores de crecimiento (Ramos y Rallo, 1992).

Otros agentes antioxidantes (como la L-cisteína y el ácido ascórbico) y absorbentes de fenoles (como la polivinilpirridolina), se utilizan para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes, lo cual puede causar la muerte de los mismos (Echenique *et al.*, 2004).

d. Materiales inertes de soporte

Otro aspecto importante es la consistencia del medio. Puede emplearse como semisólido o líquido. El agente gelificante más utilizado en cultivo *in vitro* es el agar (entre 0.6 y 1%). También pueden emplearse agargel (0.40 - 0.60%), transfergel (2 - 2.60%), phytigel (0.25 - 0.40%), agarosa (0.80 - 0.90%) y gelrite (0.10 - 0.20%).

En caso de seleccionar medios de cultivo líquidos es necesario aplicar agitación continua para permitir que las células se disgreguen y puedan diferenciar raíces, brotes o embriones somáticos en forma aislada (Echenique *et al.*, 2004).

La Micropropagación en Cactáceas

Usualmente las cactáceas son propagadas por semillas y vástagos enraizados, que son métodos convencionales inadecuados para especies con semillas que presentan dormancia, bajos porcentajes de germinación, esterilidad, crecimiento lento, o pocos brotes. El cultivo de tejidos *in vitro* es un procedimiento alternativo para su proliferación ya que permite: 1) la producción de muchos individuos a partir de un solo explante y 2) velocidades de crecimiento más rápidas. Los sistemas de micropropagación han sido desarrollados para más de 35 especies de cactus, representando 20 géneros (Santos *et al.*, 2003).

Johnson y Emino (1979) llevaron a cabo la propagación *in vitro* de *Mammillaria elongata*, y encontraron que la iniciación de brotes se optimizó con la adición de 2IP (10 mg/l) + IAA (1mg/l).

Clayton *et al.* (1990) realizaron la micropropagación de algunas cactáceas. En el primer experimento se compararon los siguientes medios basales: L2 = Phillips y Collins (1979); SH = Schenk y Hildebrandt (1972); B5 = Gamborg *et al.* (1968) modificado por Dunstan y Short (1977); MS = Murashige y Skoog (1962); MMS = Murashige y Skoog modificado por Gladfelter y Phillips (1987). Todos los medios estaban suplementados con 11.4 μM de AIA + 18.6 μM de Kinetina + 0.30 mM de Sulfato de adenina; las especies utilizadas en este experimento fueron *Escobaria missouriensis*, *Pediocactus bradyi*, *P. knowltonii* y *Sclerocactus spinosior*. De los cinco tratamientos, el medio L2 fue el más efectivo, con un promedio de 5.5 brotes axilares por explante; *E. missouriensis* presentó la mayor producción de brotes axilares. En el segundo experimento se evaluaron concentraciones y tipos de auxinas, usando medio Murashige y Skoog + 24.6 μM de 2IP + 0.15 mM de Sulfato de adenina, con nueve tratamientos adicionales comparando Picloram (82.8 nM y 0.8 μM), AIA (1.1 y 11.4 μM), AIB (1.0 y 9.8 μM) y ANA (0.1, 1.1 Y 10.7 μM); las especies utilizadas fueron *P. bradyi*, *P. knowltonii* y *S. spinosior*. EL ANA fue adecuado para *P. knowltonii*, pero no para *S. spinosior*, mientras que el AIA fue adecuado para *S. spinosior* pero no para *P. knowltonii*. En el tercer experimento se evaluaron tipos y concentraciones de citocininas usando medio Murashige y Skoog. Dos tratamientos compararon Sulfato de adenina en ausencia de auxina: 23.2 μM de Kinetina + 0.30 mM de Sulfato de adenina y 23.2

μM de Kinetina sola. Diez tratamientos adicionales compararon Kinetina (23.2 y 46.4 μM), BA (0.9 y 4.4 μM), Zeatina (4.6 y 22.8 μM) y 2IP (1.0, 4.9, 24.6 y 49.2 μM), todos en combinación con 11.4 μM de AIA + 0.30 mM de Sulfato de adenina. Las especies usadas fueron *P. brady*, *P. knowltonii*, *S. spinosior* y *Toumeyia papyracantha*. Para todas las especies evaluadas, altas concentraciones de citocininas resultaron ser las más efectivas. Las cuatro especies mostraron una respuesta óptima en el medio que incluyó 22.8 μM de Zeatina. El cuarto experimento probó siete tratamientos combinando los tipos y concentraciones más efectivos de citocininas y auxinas identificados en los experimentos previos, usando medio L2 suplementado con 0.30 mM de Sulfato de adenina. Picloram (82.8 nM, ANA (1.1 μM) y combinaciones libres de auxinas fueron probadas con Zeatina (22.8 y 45.6 μM) o Kinetina (23.2 y 46.4 μM). Las especies utilizadas fueron *Mammillaria wrightii*, *P. despainii*, *P. winkleri* y *S. mesae-verdae*. Los tratamientos que incluyeron 22.8 μM de Zeatina con o sin 1.1 μM de ANA fueron los más efectivos para la mayoría de las especies. El quinto experimento probó seis tratamientos con combinaciones de medio L2 y Murashige y Skoog, ambos suplementados con 0.30 mM de Sulfato de adenina, con Zeatina (45.6 μM) o BA (44.4 μM), y con Picloram (82.8 nM) o ANA (1.1 μM). Las especies utilizadas fueron *E. robbinsorum*, *P. brady*, *P. paradinei* y *Toumeyia papyracantha*. El uso de medio L2 o Murashige y Skoog que incluyó 45.6 μM de Zeatina + 1.1 μM de ANA resultó ser el óptimo para la producción de brotes axilares para las cuatro especies.

De igual manera, Villalobos *et al.* (1991) cultivaron en medio Murashige y Skoog adicionado con diferentes concentraciones de BA brotes de *Opuntia*

amyclaea cortados longitudinalmente a los cuales se les eliminó el meristemo apical. Las mitades se incubaron paralelas a la superficie del medio y en los explantes se desarrollaron las yemas laterales a causa de la eliminación de la dominancia apical por el estímulo sobre el crecimiento de las yemas.

Ortiz y Vargas (1995) utilizaron brotes de *Hylocereus elegantissimus* para llevar a cabo la propagación *in vitro* los cuales se cortaron transversalmente y se sembraron en medio Murashige y Skoog con varias concentraciones de Kinetina (0.0, 0.5 y 2.0 mg/l) y de ANA (0.0, 0.05 y 2.0 mg/l). En los tratamientos con ambos reguladores, particularmente con aquellos con mayor proporción de Kinetina, se encontró una formación de plántulas completas. Los medios más adecuados para la micropropagación de esta cactácea fueron los adicionados con 0.5 mg/l de Kinetina + 0.5 de ANA y 2.0 mg/l de Kinetina + 0.5 mg/l de ANA.

Pérez *et al.* (1995) establecieron un sistema de micropropagación para 20 especies diferentes de cactáceas (*Astrphytum myriostigma*, *Carnegiea gigantea*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha clavata*, *C. durangensis*, *C. radians*, *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocereus dubius*, *Echinofossulocactus* sp., *Ferocactus hamatacanthus*, *F. hystrix*, *F. latispinus*, *F. pilosus*, *Mammillaria candida*, *M. craigii*, *M. formosa*, *M. obscura*, *M. sphacelata*, *M. uncinata*, *Nyctocereus serpentinus* y *Stenocactus coptonogus*) utilizando medio nutritivo de Murashige y Skoog adicionado con reguladores de crecimientos, que constituyeron los siguientes tratamientos: 1) 0.1 mg/l BA; 2) 1.0 mg/l BA; 3) 2.0 mg/l BA; 4) 1.0 mg/l BA + 0.01 mg/l ANA; 5) 1.0 mg/l BA + 0.10 mg/l ANA; 6) 1.0 mg/l BA + 1.00 mg/l ANA.

Encontraron que los mejores tratamientos para la proliferación fueron aquellos con baja concentración de Benciladenina (BA) y sin o con una muy baja cantidad de Ácido naftalenacético (ANA). En cuanto al tipo de explante, los laterales tuvieron una mejor respuesta que los apicales en cuanto a número y homogeneidad de los brotes generados.

Ruíz *et al.* (1997) utilizaron la técnica de micropropagación en *Hylocereus undatus* y obtuvieron explantes de plantas de 7 meses de edad germinadas en almácigos, los cuales se dividieron en tres partes (basal, media y apical) y se colocaron en el medio Murashige y Skoog con 0.3 mg/l de Ácido indolacético (IAA) + 5.0 mg/l de Kinetina + 80.0 mg/l de Hemisulfato de adenina, y 2.0 mg/l de BAP + 2.0 mg/l de Kinetina. El tratamiento que contenía BAP y Kinetina fue el más eficiente para la proliferación de brotes.

Arenas *et al.* (2001) dividieron plántulas de *Turbinicarpus pseudopectinatus* en ápices y bases, que fueron sembradas en medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l), así como con ANA (0.0, 0.01, 0.1 y 0.5 mg/l). Al término de 3 meses la mejor respuesta de organogénesis directa se encontró asociada a la inducción con BA (2 mg/l) en ausencia de ANA. También Dabekaussen *et al.* (1991) demostraron que el medio más adecuado para micropropagar *Sulcorebutia alba*, mediante la activación areolar, fue el de Murashige y Skoog adicionado con un rango de 0.25 - 1.0 mg/l de BAP.

Papafotiou *et al.* (2001) también cultivaron explantes de *Mammillaria elongata* forma cristata en medio Murashige y Skoog con ANA (0.54 μM) y BAP (0.44 μM) o con ANA (1,07 μM); los explantes respondieron y produjeron brotes de la forma cristata y normal sin la intervención de callo. En la forma normal de esta cactácea, los brotes fueron regenerados *in vitro* a través de callo de explantes tomados de la parte basal y cultivados en medio complementado con ANA (1.07 μM) y BAP (22.20 μM).

Velázquez y Soltero (2001) establecieron la técnica de micropropagación mediante la proliferación de brotes axilares en *Ephitelanta micromeris* var. micromeris. Iniciaron con la germinación aséptica de semillas y después las plántulas fueron seccionadas (ápice y base) para inducir la producción de brotes. Se probaron las citocininas Kinetina y 2IP en combinación con la auxina ANA. La interacción Kinetina - ANA no tuvo efecto significativo sobre la producción, la media más alta fue de 17.5 brotes por explante obtenida con Kinetina y 14.75 con 2IP - ANA.

Santos *et al.* (2003) cultivaron explantes longitudinales de *Pelecyphora aselliformis* obtenidos de plántulas desarrolladas *in vitro* en medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con BA o Kinetina. Después de 120 días cada explante dio en promedio 5 brotes y este número se incrementó en un 20 - 25% después de subcultivo.

De la Rosa *et al.* (2004) efectuaron la propagación masiva *in vitro* de 23 especies y variedades del género *Turbinicarpus*. Utilizaron plántulas germinadas *in vitro* como fuentes de explantes, los cuales se cultivaron en medio Murashige y Skoog. Se probaron tres tipos de explantes (apicales, longitudinales y transversales), así como las citocininas BA y 2IP en varias concentraciones. Observaron la formación de brotes en todas las especies y en todos los tratamientos, pero el promedio de brotes y los mejores tratamientos fueron muy variables entre las especies.

Morales *et al.* (2004) realizaron la micropropagación de algunas especies de la familia Cactaceae mediante semillas. Las semillas desinfectadas se sembraron en medio Murashige y Skoog adicionado con reguladores de crecimiento. Las especies fueron *Acanthocereus occidentalis* e *Hylocereus undatus*. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de reguladores BAP - Kinetina en las concentraciones siguientes: BAP 2.0 mg/ml - Kinetina 1.0 mg/ml, BAP 3.0 mg/ml - Kinetina 2.0 mg/ml y BAP 1.0 mg/ml - Kinetina 0.0 mg/ml.

Ramírez *et al.* (2004) propagaron *in vitro* 5 especies de cactáceas. Obtuvieron fragmentos de las plantas mencionadas y los desinfectaron. Los fragmentos se incubaron en medio Murashige y Skoog adicionado con Cinetina: 0.0, 1.0, 3.0, 6.0 y 10.0 mg/l en combinación con Ácido indolacético (AIA): 0.0, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/l. Los resultados mostraron respuestas diferentes al conjunto de tratamientos: *Echinocactus platyacanthus* con el tratamiento 3.0 mg/l de Cinetina + 4.0 mg/l de AIA indujo en promedio 5.6 brotes por explante; *Echinocereus*

schmolii con el tratamiento 10.0 mg/l de Cinetina + 1.0 mg/l de AIA indujo 24 brotes por explante; *Mammillaria pectinifera* rindió un promedio de 4.5 brotes por explante con la combinación 10.0 mg/l de Cinetina + 4.0 mg/l de AIA; *Mammillaria bocasana* indujo 2.8 brotes por explante con 10.0 mg/l de Cinetina + 0.0 mg/l de AIA; *Mammillaria prolifera* indujo 2.5 brotes por explante con 1.0 mg/l de Cinetina y 0.0 mg/l de AIA.

Vázquez *et al.* (2004) utilizaron secciones de ápices y tallo de plántulas generadas *in vitro* para llevar a cabo la micropropagación. Los explantes se sembraron en medio Murashige y Skoog modificado con 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 mg/l de BA en combinación con 0.0, 0.1 y 0.5 mg/l de ANA. Los resultados fueron muy diversos: *Astrophytum myriostigma* registró la mejor respuesta con la formación de 17 brotes por ápice en presencia de 3.0 mg/l de BA; en *Aztekium hintonii* es notable analizar la desdiferenciación de los brotes al ser subcultivados. *Pelecypora aselliformis* registró ambas vías de formación de órganos, presentando promedios de hasta 75 brotes por explante. En *Turbinicarpus valdezianus* existió una respuesta directa, para el caso de ápices se registraron 12 brotes por explante en presencia de 2.0 mg/l de Kinetina. En *Mammillaria sanchez-mejoradae* se registraron hasta 12 brotes por ápice en presencia de 6.0 mg/l de BA.

Dabekaussen *et al.* (1991) demostraron que el medio más adecuado para micropropagar *Sulcorebutia alba*, mediante la activación areolar, fue el de Murashige y Skoog adicionado con un rango de 0.25 - 1.0 mg/l de BAP.

Ortiz y Alcántara (1997) utilizando plantas de *Lophophora williamsii* realizaron la micropropagación partiendo de fracciones de 1 cm³ de cada planta, con una areola, los explantes se cultivaron en medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: Kinetina (0.0, 0.1 y 1.0 mg/l), ANA (0.0, 0.1 y 1.0 mg/l), y BAP (0.0, 0.1 y 1.0 mg/l). Se llegó a la conclusión que el medio adicionado con 1.0 mg/l de Kinetina + 0.1 mg/l de ANA fue el más apropiado para la propagación *in vitro* de esta especie.

Choreño *et al.* (2002) sembraron aréolas de *Cephalocereus senilis* en medio de cultivo Murashige y Skoog complementado con ANA solo y en combinación con BA o Kinetina en concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/l. La activación de aréolas se inició después de 21 días en 0.3 ANA + 3.0 BA mg/l. A los 61 días, cuando las plántulas alcanzaron 2.5 cm de altura se subcultivaron para su multiplicación en tres condiciones: plántulas enteras, sin ápice y fraccionadas (apical, media y basal). Después de 40 días, la mejor respuesta en número de brotes se logró con plántulas fraccionadas obteniéndose 11 brotes en promedio.

Lizalde *et al.* (2004) desarrollaron un sistema para la propagación *in vitro* de 9 especies de cactáceas mexicanas. Utilizaron plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes. Emplearon medio Murashige y Skoog, probando el efecto de varios tratamientos con BA en la generación de brotes a través de la activación de areolas en ápices. Las especies trabajadas y el promedio de brotes que generaron fueron los siguientes: *Astrophytum asterias*, 2.30; *Echinocactus grusonii*,

4.10; *Coryphantha werdermannii*, 2.95; *Echinocereus adustus*, 5.58; *E. delaetii*, 4.10;
E. ferreirianus, 6.45; *Epithelantha micromeris*, 6.60; *Ferocactus cylindraceus*, 4.45;
Morangaya pensilis, 3.86.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Sitio Experimental

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".

Limpieza General del Laboratorio de Cultivo de Tejidos

Antes de establecer el experimento, fue necesario realizar una limpieza profunda del Laboratorio, en especial del área de siembra y del cuarto de incubación para lograr condiciones de asepsia total, y de esta manera evitar la contaminación por hongos y bacterias del material vegetal.

Esterilización de la Cristalería e Instrumental a Utilizar

Se esterilizó toda la cristalería utilizada, como frascos de gerber con tapa, cajas Petri, vasos de precipitados, crisoles, etc.

El proceso de esterilización se llevó a cabo en una autoclave a una temperatura de 121°C y a una presión de 1kg/cm², por un lapso de 60 - 90 minutos, aproximadamente.

Las espátulas, pinzas y bisturís se esterilizaron conforme se fueron empleando por medio de inmersiones en solución de Qry por 15 minutos y después en alcohol, seguidas por flameo.

Preparación del Medio Nutritivo de Murashige y Skoog (1962)

El objetivo del medio de cultivo es proporcionar al tejido vegetal o plántula las condiciones artificiales necesarias para que se desarrolle sin ningún problema.

Preparación de soluciones madre

Para la elaboración del medio nutritivo fue necesario preparar las soluciones madre de macronutrientes y micronutrientes y Hierro. Con ayuda de una balanza analítica se pesaron las cantidades de los reactivos correspondientes a la solución de macronutrientes que aparecen en el Cuadro 1, se disolvieron uno a uno en un matraz con agua desionizada, con agitación continua, y se aforaron a 500 ml; entonces, para cada litro de medio nutritivo se tomaron 50 ml de esta solución madre. Se utilizó el mismo procedimiento para preparar las soluciones madre de micronutrientes y Hierro, sólo que los reactivos se disolvieron en 100 ml de agua desionizada, y para cada litro de medio nutritivo se tomaron 10 ml de estas soluciones.

Las soluciones madre se guardaron en el refrigerador, y se tomaron cada vez que hubo necesidad de preparar medio nutritivo.

Cuadro 1. Composición basal del medio nutritivo Murashige y Skoog (1962).

<i>Compuesto</i>	<i>g/l</i>
<i>Macronutrientes</i>	
<i>Nitrato de amonio (NH₄NO₃)</i>	<i>1.65</i>
<i>Nitrato de potasio (KNO₃)</i>	<i>1.9</i>
<i>Cloruro de calcio (CaCl₂·2H₂O)</i>	<i>0.44</i>
<i>Fosfato de potasio (KH₂PO₄)</i>	<i>0.17</i>
<i>Sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O)</i>	<i>0.37</i>
<i>Micronutrientes</i>	
<i>Yoduro de potasio (KI)</i>	<i>0.00083</i>
<i>Ácido bórico (H₃BO₃)</i>	<i>0.0062</i>
<i>Sulfato de manganeso (MnSO₄·4H₂O)</i>	<i>0.0086</i>
<i>Sulfato de zinc (ZnSO₄·4H₂O)</i>	<i>0.000025</i>
<i>Molibdato de sodio (Na₂Mo₄·2H₂O)</i>	<i>0.00025</i>
<i>Sulfato cúprico (CuSO₄·5H₂O)</i>	<i>0.000025</i>
<i>Cloruro de cobalto (CoCl₂·6H₂O)</i>	<i>0.000025</i>
<i>Solución de Hierro</i>	
<i>Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica) (Na₂EDTA)</i>	<i>0.03731</i>
<i>Sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O)</i>	<i>0.02781</i>

Preparación de medio nutritivo

El procedimiento para la preparación del medio nutritivo fue el siguiente:

1. En un matraz, en un volumen aproximado de 500 ml de agua desionizada, se añadió el volumen correcto de cada una de las soluciones de los macro y microelementos o soluciones madre, así como de la solución de Hierro. El medio se adicionó además con 250 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1mg/l de tiamina-HCl, constituyendo las vitaminas, y 20 g/l de sacarosa. Es importante mencionar que al medio nutritivo para la germinación de semillas no se agregaron reguladores de crecimiento.
2. La mezcla se aforó a un litro, y el pH se midió con ayuda de un potenciómetro, y se ajustó a un valor de 5.7 utilizando soluciones de NaOH (0.1 y 1.0N) y HCl (0.1 y 1.0 N).
3. Una vez ajustado el pH se agregaron 8 g/l de agar, el cual se diluyó por medio de agitación continua con calor.
4. Cuando el medio se tornó más o menos transparente, se distribuyó en frascos de gerber previamente esterilizados (20 ml/frasco de medio) y se esterilizaron en la autoclave durante 15 a 20 minutos a una presión de 1 kg/cm² y a 121°C. Los frascos se sellaron.

**Esterilización y Siembra de las Semillas de *Turbinicarpus hoferi*,
T. pseudomacrochele ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y
T. schmiedickeanus ssp. *klinkerianus***

El protocolo que se utilizó para la esterilización de las semillas, y su posterior siembra *in vitro*, fue el siguiente:

1. Se limpió la campana de flujo laminar con Qry y alcohol al 70%, y se encendió 30 minutos antes de comenzar a trabajar.
2. Se prepararon 3 vasos de precipitados: 1) con agua destilada estéril, 2) con alcohol al 70% más 2 gotas de Tween 20 (detergente), y 3) con hipoclorito de sodio al 15%.
3. Se esterilizaron crisoles horadados sumergiéndolos en Qry durante 15 minutos. Al finalizar el tiempo, se enjuagaron con agua destilada estéril.
4. Las semillas se colocaron en los crisoles y se fueron pasando sucesivamente a los 3 vasos de precipitados preparados anteriormente.
5. Primero se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto; luego se enjuagaron en agua destilada estéril por un minuto.

6. Se continuó el enjuague sumergiendo el crisol en el hipoclorito de sodio por 10 minutos. Finalmente, se eliminó el exceso de hipoclorito de sodio enjuagando 3 veces con agua destilada estéril durante un minuto cada vez.
7. Una vez concluida la fase de esterilización, las semillas se colocaron en imbibición durante 48 horas en agua destilada estéril (hidratación).
8. Transcurridas las 48 horas, las semillas se sometieron nuevamente al proceso de esterilización con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 15%.
9. Las semillas se sembraron bajo condiciones de asepsia en los frascos gerber con el medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de su concentración original. En cada frasco se colocaron de 4 a 5 semillas.
10. Los frascos gerber donde se sembraron las semillas se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas y una intensidad lumínica de 2800 lux, por 45 días.

Establecimiento de las Vitroplantas a partir de las Semillas Germinadas *In Vitro*

Una vez que las semillas germinaron, las vitroplantas se colocaron en el medio nutritivo de Murashige y Skoog, preparado anteriormente, adicionado con 100 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1mg/l de tiamina, 1 mg/l de

ácido nicotínico, es decir las vitaminas, 1 mg/l de AG₃ (ácido giberélico), 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, para lograr su crecimiento y de esta manera obtener plantas de un tamaño adecuado que proporcionaron los explantes a partir de los cuales se inició la micropropagación.

El trasvase de las plántulas al medio nuevo fue mediante el siguiente procedimiento:

1. Se limpió la campana de flujo laminar con Qry y alcohol al 70%, y se encendió 30 minutos antes de comenzar la siembra.
2. Antes de comenzar a trasvasar, se limpiaron bien los recipientes con material vegetativo y los que contenían el medio de cultivo nuevo con alcohol al 70%.
3. El instrumental (pinzas y bisturís) se esterilizó sumergiéndolo en solución de Qry durante 15 minutos, y antes de utilizarse directamente en la plántula se enjuagó con alcohol y se flameó en los mecheros.
4. Se tomaron las plántulas y se manipularon frente a los mecheros en las cajas Petri estériles. Se colocaron en el medio de cultivo nuevo.
5. Los frascos de gerber se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas y una

intensidad lumínica de 2800 lux por 180 días, haciendo un trasvase de las plántulas cada 30 días.

Una vez que las plántulas se establecieron fue necesario verificar que las condiciones fueran las adecuadas para lograr su óptimo desarrollo y un tamaño adecuado para obtener los explantes.

Determinación de la Combinación y Concentración de Reguladores de Crecimiento para la Micropropagación de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*

De las plántulas generadas en la fase de establecimiento del cultivo aséptico se tomaron los explantes con la finalidad de llevar a cabo la micropropagación.

La obtención de los explantes se llevó a cabo de la siguiente manera: para *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis* cada plántula completa se consideró como un explante; para *T. hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* los explantes se obtuvieron seccionando las plántulas de manera transversal en tres partes y eliminando la porción del ápice. De esta manera, las partes basal y media de la plántula constituyeron los explantes. Los explantes se colocaron en frascos de gerber con 20 ml de medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con 250 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de

piridoxina-HCl, 1 mg/l de tiamina-HCl, que constituyen las vitaminas, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, adicionando con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

Se colocaron 4 explantes por cada frasco de gerber, considerando cada frasco como una repetición y se contó con 5 repeticiones por tratamiento.

Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas, y una intensidad lumínica de 2800 lux.

Evaluación de Resultados y Análisis Estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A lo constituyeron las especies de *Turbinicarpus* (*hoferi*, *pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*), el factor B correspondió a los tipos y concentraciones de citocininas (2IP, 5 mg/l; Zeatina 1 mg/l; BAP, 1 mg/l; Kinetina, 1 mg/l) y el factor C a 0.05 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de ANA, lo que generó 32 tratamientos diferentes.

Se evaluó a los 60 días de desarrollo el número de brotes por explante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se presenta el análisis de varianza para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* a los 60 días de haber sembrado los explantes en medio nutritivo MS; en él se muestra que Esp (Especies), Cito (citocininas) y Aux (Auxina), así como la interacción Esp*Cito resultaron ser altamente significativos, y las interacciones restantes (Esp*Aux, Cito*Aux, y Esp*Cito*Aux) no mostraron significancia alguna. El coeficiente de variación fue del 23.4830%, lo cual indica que los resultados obtenidos son estadísticamente válidos.

Cuadro 2. Análisis de varianza para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* a los 60 días.

<i>Fuentes de Variación</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F_c</i>
Esp	3	90.1640625	30.0546875	41.69 **
Cito	3	41.7578125	13.9192708	19.31 **
Aux	1	9.7515625	9.7515625	13.53 **
Esp * Cito	9	106.4265625	11.8251736	16.40 **
Esp * Aux	3	2.0328125	0.6776042	0.94 NS
Cito * Aux	3	2.4703125	0.8234375	1.14 NS
Esp * Cito * Aux	9	4.2328125	0.4703125	0.65 NS
Error	128	92.2750000	0.7208984	
Total	159	349.1109375		

Coeficiente de variación = 23.4830%

** , Valor altamente significativo; NS, Valor no significativo

En cuanto a la comparación de medias (DMS, 0.05) para número de brotes por explante, *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* fueron diferentes. La especie que presentó mejor respuesta fue *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* con 4.6438 brotes por explante; le siguieron *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con 3.8375, *T. hoferi* con 3.4188 y en último lugar *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* con 2.5625 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias (DMS, 0.05) para número de brotes por explante correspondiente a especies de *Turbinicarpus* a los 60 días.

<i>Especies</i>	<i>Media</i>	
<i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i>	4.6438	A
<i>T. pseudomacrochele</i> ssp. <i>krainzianus</i>	3.8375	B
<i>T. hoferi</i>	3.4188	C
<i>T. schmiedickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i>	2.5625	D

Los resultados anteriores son similares a los encontrados por Pérez *et al.* (1995), Lizalde *et al.* (2004) y Morales *et al.* (2004), quienes al desarrollar sistemas de propagación *in vitro* de diferentes especies de cactáceas, probaron distintas concentraciones de reguladores de crecimiento y obtuvieron respuestas muy variables entre las especies en cuanto a la generación de brotes.

De la Rosa *et al.* (2004) también propagaron *in vitro* 23 especies y variedades del género *Turbinicarpus* y observaron que la formación de brotes y los mejores tratamientos fueron muy variables entre las especies.

La comparación de medias (DMS, 0.05) entre Citocininas para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* muestra que el tratamiento Zeatina (1 mg/l) presentó el mayor número de brotes por explante (4.4625). El tratamiento con el promedio más bajo de número de brotes por explante fue el de Kinetina (1 mg/l), con 3.1063 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias (DMS, 0.05) entre citocininas para número de brotes por explante a los 60 días.

<i>Citocininas</i>	<i>Media</i>	
<i>Zeatina (1 mg/l)</i>	4.6425	A
<i>2IP (5 mg/l)</i>	3.5188	B
<i>BAP (1 mg/l)</i>	3.3750	B C
<i>Kinetina (1 mg/l)</i>	3.1063	C

Lo anterior coincide con lo encontrado por Ruíz *et al.* (1997), Santos *et al.* (2003) y De la Rosa (2004), quienes utilizaron concentraciones de varias citocininas y obtuvieron respuestas diferentes entre los tratamientos.

Velázquez y Soltero (2001) encontraron que las fuentes de citocinina (Kinetina y 2IP) presentaron efectos altamente significativos sobre la producción de brotes de *Epithelantha micromeris* var. *micromeris*. Dabekaussen *et al.* (1991) mencionan que la citocinina BAP es un requisito esencial para la activación de areolas, lo que permite llevar a cabo la micropropagación de *Sulcorebutia alba*; mientras que Ortiz y Vargas (1995) observaron que la activación de areolas por la Kinetina se traduce en la formación de brotes y plántulas completas

La comparación de medias (DMS, 0.05) con y sin Auxina para número de brotes por explante de *Turbincarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* a los 60 días se presenta en el Cuadro 5, donde se puede observar que los explantes produjeron mayor cantidad de brotes en ausencia de auxina (ANA), con un promedio de 3.8625 brotes por explante.

Cuadro 5. Comparación de medias (DMS, 0.05) entre auxinas para número de brotes por explante de a los 60 días.

<i>Auxina</i>	<i>Media</i>	
<i>Sin Auxina</i>	3.8625	A
<i>Con Auxina (ANA 0.05 mg/l)</i>	3.3688	B

Varios autores han encontrado que la mejor respuesta para la producción de brotes en cultivo *in vitro* de algunas especies de cactáceas se presenta con bajas concentraciones de auxina, o en ausencia de la misma, en combinación con concentraciones moderadas a altas de citocininas (Clayton *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1995; Ortiz y Vargas, 1995; Arenas *et al.*, 2001). Explantes que producen suficiente cantidad de auxina no necesitan una cantidad adicional para conseguir el alargamiento o la división celular, es decir no necesitan de adición exógena (Pierik, 1990).

En general, una mayor concentración de citocininas respecto a otros reguladores se ha utilizado en diversos experimentos para inducir la formación y proliferación de brotes en algunas cactáceas (Ruíz *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2003).

Johnson y Emino (1979), así como Echenique *et al.* (2004) coinciden en que es necesario un balance adecuado citocinina: auxina para la formación de brotes en cultivo *in vitro*. De esta manera, los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentración deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación.

A continuación se presentan las figuras correspondientes a número de brotes por explante de cada una de las especies de *Turbinicarpus* evaluadas.

La Figura 5 muestra que BAP (1 mg/l) en ausencia de auxina (ANA) produjo el mayor número de brotes por explante de *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* a los 60 días, con un promedio de 3.85 brotes.

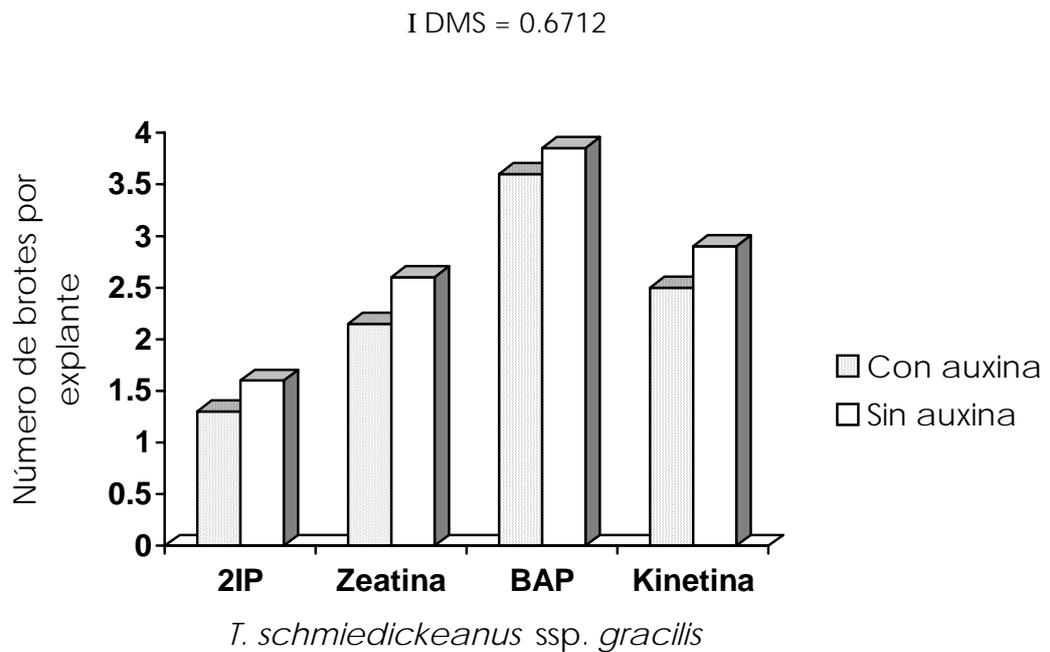


Figura 5. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis* a los 60 días con diferentes citocininas

La Zeatina (1 mg/l) sin presencia de auxina indujo una mayor brotación en los explantes de *T. hoferi* (Figura 6) y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* (Figura 7) a los 60 días, con un promedio de 5.85 y 5.95 brotes por explante, respectivamente.

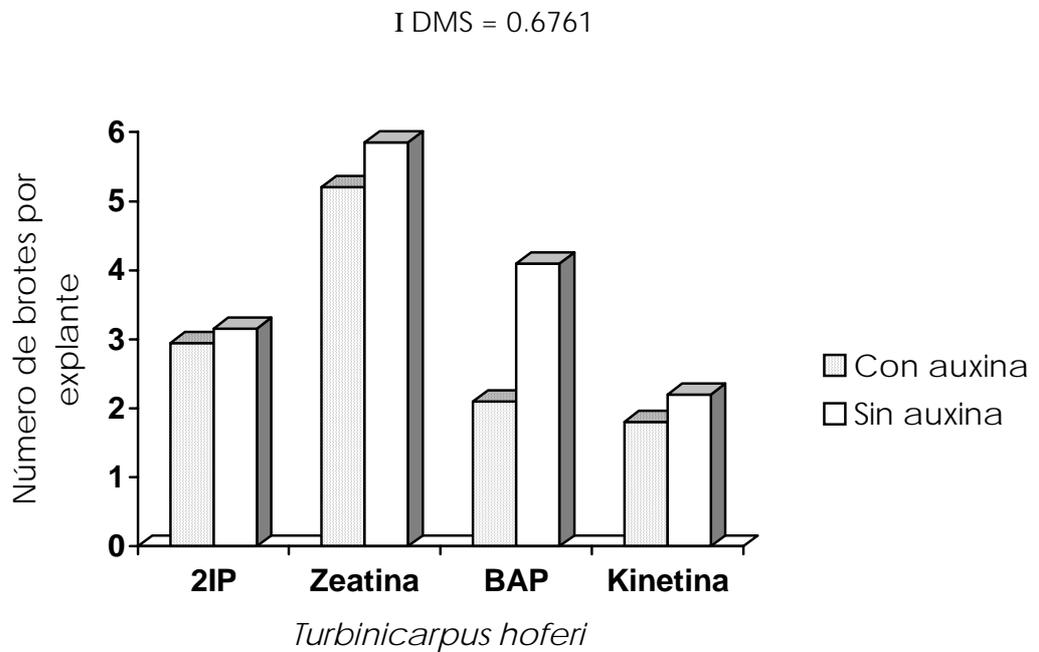


Figura 6. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi* a los 60 días con diferentes citocininas

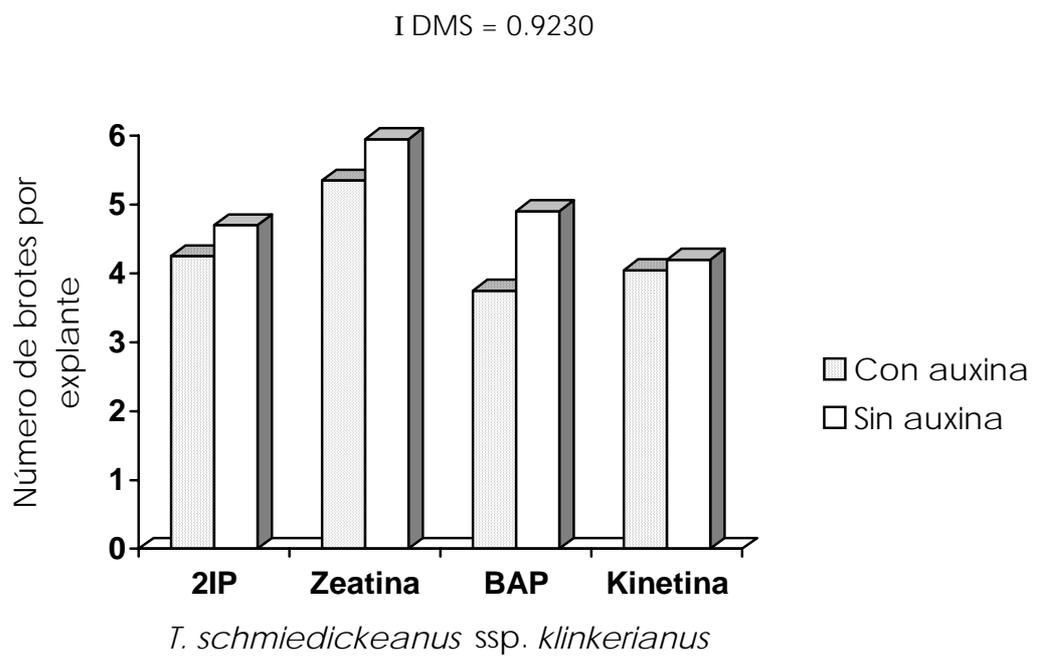


Figura 7. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus schmidickeanus ssp. klinkerianus* a los 60 días con diferentes citocininas

Finalmente, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* presentó un mayor número de brotes por explante (un promedio de 5.25 brotes) en el medio adicionado con 2IP (5 mg/l) y en ausencia de ANA (Figura 8).

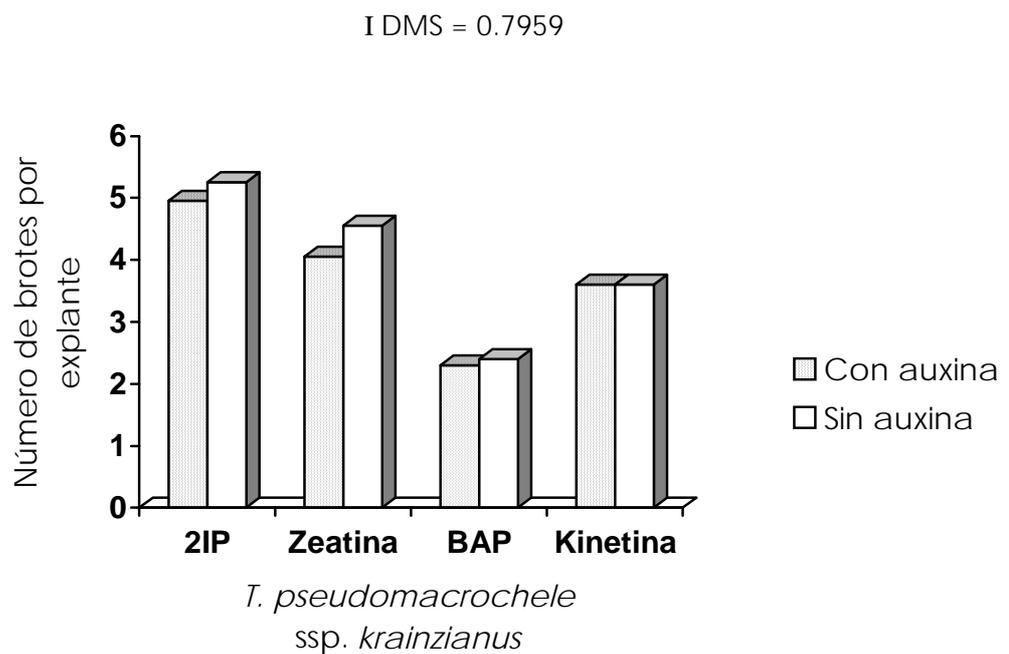


Figura 8. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* a los 60 días con diferentes citocininas

Estos resultados se asemejan a los observados por Velázquez y Soltero (2001) así como Ortiz y Alcántara (1997), quienes micropropagaron especies de cactáceas utilizando citocininas en el medio nutritivo y también obtuvieron resultados diferentes con cada tratamiento.

Enseguida se presentan las figuras correspondientes a número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* con cada una de las citocininas probadas. *Turbinicarpus pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con 2IP (5 mg/l) en ausencia de auxina presentó el promedio más alto con 5.25 brotes por explante. La especie que presentó el más bajo promedio de brotes fue *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* con 1.6 brotes en ausencia de auxina y 1.3 brotes como promedio en el medio que sí fue adicionado con auxina (ANA 0.05 mg/l) (Figura 9).

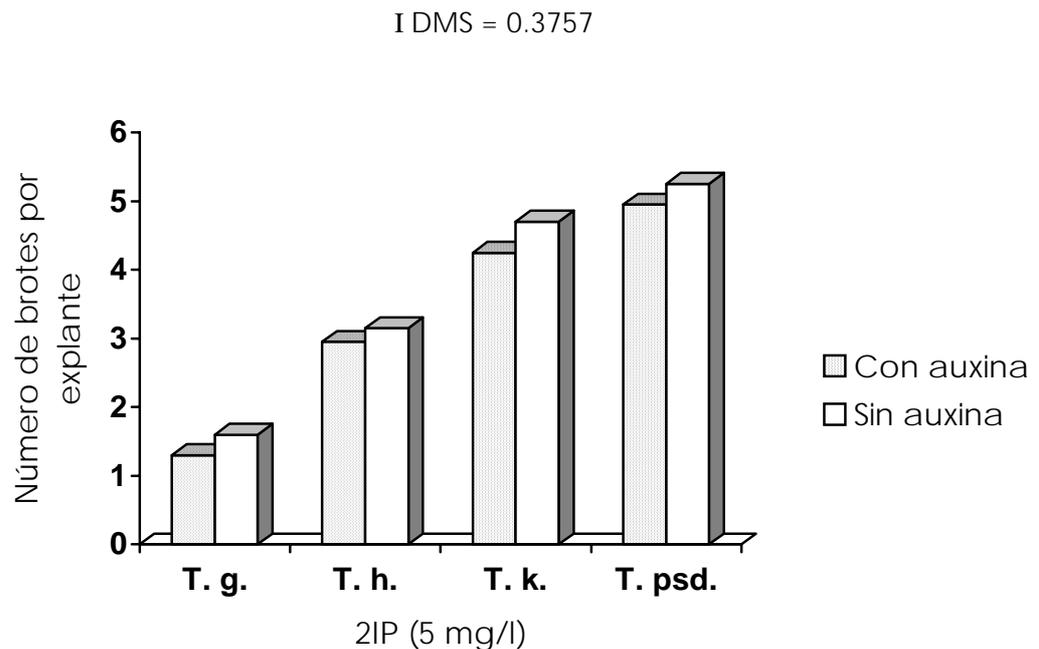


Figura 9. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con 2IP (5 mg/l) a los 60 días

Respecto a la Zeatina (1 mg/l), *Turbinicarpus hoferi* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* obtuvieron resultados muy similares frente a este tratamiento, con un promedio de 5.85 y 5.95 brotes por explante, respectivamente. Les siguió *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con 4.55 brotes y el resultado más bajo se presentó en *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis*, con una media de 2.6 brotes en el medio sin auxina y 2.15 brotes en el medio con auxina (ANA 0.05 mg/l) (Figura 10).

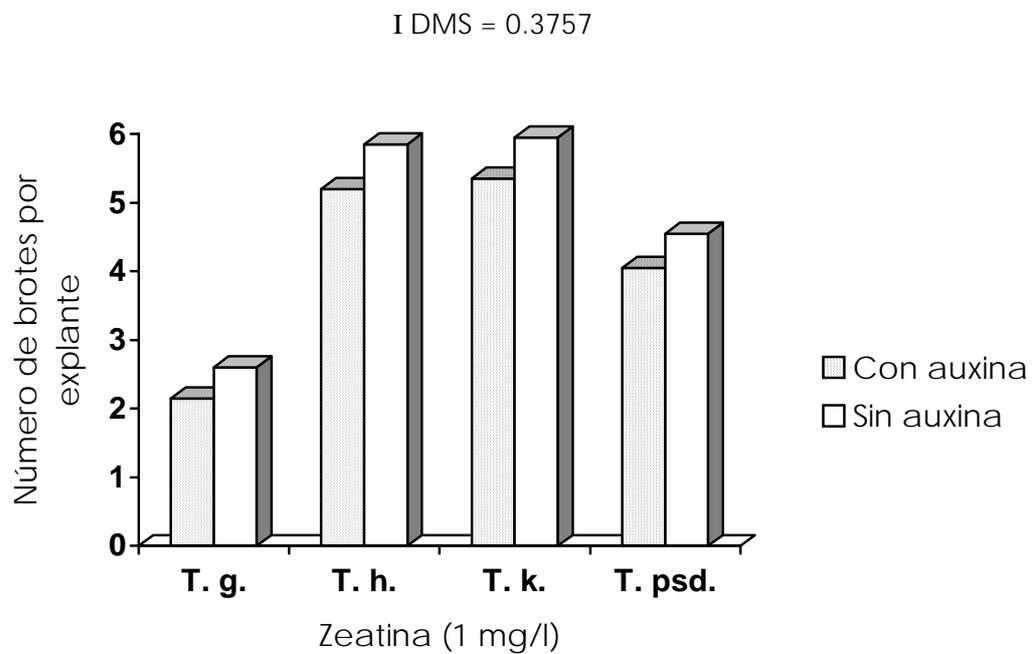


Figura 10. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con Zeatina (1 mg/l) a los 60 días

Turbinicarpus schmedickeanus ssp. *klinkerianus* fue la especie que presentó el mayor número de brotes por explante (4.9) en el medio suplementado con BAP (1 mg/l) y en ausencia de auxina. *T. schmedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. hoferi* tuvieron un número muy similar de brotes cuando los explantes se sembraron en el medio libre de auxina (3.85 y 4.1 brotes, respectivamente). La especie que obtuvo el promedio de número de brotes por explante más bajo fue *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* (2.3 brotes en el medio adicionado con auxina) (Figura 11).

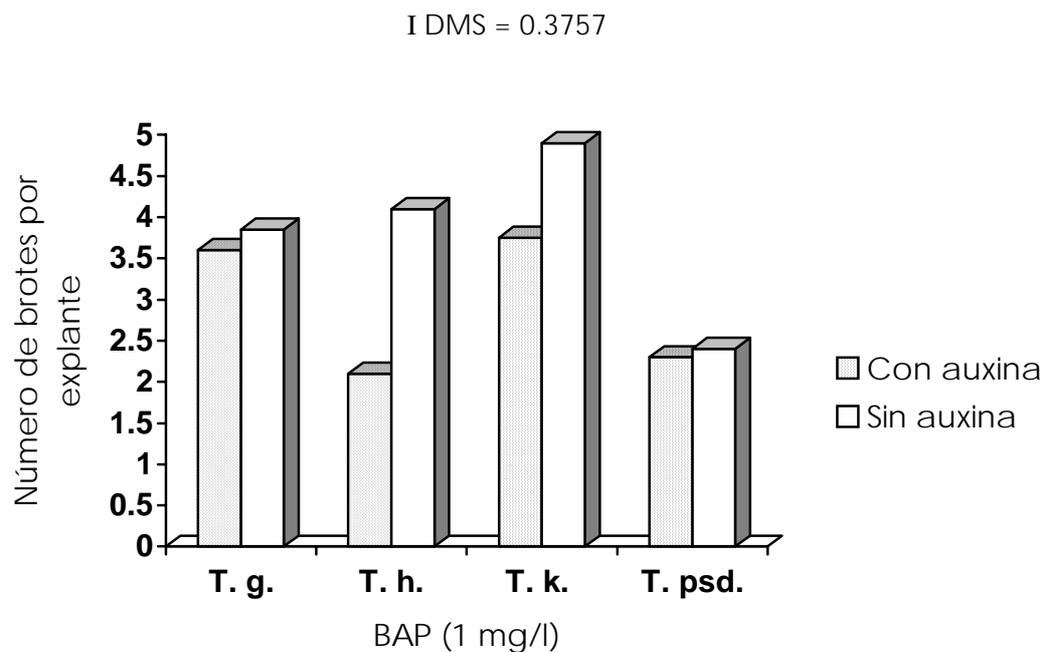


Figura 11. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con BAP (1 mg/l) a los 60 días

Finalmente, frente al tratamiento de Kinetina (1 mg/l) la especie que mejor respuesta mostró fue *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* con una media de 4.2 brotes por cada explante, en el medio sin auxina. La especie con el promedio de brotes por explante más bajo fue *T. hoferi*, con 1.8 y 2.2 brotes en el medio con y sin auxinas, respectivamente.

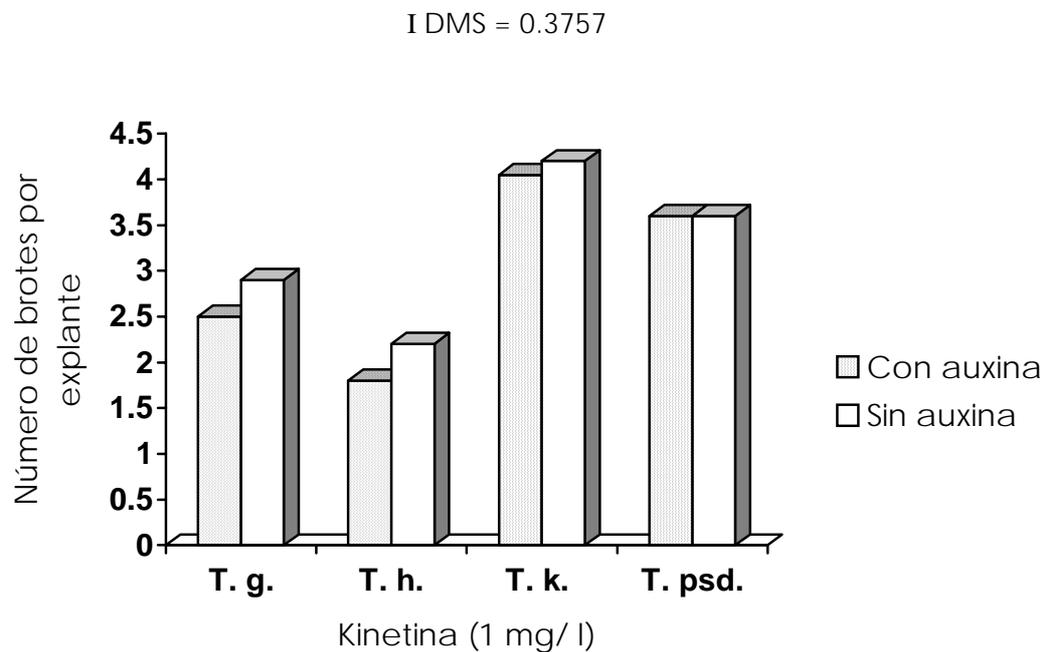


Figura 12. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* en medio adicionado con Kinetina (1 mg/l) a los 60 días

De igual manera, al llevar a cabo la propagación *in vitro* de cactáceas probando diferentes especies y concentraciones de reguladores de crecimiento,

Ramírez *et al.* (2004) y Vázquez *et al.* (2004) observaron respuestas distintas entre las especies, en las cuales el número de brotes fue muy variable.

CONCLUSIONES

- La especie que mejor respuesta presentó frente a los diferentes tratamientos fue *Turbinicarpus schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* con un promedio de 4.6438 brotes por explante, seguida de *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con 3.8375, *T. hoferi* con 3.4188 y al final *T. schmidickeanus* ssp. *gracilis* con 2.5625 brotes por explante.
- De las citocininas probadas el tratamiento que indujo un mayor promedio de número de brotes por explante fue el de Zeatina (1 mg/l) con una media de 4.6425 brotes, seguido por 2IP (5 mg/l) y BAP (1 mg/l) con 3.5188 y 3.3750 brotes por explante, respectivamente, y la que menos brotes produjo fue Kinetina con 3.1063 brotes.
- Respecto a la auxina ANA (Ácido naftalenacético), los tratamientos libres de la misma fueron los que mostraron un mayor promedio de brotes por explante (3.8625 brotes).
- Ante el tratamiento BAP (1 mg/l) sin auxina, *Turbinicarpus schmidickeanus* ssp. *gracilis* fue la especie que mejor respuesta tuvo con 3.85 brotes por explante.
- Frente al tratamiento de Zeatina (1 mg/l) en ausencia de auxina las especies que tuvieron el mayor promedio de brotes por explante fueron *T.*

hoferi y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* con 5.85 y 5.95 brotes, respectivamente

- En el medio adicionado con 2IP (5 mg/l) y sin presencia de auxina la especie que obtuvo el mayor número de brotes por explante fue *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con una media de 5.25 brotes.
- *Turbinicarpus pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* tuvo el promedio más alto de número de brotes por explante (5.25) en el tratamiento con 2IP (5 mg/l) en ausencia de auxina.
- *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* presentó la mayor cantidad de brotes por explante en los tratamientos de Zeatina (1 mg/l), con 5.95 brotes, BAP (1 mg/l), 4.9 brotes y Kinetina (1 mg/l) con 4.2 brotes por explante, todos sin presencia de auxina.

RESUMEN

El género *Turbincarpus* se compone de 20 especies distribuidas en la Sierra Madre Oriental, en México. Muchas son consideradas raras y muy bellas, por lo que han sido extraídas de su medio natural causando casi su extinción. Una opción para la preservación y propagación de especies en esta situación es la micropropagación, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la combinación y concentración de algunos reguladores de crecimiento para propagar *in vitro* brotes de *Turbincarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*. El trabajo se inició a partir de semillas que se esterilizaron mediante inmersión en agua destilada, alcohol al 70% más 2 gotas de Tween 20, e hipoclorito de sodio al 15%, luego se colocaron en imbibición en agua destilada estéril (hidratación) por 48 horas y concluido ese tiempo se volvieron a someter al proceso de esterilización; finalmente, se sembraron para su germinación en medio nutritivo de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración original, adicionado con 250 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1mg/l de tiamina-HCl, 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, a un pH de 5.7. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 25°C±2°C, con un fotoperiodo de 12 horas y una intensidad lumínica de 2800 lux, por 45 días. Una vez que las semillas germinaron, las vitroplantas se colocaron en medio nutritivo de Murashige y Skoog adicionado con 100 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1mg/l de tiamina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de AG₃ (ácido giberélico), 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, con un pH de 5.7, para lograr su crecimiento y obtener

plantas de un tamaño adecuado que proporcionaron los explantes para la fase de micropropagación. Los frascos con las vitroplantas se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas y una intensidad lumínica de 2800 lux, por 180 días, haciendo un trasvase de las plántulas cada 30 días. De las plántulas generadas en la fase de establecimiento se tomaron los explantes para llevar a cabo la micropropagación: para *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis* cada plántula completa se consideró como un explante; para *T. hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* los explantes se obtuvieron seccionando las plántulas de manera transversal en tres partes y eliminando la porción del ápice. Los explantes se colocaron en medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con 250 mg/l de myo-inositol, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1 mg/l de tiamina-HCl, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, a un pH de 5.7, adicionando con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento (citocininas: 2IP, 5 mg/l; Zeatina, 1 mg/l; BAP, 1 mg/l; Kinetina, 1 mg/l; y auxina: 0.05 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de ANA). Se colocaron 4 explantes por cada frasco de gerber, considerando cada frasco como una repetición y se contó con 5 repeticiones por tratamiento. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas, y una intensidad lumínica de 2800 lux. Se evaluó el número de brotes por explante a los 60 días de haber establecido el experimento. El análisis de varianza para número de brotes por explante de *Turbinicarpus hoferi*, *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus*, *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis* y *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* mostró que los factores Esp (Especies), Cito (Citocininas) y Aux (Auxina) resultaron ser altamente

significativos, así como la interacción de Esp*Cito. La especie que mejor respuesta presentó frente a los diferentes tratamientos fue *Turbinicarpus schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* con un promedio de 4.6438 brotes por explante, seguida de *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con 3.8375, *T. hoferi* con 3.4188 y al final *T. schmidickeanus* ssp. *gracilis* con 2.5625 brotes por explante. De las citocininas, tratamiento que indujo un mayor promedio de número de brotes por explante fue Zeatina (1 mg/l) con una media de 4.6425 brotes, seguido por 2IP (5 mg/l) y BAP (1 mg/l) con 3.5188 y 3.3750 brotes por explante, respectivamente, y el que menos brotes produjo fue Kinetina con 3.1063 brotes. Respecto a la auxina ANA (Ácido naftalenacético), los tratamientos libres de la misma fueron los que mostraron un mayor promedio de brotes por explante (3.8625 brotes). Ante el tratamiento BAP (1 mg/l) sin auxina, *Turbinicarpus schmidickeanus* ssp. *gracilis* fue la especie que mejor respuesta tuvo con 3.85 brotes por explante. Frente al tratamiento de Zeatina (1 mg/l) en ausencia de auxina las especies que tuvieron el mayor promedio de brotes por explante fueron *T. hoferi* y *T. schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* con 5.85 y 5.95 brotes, respectivamente. En el medio adicionado con 2IP (5 mg/l) y sin presencia de auxina la especie que obtuvo el mayor número de brotes por explante fue *T. pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* con una media de 5.25 brotes. *Turbinicarpus pseudomacrochele* ssp. *krainzianus* tuvo el promedio más alto de número de brotes por explante (5.25) en el tratamiento con 2IP (5 mg/l) en ausencia de auxina. *T. schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* presentó la mayor cantidad de brotes por explante en los tratamientos de Zeatina (1 mg/l), con 5.95 brotes, BAP (1 mg/l), 4.9 brotes y Kinetina (1 mg/l) con 4.2 brotes por explante, todos sin presencia de auxina.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, F. E. 2001. "The Cactus Family". Primera edición. Ed. Timber Press. Portland, Oregon.
- Arenas, T., M. A. Monroy, M. Mata, A. Jiménez y V. M. Chávez A. 2001. "Regeneración *In Vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeberg) Glass & Foster". Sociedad Botánica de México. Resumen: XV Congreso Mexicano de Botánica. Tlalnepantla, Estado de México.
- Bravo H., H. y H. Sánchez M. 1991. "Las Cactáceas de México". Volumen II. UNAM, Ciudad Universitaria. México, D.F.
- Choreño T., J. M., H. Gonzáles R., T. Terrazas S. y A. Hernández L. 2002. "Propagación *In Vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de Areolas". Revista Chapingo Serie Horticultura 8(2): 183 - 196.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1990. "Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribu Cactinae". J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2): 337 - 343.
- Collmann, W., E. Götz and G. Gröner. 1987. "The Encyclopedia of Cacti". First edition. Ed. Timber Press. Portland, Oregon.

- De la Rosa C., M. L., M. Domínguez R., C. Dávila F., M. Del Real M., M. Pérez R. y E. Pérez M. B. 2004. "Desarrollo de Sistemas para la Propagación *In Vitro* de 23 Especies y Variedades del Género *Turbinicarpus*". IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y Otras Suculentas: Resúmenes. U. de G. y Fundación Produce Jalisco. Guadalajara, Jalisco.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. H. Spaans. 1991. "Factors Affecting Areole Activation *In vitro* in the Cactus *Sulcorebutia alba* Rausch". *Scientia Horticulturae* 46(3-4): 283 - 294.
- Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mroginski. 2004. "Biotecnología y Mejoramiento Vegetal". Primera edición. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Glass, Charles E. 1997. "Guía para la Identificación de Cactáceas Amenazadas de México". Primera edición. CONABIO – CANTE. México, D.F.
- Hartmann, H. T. y D. E. Kester. 1999. "Propagación de Plantas: Principios y Prácticas". Editorial CECSA. México, D.F.
- Hofer, A. 1994. "Quelques Considérations Sur le Genre *Turbinicarpus*". *Succulentes (France)* 18: 22 - 29.
- Hurtado M., D. V. y M. E. Merino M. 2001. "Cultivo de Tejidos Vegetales". Editorial Trillas. México, D.F.

- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1979. "*In Vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*". Hort Science 14(5): 605 - 606.
- Lindsey, K. y M. G. K. Jones. 1989. "Biotecnología Vegetal Agrícola". Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Lizalde V., H., E. Pérez M. B., M. E. Pérez R. y C. Dávila F. 2004. "Propagación por Técnicas de Cultivo de Tejidos de Cactáceas de los Géneros *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*". IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y Otras Suculentas: Resúmenes. U. de G. y Fundación Produce Jalisco. Guadalajara, Jalisco.
- Malda, G., H. Suzan and R. Backhaus. 1999. "*In Vitro* Culture as a Potential Method for the Conservation of Endangered Plants Possessing Crassulacean Acid Metabolism". Scientia Horticulturae 81:71 - 87.
- Morales R., M. E., J. F. Treviño N. y M. L. Cárdenas A. 2004. "La Micropropagación como una Alternativa Reproductiva para las Cactáceas". IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y Otras Suculentas: Resúmenes. U. de G. y Fundación Produce Jalisco. Guadalajara, Jalisco.

Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001. 2002. 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. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, D.F.

Ortiz M., J. G. y M. Vargas F. 1995. "Propagación *In Vitro* de *Heliocereus elegantissimus* (Britton y Rose) var. *elegantissimus* (Cactaceae)". Cactáceas y Suculentas Mexicanas XL(2): 41 - 45.

Ortiz M., J. G. y R. Alcántara G. 1997. "Propagación *In Vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter)". Cactáceas y Suculentas Mexicanas XLII(1): 3 - 6.

Papafotiu, M., G. E. Balotis, P. T. Louka and J. Chronopoulos. 2001. "In Vitro Plant Regeneration of *Mammillaria elongata* Normal and Cristate Forms". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 163 - 167.

Paredes A., R., T. R. Van Devender y R. S. Felger. 2000 "Cactáceas de Sonora, México: su Diversidad, Uso y Conservación". Primera edición. IMADES - ASDM Press. Tucson, Arizona.

- Pérez M. B., E., E. Villalobos A., E. Meza R. y H. Lizalde V. 1995. "Desarrollo de Sistemas para la Propagación Masiva y Conservación de Germoplasma *In Vitro* de 20 Especies Mexicanas de Cactáceas". Universidad Autónoma de Aguascalientes, Investigación y Ciencia 15: 36 - 43.
- Pierik, R. L. M. 1990. "Cultivo In Vitro de las Plantas Superiores". Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Ramírez M., R., I. Aguilar R., M. G. Ortiz F., A. Borodanenko, J. L. Barrera G., R. Salcedo H. y N. Ochoa A. 2004. "Propagación *In Vitro* de *Echinocactus platyacanthus*, *E. schmollii*, *Mammillaria pectinifera*, *M. prolifera* y *M. bocasana*". IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y Otras Suculentas: Resúmenes. U. de G. y Fundación Produce Jalisco. Guadalajara, Jalisco.
- Ramos, E. y L. Rallo. 1992. "Nueva Horticultura: Tecnología y Economía de los Sistemas Hortícolas Intensivos". Primera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Rojas, G., M. y H. Ramírez R. 1987. "Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas". Primera edición. Editorial Limusa. México, D.F.
- Rojas G., M. 1993. "Fisiología Vegetal Aplicada". Cuarta edición. Editorial Interamericana McGraw - Hill. México, D.F.

- Ruiz U., C., M. E. Morales R., E. Cárdenas C., T. E. Torres C., R. Mercado H. y J. F. Treviño N. 1997. "Micropropagación de *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose". Memorias: Congreso sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. FAO, FAUANL (Facultad de Agronomía UANL). Monterrey, Nuevo León.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. "Fisiología Vegetal". Primera edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F.
- Santos D., M. S., R. Méndez O., A. Arredondo G. and M. L. Santos D. 2003. "In Vitro Organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae)". *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* 39(5): 480 - 484.
- Vázquez Z., T., E. Calderón G., C. Martínez J., F. Ortiz A., O. Pérez A., D. Hernández O. y A. Martínez Palacios. 2004. "Micropropagación de Cactáceas en Peligro de Extinción". IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y Otras Suculentas: Resúmenes. U. de G. y Fundación Produce Jalisco. Guadalajara, Jalisco.
- Velázquez E., L. E. y R. Soltero Q. 2001. "Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae". *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* XLVI(3): 56 - 62.

Villalobos A., V. M., J. M. Mejía M. y H. A. Escobar A. 1991. "Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones". Publicación CIAT 151: 644 - 649.

Yuste P., M. P. 1998. "Biblioteca de la Agricultura". Volumen III. Segunda edición. Idea Books. Barcelona, España.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

- (1) <http://www.botanical-online.com/familiacactaceascastella.htm>
- (2) http://www.redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/act_permanentes/conciencia/biologia/acertijos_biologicos/acertijos01-02/res8.htm
- (3) <http://www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm>
- (4) <http://www.uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html>
- (5) http://www.gro.itesm.mx/servicios_int/bioingenieria/introduccion.htm
- (6) <http://www.mfaint.demon.co.uk/cactus/turbo/desc/hoferi.html>