

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. y *Turbincarpus knuthianus* Boed. y Aclimatación de estas especies y *T. lophophoroides* Werd.

POR:

RICARDO TRINIDAD GARCÍA.

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo de 2005.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

**DIVISION DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. y *Turbincarpus knuthianus* Boed. y Aclimatación de estas especies y *T. lophophoroides* Werd.

TESIS

POR:

RICARDO TRINIDAD GARCÍA

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ING. EN AGROBIOLOGÍA

A P R O B A D A

PRESIDENTE DEL JURADO

Biol. Sofía Comparán Sánchez

SINODAL

SINODAL

M. C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez

Dr. Juan José López González.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMIA

M. C. Arnoldo Oyervides García.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Marzo de 2005.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por darme la oportunidad de ser uno más de sus hijos que la honrará donde quiera que vaya, y además que se lleva de ella la mejor cosecha que cualquier persona pudiera esperar, el conocimiento... y además el orgullo de ser un buitre más que ha emprendido el vuelo para buscar mejores expectativas a futuro. También por el compromiso sólido que se tiene con la sociedad, en la formación y capacitación de personal en las diferentes áreas que permitan resolver problemas que se presenten en el agro mexicano.

A la Biol. Sofía Comparán Sánchez, por su amistad incondicional, su disposición para ser asesora principal de este trabajo y por sus asesoramientos en la estructuración del mismo y la valiosísima aportación científica realizada, además de haber influido durante mi formación profesional.

A la M. C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez, por su atenta labor como asesora en la realización del trabajo de campo y la revisión del escrito, la valiosísima aportación científica realizada, además por transmitirme los conocimientos prácticos del trabajo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y por todas las facilidades prestadas durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan José López González, por su disposición para formar parte de este trabajo, en las revisiones del escrito y por el aporte científico que hubo durante el tiempo de trabajo.

Al M. C. Antonio Cano Pineda, al M. C. Carlos A. Berlanga Reyes y a todo el personal laboral del INIFAP, por su amistad y la convivencia durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT), a la Secretaría de Educación Pública (SEP) y al Gobierno del Estado de Coahuila, por el gran compromiso que se tiene con la educación en Coahuila, agradezco particularmente por todo el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo, ya que permitió en gran parte la finalización del mismo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Saltillo, por permitirme formar parte de ellos durante las prácticas profesionales y en la realización de este trabajo, además por haberme facilitado las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, los materiales y reactivos empleados en la investigación, pues sin ellos no se habría llegado a la meta final. También por su infinita disposición a la formación y capacitación de personal calificado para resolver problemas forestales, agrícolas y pecuarios en beneficio del agro mexicano.

A los encargados de los invernaderos Sierra Alta por facilitar las instalaciones del invernadero de germinación de plántulas, lugar a donde se llevaron las plántulas propagadas en el laboratorio y, en particular, al Ing. Dionisio y a la Sra. Esperanza por la total disposición durante el trabajo de aclimatación.

A la M. C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez, investigadora del INIFAP, por su amistad incondicional, por la paciencia y total dedicación, por toda su atenta y valiosa aportación científica durante las prácticas profesionales y en la realización de la tesis, además por realizar investigación en problemas prioritarios que benefician a la naturaleza y por ende al humano, y su disposición a la formación y capacitación de personal que resolverán problemas que se presenten en el agro mexicano.

DEDICATORIA.

*En hora buena, agradezco a mis padres, Sr. **Victor M. Trinidad Becerra** y a la Sra. **Fidencia García López**, por todo el apoyo que me han brindado desde que me trajeron al mundo hasta concluir una fase más de éxito en mi vida, además por guiarme por el sendero del bien, por los consejos que siempre me dieron, por la confianza que siempre me han tenido y por todas las cosas buenas que de algunas u otra forma me hicieron ser un hombre de bien.*

*Agradezco a mi hermano **Victor Trinidad García**, por el apoyo brindado para que pudiera concluir mis estudios profesionales y a mis demás hermanos que confiaron siempre en mí: **Ma. del Carmen, Tania, Erika, Luis Enrique** y **Andrea Estephanie**.*

*A mi novia, **Ana Isabel Méndez Lara**, por todos los bellos momentos que hemos compartido juntos y por su gran amor; y a toda su familia, por la convivencia que siempre hemos tenido y, por la confianza y comprensión que me han dado.*

*A la generación **XCVII de Ingenieros en Agrobiología**: **Diana J. M. Pérez Cisneros, Evelyn Castañeda Salcido, Rogelio Hernández Zul, Gloria Padilla Villa, Obdulia M. Espítia Hernández, Patricia Hernández Rosas, Fernando R. Quiñónez Nieves, Norma A. Sánchez Bonilla, José L. Tapia Díaz, Elliott R. Ramírez Arzola, Marvella Roblero Briones, Elizalde Francisco Hernández, Gildardo Hinojosa Cortés, Álvaro Solís Morales, Álvaro Torres Durán, José L. Feliciano Lorenzo, Juan C. Alcaya Robles, Carlos D. Salgado Lara, Flora Antonio Hernández, Alma D. Sánchez Aguilar**, por la convivencia que siempre tuvimos dentro y fuera de la universidad. "Siempre los Recordare".*

Dedicada a toda y cada una de las personas que me apoyaron y confiaron en mí... Gracias.

CONTENIDO

Págs.

INDICE DE CUADROS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Objetivo general.
- 1.2. Objetivos específicos
- 1.3. Hipótesis

2. REVISIÓN DE LITERATURA

- 2.1. Características de las Cactáceas
- 2.2. Distribución de las Cactáceas
 - 2.2.1. Clasificación Taxonómica de *Astrophytum myriostigma* Lem.
 - 2.2.2. Clasificación Taxonómica de *Turbincarpus knuthianus* Boed.
 - 2.2.3. Clasificación Taxonómica de *T. lophophoroides* Werd.
- 2.3. Importancia de las Cactáceas en el Mundo
- 2.4. Aspectos Generales de la Micropropagación
 - 2.4.1. Importancia
 - 2.4.2. Ventajas de la Micropropagación
 - 2.4.3. Desventajas de la Micropropagación
- 2.5. Micropropagación de Cactáceas
 - 2.5.1. Proceso de Propagación de Planta por Cultivo de Tejidos
 - 2.5.1.1. Preparación de la Planta Madre
 - 2.5.1.2. Establecimiento de Cultivo Aséptico
 - 2.5.1.3. Germinación *in vitro* de cactáceas
 - 2.5.1.4. Multiplicación de Propágulos (Proliferación)
 - 2.5.1.5. Multiplicación a través de yemas
 - a) Cultivo de yemas axilares (activación de areolas)
 - b) Cultivo de yemas apicales
 - 2.5.1.6. Organogénesis
 - a) Organogénesis indirecta

b) Organogénesis directa

2.5.1.7. Elongación

2.5.1.8. Enraizamiento y Aclimatación

a) Enraizamiento *in vitro*.

b) Enraizamiento *in vivo*

2.6. Condiciones de crecimiento del material vegetativo obtenido por cultivo de tejidos

2.7. Importancia de la fase de adaptación en el proceso de la micropropagación comercial

2.8. Influencia del manejo *in vitro* sobre las características morfofisiológicas y la capacidad adaptativa del material vegetativo

2.8.1. Influencia de la Humedad Relativa en las Vitroplantas

2.8.2. Influencia de las Condiciones *in vitro* en la Anatomía de las hojas

2.8.3. Influencia de las Condiciones *in vitro* sobre la Transpiración

2.8.4. Cambios a Nivel Radicular de las Vitroplantas

2.8.5. Efecto de la Fuente de Carbono en la Actividad Fotosintética

2.8.6. Influencia de las Condiciones *in vitro* sobre la Fotosíntesis

2.8.7. La Concentración de Gases y la Fotosíntesis

2.8.8. Micropropagación Fotoautotrófica

2.9. Recomendaciones para mejorar la adaptación *ex vitro* de plantas

2.10. Transferencia de las Vitroplantas a Sustrato

2.10.1. Características del sustrato

2.10.2. Desinfectación del Sustrato

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del experimento

3.1.1. Características del Laboratorio de Cultivo de Tejidos

3.1.2. Características del invernadero Sierra Alta

3.2. Procedimiento experimental

3.2.1. Inducción de Brotes

3.2.1.1. *Astrophytum myriostigma* Lem.

3.2.1.2. *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

3.2.1.3. Parámetros evaluados

3.2.2. Enraizamiento *in vitro*

3.2.3. Aclimatación de plántulas

3.2.3.1. Pre-tratamiento de las plántulas (Laboratorio)

3.2.3.2. Preparación de sustratos

3.2.3.3. Establecimiento de las plantas

3.2.3.4. Parámetros evaluados

3.3. Análisis Estadístico

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Inducción de Brotes en *Astrophytum myriostigma* Lem.

4.1.1. Número de Brotes

4.1.2. Altura de Brotes

4.2. Inducción de Brotes en *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

4.2.1. Número de brotes

4.2.2. Altura de brotes

4.3. Aclimatación en *A. myriostigma* Lem.

4.3.1. Porcentaje de Supervivencia

4.3.2. Incrementos en Altura

4.4. Aclimatación en *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

4.4.1. Porcentajes de Supervivencia

4.4.2. Incrementos en Altura

4.5. Aclimatación en *Turbinicarpus lophophoroides* Werd.

5. CONCLUSIÓN

6. LITERATURA CITADA.

7. APÉNDICE.

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	<i>Astrophytum myriostigma</i> Lem.	
2	<i>Turbinicarpus knuthianus</i> Boed.	
3	<i>Turbinicarpus lophophoroides</i> Werd.	
4	Fases del proceso de organogénesis (Christianson y Warnick, 1988; Litz y Gray, 1992).	
5	Plantas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales listas para aclimatar.	
6	Inducción de brotes en <i>A. myriostigma</i> Lem.	
7	Inducción de brotes en <i>T. knuthianus</i> Boed.	
8	Plantas de <i>A. myriostigma</i> Lem. aclimatadas en el sustrato T3.	
9	Plantas de <i>T. knuthianus</i> Boed. aclimatadas en los sustratos T3 y T4.	
10	Plantas de <i>T. lophophoroides</i> Werd. aclimatadas en el sustrato T4.	

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Características fisicoquímicas de un sustrato útil	
2	Combinaciones de sustratos para cada tratamiento	
3	Número de plantas por especies en los diferentes tratamientos	
4	Comparación de Medias para Número y Altura de Brotes en <i>A. myriostigma</i> Lem.	
5	Comparación de Medias para Número y Altura de Brotes en <i>T. knuthianus</i> Boed.	
6	Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en <i>A. myriostigma</i> Lem.	
7	Concentración de Incrementos entre Fechas por cada Tratamiento para <i>A. myriostigma</i> Lem.	
8	Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en <i>T. knuthianus</i> Boed.	
9	Concentración de Incrementos entre Fechas por cada Tratamiento para <i>T. knuthianus</i> Boed.	
10	Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en <i>T. lophophoroides</i> Werd.	
11	Concentración de Incrementos entre fechas por cada tratamiento para <i>T. lophophoroides</i> Werd.	
12	Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Número y Altura de Brotes de <i>A. myriostigma</i> Lem. Bajo Diferentes Concentraciones de Citocininas	
13	Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de <i>A. myriostigma</i> Lem. en los Diferentes Sustratos Evaluados	
14	Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Número y Altura de Brotes de <i>T. knuthianus</i> Boed. Bajo Diferentes Concentraciones de BA	
15	Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del	

Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de *T. knuthianus* Boed.
en los Diferentes Sustratos Evaluados

- 16 Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del
Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de *T. lophophoroides*
Werd. en los Diferentes Sustratos Evaluados

RESUMEN

Con el propósito de desarrollar un esquema de multiplicación *in vitro* para *A. myriostigma* Lem. y *T. knuthianus* Boed. se hicieron ensayos independientes evaluando número y altura de brotes.

En *A. myriostigma* Lem., se evaluó el efecto de dos citocininas (BA y Kin) con dos niveles de concentración cada una (11.05 y 22.1 μM BA y 11.61 y 23.23 μM Kin) combinadas con dos niveles de auxina (1.23 y 2.46 μM AIB) en relación 10:1; después de seis semanas se encontró que la Kin tuvo mejor efecto citocínico que la BA en la inducción de brotes, ya que mejoró ambas variables evaluadas, mostrando que al aumentar la concentración de Kin aumentaba de forma sinergista el número y la altura de los brotes, efecto contrario de presentó con BA que al aumentar la concentración disminuían ambas variables.

En *T. knuthianus* Boed., se evaluó el efecto de una citocinina (BA) con seis niveles de concentración (0.0, 6.63, 11.05, 22.1, 33.15 y 44.2 μM) combinadas con seis concentraciones de AIB (0.0, 0.74, 1.23, 2.46, 3.69 y 4.90 μM) en relación 10:1; después de seis semanas se encontró una mayor respuesta en número de brotes en la concentración de 22.1 μM , con respecto a la altura de brotes no se encontró diferencias significativas entre tratamientos, manteniéndose un promedio de 4 mm.

Con el propósito de culminar con éxito el proceso de micropropagación *in vitro* de cactáceas, se realizaron pruebas independientes en la aclimatación de las plántulas propagadas por cultivo *in vitro*, evaluando el porcentaje de supervivencia y el incremento en altura de las plantas.

En la aclimatación de *A. myriostigma* Lem., se evaluó el efecto de 5 mezclas de sustratos sobre el porcentaje de supervivencia y el incremento en altura de las plantas; después de ocho semanas se encontró que el T3 (suelo arenoso, agrolita y humus) presentó un porcentaje de supervivencia alto y buenos incrementos en altura, teniéndose con esto plantas con buena calidad.

En la aclimatación de *T. knuthianus* Boed., se evaluó el efecto de 4 mezclas de sustratos sobre el porcentaje de supervivencia y el incremento en altura de plantas, encontrándose después de diez semanas que el T3 (suelo arenoso, agrolita y humus) y el T4 (arena fina, peat moss y humus), son sustratos adecuados para ésta especie, ya que se obtienen buenos resultados para ambas variables.

En la aclimatación de *T. lophophoroides* Werd., se evaluó el efecto de dos mezclas de sustratos sobre el porcentaje de supervivencia y el incremento en altura de las plantas, encontrando que después de seis semanas ambas mezclas de sustratos son adecuados para la aclimatación de ésta especie.

1. INTRODUCCIÓN.

La República Mexicana por su gran diversidad de condiciones fisiográficas y climáticas, así como por su ubicación en la zona limítrofe entre los reinos Neártico y Neotropical, se considera como una de las zonas florísticamente más ricas del mundo (Rzendowski, 1978), la cual es notable no solo por su riqueza en especies, sino también por su gran número de organismos endémicos (Bravo-Hollis, 1978 y Trejo y Cruickshank, 1987). La familia *Cactaceae*, se distribuye ampliamente en nuestro país y es rico, en especies que se caracterizan por presentar hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializadas, adquirida a través de todo un proceso evolutivo, lo que les confiere una fisonomía particular.

Sus raíces, tallos, flores, frutos y semillas ofrecen una gama de estructuras que garantizan su sobrevivencia en las zonas semiáridas o áridas; donde la mayoría de ellas se distribuyen, incluso permiten la adaptación de algunas especies a la vida epífita o trepadora en las zonas tropicales húmedas. Poseen un alto potencial como fuente de alimentos, fármacos y materias primas para la industria, como por ejemplo, colorantes; así como un alto valor ornamental que las hace altamente apreciadas a escala mundial, constituyendo sin duda una de las riquezas que no hemos aprovechado (Bravo-Hollis, 1978).

Nuestro país es considerado centro de diversidad genética de esta familia, albergando la mayor riqueza de especies, alrededor de 850, que corresponden a 45% de la totalidad de esta familia, nativa del continente americano (Sociedad Mexicana de Cactología A. C., 2000).

En el estado de Coahuila se encuentran 188 especies de cactáceas y 61 variedades, comprendidas en 20 géneros, cuentan con una extraordinaria variabilidad morfológica y de adaptación como respuesta a las condiciones climáticas y ecológicas existentes, por lo que se ubica según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) como una de las áreas cactológicas más importantes del país (Elizondo *et al.*, 1990).

La desaparición o amenaza de especies vegetales, entre ellas algunas cactáceas, constituyen uno de los problemas originados por el hombre a la

naturaleza debido a la falta de conciencia tanto de los gobiernos, como de los individuos, por la explotación irracional, trastornos en sus nichos ecológicos y contaminación del medio ambiente; lo que se agrava por la baja capacidad de recuperación de las poblaciones naturales que muestra la gran mayoría de las especies que lo forman, pues son de lento crecimiento, autoincompatibilidad que impide la reproducción sexual de los individuos aislados y alta mortandad de las plántulas causada por factores ambientales o predación. Por todo lo anterior algunas especies de esta familia se encuentran enlistadas en la NOM-059-ECOL-2001(SEMARNAT, 2001), clasificadas como amenazadas o en peligro de extinción, debido a que muchas son endémicas distribuyéndose en áreas restringidas, lo que atrae más la atención de coleccionistas aficionados o especializados quienes propician su saqueo haciéndolas aún más vulnerables (Sánchez-Mejorada, 1991).

Los programas que se han implementado por parte de los gobiernos e instituciones para la protección de cactáceas han sido ineficaces, por lo que es urgente generar nuevas tecnologías adecuadas para su reproducción, propagación y conservación. La micropropagación es una alternativa que podría solucionar en parte dicho problema, pues consiste básicamente en obtener un número muy alto de nuevas plantas partiendo de fragmentos mínimos de tejido vegetal, cultivados en medios artificiales, bajo condiciones controladas. Esto hace que la propagación *in vitro* además de ser más productiva en cuanto a número, genere plántulas más grandes en menor tiempo y espacio. Lo anterior con el objeto de detener, por un lado, el rápido deterioro de las poblaciones naturales, que podría llevar a la extinción a muchas especies y por otro satisfacer la demanda comercial del enorme recurso que representan las cactáceas (Pérez *et al.*, 1995).

En la actualidad se han establecido protocolos de micropropagación para muchas especies entre ellas algunas cactáceas, por lo que la presente investigación pretende de alguna manera establecer el protocolo de micropropagación para cada una de las especies de interés y además aclimatarlas a condiciones de invernaderos comparando algunas mezclas de sustratos que permitan obtener un mayor porcentaje de supervivencia y que faciliten su desarrollo en dichas condiciones.

1.1. Objetivo general.

Determinar el protocolo de multiplicación de cactáceas del desierto chihuahuense que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción.

Determinar que mezcla de sustratos permite un mayor porcentaje de supervivencia en la aclimatación de tres especies de cactáceas en peligro de extinción, propagadas por cultivo *in vitro*.

1.2. Objetivos específicos.

- Evaluar diferentes concentraciones de fitohormonas en el medio cultivo para promover la inducción de brotes y calidad de los mismos.
- Determinar el tipo de sustrato con el que se promueve la aclimatación de las plantas en invernadero.

1.3. Hipótesis.

Es posible establecer concentraciones de fitohormonas eficientes que mejoren la producción de brotes, así como también la calidad de los mismos.

El uso de diferentes mezclas de sustratos favorecerá el porcentaje de supervivencia y desarrollo de las plantas propagadas *in vitro*, llevadas al invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Características de las Cactáceas.

Las cactáceas son plantas herbáceas o leñosas y suculentas, tienen tallos cilíndricos, globosos o aplanados, simples o ramificados; sus hojas son alternas, simples, generalmente ausentes y con espinas o pelos en las areolas; las flores son bisexuales, raramente unisexuales, actinomorfas; el cáliz y la corola no están claramente diferenciados (usualmente en varias especies); estambres numerosos libres; un pistilo con ovario ínfero que tiene de tres a varios carpelos y una cavidad; su fruto es una baya. Esta familia incluye entre 120 a 150 géneros, con unas 2 000 especies nativas de América, distribuidas principalmente en regiones tropicales y áridas. Se distinguen por su hábito suculento, con espinas y/o pelos arreglados en las areolas, las flores solitarias, vistosas, con estambres numerosos y ovario ínfero (Villarreal, 1993).

2.2. Distribución de las Cactáceas.

Con base en el tiempo y sitio de su origen evolutivo, podría esperarse que los agaves y los cactus se encontraran, de manera natural, únicamente en el nuevo mundo lo cual es esencialmente el caso. La mayor concentración de especies nativas de agaves y cactus se da en el tercio meridional de América del Norte, que incluye de manera arbitraria a América Central y a las islas del Caribe; y en la mitad septentrional de América del Sur. La abundancia disminuye hacia el norte y hacia el sur, pero la distribución de algunos cactus se extiende al norte de Canadá y hasta las porciones meridionales de Argentina y Chile del Sur (Nobel, 1998). Las cactáceas son originarias del continente americano, en donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas. En México, es donde se encuentra el mayor número de especies debido a sus condiciones de ubicación geográfica, climática y topográfica (Nessman, 1994).

2.2.1. Clasificación Taxonómica de *Astrophytum myriostigma* Lemaire.

Planta de tallo globular, deprimido en el ápice, mide entre 10 y 25 cm de diámetro y puede presentarse un tanto columnar cuando el ejemplar es adulto. Es de color verde aunque esta cubierto de manera abundante por escamosidades blancas muy pequeñas que le confieren un aspecto blanco grisáceo. Las costillas habitualmente son cinco, aunque también existen formas de 4 a 8 costillas, muy prominentes y agudas. Las aréolas son muy pequeñas



Figura 1. *Astrophytum myriostigma* Lem.

y están muy juntas. Son completamente inermes y están cubiertas generalmente de pelos parduscos. Las flores miden alrededor de 6 cm de diámetro y son de color amarillo. Existen diversas variedades entre ellas, *quadricostatum*, con sólo 4 costillas y *nudum*, de tallo color verde, sin restos de escamas. Se distribuye en las regiones montañosas del centro y norte de México (Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2003).

Reino: Vegetal

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cereoideae

Tribu: Notocactaeae

Género: *Astrophytum*

Especie: *myriostigma*

2.2.2. Clasificación Taxonómica de *Turbinicarpus knuthianus* (Boedeker) V. John & Riha 1983.

Se define como una especie pequeña que comprende plantas de 6 cm de diámetro, solitarias o en grupos, tallos de forma esféricos, color verde oscuro, presenta espinas agrupadas en areolas, costillas completamente divididas en tubérculos de forma cónica con 9 mm de largo; presenta pubescencia blanca en la parte apical; de 18 a 20 espinas radicales blancas con 8 mm de longitud, lisas, rígidas, puntiagudas, extendidas



Figura 2. *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

horizontalmente; una sola espina central de 10 mm de largo; flores muy numerosas de 25 mm de longitud y de ancho; pétalos oblongos, escasamente puntiagudos, de color carmín rosado brillante a carmín rojo; fruto ovalado, de color verde brillante a café (Monatsschrift *et al.*, 1930). Su distribución abarca zonas de terrenos calcáreos entre los 1100 y 2030 m.s.n.m. (Anderson *et al.*, 1994 y Glass, 1998), en los estados del norte principalmente en San Luis Potosí y Zacatecas (Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2003).

Reino: Vegetal

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledónea)

Orden: Cactales

Familia: Cactáceas

Subfamilia: Cereoideae

Tribu: Echinocactinae

Subtribu: Thelocactinae

Línea B: Stombocati

Género: *Turbinicarpus*

Especie: *knuthianus*

2.2.3. Clasificación Taxonómica *Turbinicarpus lophophoroides* (Werdermann) Buxbaum & Backeberg 1937.

Plantas pequeñas, solitarias de forma hemisférica o más cónica, con 2.5 a 3.5 cm de altura y 4 a 4.5 cm de diámetro, presenta pubescencia en la parte apical. El color del tallo es gris rojizo o verde oscuro; costillas divididas en tubérculos, de 2 a 4 mm de alto; areolas de 2 a 2.5 mm de longitud; espinas de 2 a 5, con 4 a 8 mm de largo, puntiagudas, lisas, curvadas hacia el cuerpo; 1 espina central de más de 1 cm de longitud; flores abiertas con 3.5 mm de ancho de color



Figura 3. *Turbinicarpus lophophoroides* Werd.

rosa pálido a matiz violeta; frutos verdosos, tornados a rojizos con el sol (Zachar; *et al*, 1997). Su distribución abarca zonas de terrenos calcáreos entre los 1100 y 2030 m.s.n.m. (Anderson *et al.*, 1994 y Glass, 1998). Su localización se encuentra en los estados de San Luis Potosí y Zacatecas (Hofer, 1995; Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2003).

Reino: Vegetal

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledónea)

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cereoideae

Tribu: Echinocactinae

Subtribu: Thelocactinae

Linea B: Stombocati

Género: *Turbinicarpus*

Especie: *lophophoroides*

La dispersión natural de éstas tres especies está determinada por hormigas, viento y corrientes de agua de lluvia (Hofer, 1995). Por lo general las semillas se desprenden y caen junto a la planta madre, lo cual parece provocar que la distribución sea amontonada o en manchones (Sánchez, 1998). En la polinización intervienen insectos alados, sin embargo, en ocasiones es posible observar hormigas en las flores (Hofer, 1995).

2.3. Importancia de las Cactáceas en el Mundo.

a) Alimento: Las cactáceas han sido ampliamente utilizadas como alimento humano, aprovechando sus frutos y cladodios. A parte de los frutos también se aprovechan la semillas que se comen asadas o se machacan para preparar tortas. Algunos ejemplos son, *Opuntia ficus-indica* (cladodio), *Opuntia megacantha* (fruto), *Opuntia robusta* (cortezas), *Acantohocereus* (semillas), *Cephalocereus* (semillas), etc. (Martínez, 1999).

b) Ganado: Muchas cactáceas son cultivadas o aprovechadas en estado silvestre colectando sus hojas para alimentar el ganado y constituyen un recurso fundamental al encontrarse en zonas muy áridas donde la presencia de plantas "más tiernas" es prácticamente nula. Muchas de estas especies son aprovechadas para construir cercados donde guardar los animales o separar los campos. Algunos ejemplos son: *Cephalocereus*, *Ferocactus*, etc (Martínez, 1999).

c) Protección del Suelo: En lugares áridos y ventosos se utilizan para fijar el suelo y prevenir la erosión de las lluvias que normalmente se producen de forma torrencial en algunas épocas del año. Este uso se hace muy adecuado en los cultivos que se llevan a cabo en forma de terrazas (Martínez, 1999).

d) Medicinas y Toxinas: Por sus propiedades medicinales o tóxicas, siendo algunas de ellas mundialmente conocidas como el peyote (*Lophophora willamsii*) por sus propiedades alucinógenas (Martínez, 1999).

e) Jardinería: Admiradas por sus atractivas flores, sus extravagantes formas o sus erizadas púas, han sido ampliamente explotadas en jardinería, lo que ha llevado a muchas de ellas a encontrarse al borde de la extinción (Martínez, 1999).

2.4. Aspectos Generales de la Micropropagación.

2.4.1. Importancia.

La Micropropagación denominada también como el Cultivo de Tejidos Vegetales, es muy importante porque permite la rápida multiplicación clonal; en los últimos años estas técnicas han permitido el establecimiento de numerosos laboratorios comerciales para propagar especies de interés comercial. Sin embargo, aunque existe mucha investigación al respecto hace falta resolver algunos problemas relacionados con el establecimiento y manejo *in vivo* de las plantas producidas *in vitro* (Murashige, 1974).

La micropropagación se refiere a la propagación vegetativa de las plantas *in vitro*; en este sistema se utilizan como inóculos o explantes, tejidos u órganos que se toman de una o más plantas donadoras, los cuales tienen meristemas preexistentes y a partir de ellos se generan uno o más brotes (Murashige, 1974; Villalobos y Thorpe, 1985; Pierik, 1987).

Algunas plantas cuando son cultivadas *in vitro*, frecuentemente sus procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos son afectados por el tipo de acondicionamiento en los contenedores (fase gaseosa y sólida); como consecuencia sufren algunos desórdenes que se manifiestan principalmente en las hojas, donde se afectan dos grandes funciones llevadas a cabo por estos órganos: Fotosíntesis e Intercambio gaseoso (Debergh y Maene, 1983; Kozai, 1991).

Los tipos de medios más usados para diversas especies de plantas en el cultivo de tejidos vegetales son los que a continuación se enumeran:

1. Medio de Gamborg *et al.* (1968).
2. Medio de Phillips y Collins (1979).
3. Medio PC.
4. Medio para plantas leñosas (Woody Plant Medium).
5. Medio de White (1943).
6. Medio de Murashige y Skoog (MS).

Este último es el más usado para diversas especies de plantas, a la vez se le pueden hacer diversas modificaciones, para el cultivo de otras especies tal como lo han hecho muchos investigadores.

2.4.2. Ventajas de la Micropropagación.

Hu y Wang (1983); Escobar (1985); Villalobos y Thorpe (1985) señalan algunas ventajas del cultivo de tejidos con respecto a otros sistemas de propagación; sin embargo, es importante mencionar que dependen fuertemente de la infraestructura con que se cuente, del valor agregado que tenga en el mercado la especie que desea propagarse, el nivel de producción que pretendan generarse, y de factores inherentes al método como la condición fitosanitaria de las plantas donadoras de inóculos o explantes (presencia de alguna enfermedad), la edad fisiológica (juvenil, maduro), deficiencias nutricionales, tamaño y tipo de tejido seleccionado como explante, los constituyentes del medio de cultivo, las condiciones de incubación, la interacción entre factores químicos y físicos, y eficiencia en el número de brotes generados por explante.

1. Con una pequeña cantidad de tejido, lo que constituye un explante o inóculo, potencialmente se pueden regenerar millones de plantas, ya que el explante es un fragmento de planta que es establecido *in vitro*.
2. Ésta técnica representa una opción para la multiplicación de las especies, con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales.
3. El número de plantas derivadas por genotipo se puede incrementar rápidamente y en un tiempo más corto.
4. Los niveles de nutrimentos, luz, temperatura y otros factores pueden ser fácilmente controlados para acelerar la multiplicación vegetal y regeneración.
5. Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos, a bajos costos y tiempos económicamente costeados.
6. Se pueden controlar la sanidad del material propagado.
7. Los materiales se pueden transportar bajo las condiciones *in vitro* a otros países con menos restricciones.

8. En la mayoría de los casos la micropropagación es independiente de las estaciones del año.
9. Las plantas *in vitro* requieren atención mínima entre subcultivos, por lo tanto, no son necesarios trabajos y materiales para riego, deshierbes, aspersiones, etc.

2.4.3. Desventajas de la Micropropagación.

Sagawa y Kunisaki (1990) encuentran algunas desventajas de la micropropagación con respecto a métodos convencionales de propagación:

1. La micropropagación requiere técnicas avanzadas e instalaciones y equipos especializados.
2. Los propágulos son relativamente caros debido a los métodos usados en el trabajo intensivo.
3. Deben desarrollarse métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie.
4. Las plántulas inicialmente son muy pequeñas.
5. La posibilidad de producir variantes somaclonales es muy alta.

2.5. Micropropagación de Cactáceas.

De acuerdo a muchas investigaciones realizadas en la distribución y evaluación de las poblaciones naturales en diversos géneros de cactáceas para el estado de Coahuila, López *et al.*, 2003 y López y García (2004) concluyen que las poblaciones naturales se encuentran deterioradas principalmente por las actividades humanas, sobrepastoreo, depredación por la fauna silvestre y doméstica, minería, industrias, la contaminación por basureros, incendios, extracción de acuíferos, colecta de especies de uso agroindustrial y actividades de recreación no reglamentadas.

La técnica de cultivo de tejidos permite hoy en día desarrollar masivamente nuevas plántulas a partir de células aisladas o de cultivos celulares de esta, acortando mucho el tiempo preciso para llegar a probar y producir un nuevo cultivar (Bidwell, 1979). Plantas como las cactáceas requieren de este método de

propagación ya que su desarrollo es extremadamente lento en condiciones naturales y al estar algunas especies amenazadas con la extinción, se debe acelerar su multiplicación para que de esta manera crezcan pronto individuos jóvenes que puedan ocupar el lugar de los adultos a la muerte de estos últimos (Harrington, 1980).

Clayton *et al.* (1990); Malda *et al.* (1999) mencionan que el cultivo *in vitro* es un método potencial para la conservación de especies raras o en peligro de extinción que poseen un metabolismo ácido crasuláceo (plantas CAM), ya que usualmente estas plantas tienen una capacidad reproductiva limitada y tasas de crecimiento muy lento. En una comparación de tasas de crecimiento de cultivo *in vitro* y *ex vitro* demostraron que las condiciones ambientales *in vitro* aceleran notablemente el crecimiento.

2.5.1. Proceso de Propagación de Planta por Cultivo de Tejidos.

Un esquema de propagación *in vitro* de plantas descrito por Murashige (1974) fue posteriormente revisado por Debergh y Maene (1981) para considerar cuatro etapas de propagación, sobre la base de la experiencia obtenida en laboratorios comerciales:

2.5.1.1. Preparación de la Planta Madre.

Se ha enfatizado que hay un gran potencial para dispersión de patógenos sistémicos en las plantas propagadas por métodos vegetativos tradicionales, y que la condición fisiológica de la planta madre determina la respuesta en el medio de cultivo; por lo que el objetivo de esta etapa es proporcionar material vegetal en una condición sanitaria adecuada, que ayude a reducir la contaminación durante la etapa de establecimiento de cultivos asépticos.

Las plantas de las que se obtienen tejidos, para ser cultivadas *in vitro* deben tener un buen estado nutrimental, ya que pueden determinar la respuesta de los tejidos a las condiciones de cultivo.

2.5.1.2. Establecimiento de Cultivo Aséptico.

Es la etapa inicial en el proceso para la micropropagación de plantas; al establecer tejidos vegetales en el medio de cultivo se busca que este sea aséptica. En esta etapa puede ocurrir un alargamiento de brotes apicales, enraizamiento de brotes, proliferación de callos, etc., el objetivo principal es que el cultivo sea establecido libre de contaminación por microorganismos o polvo y que una adecuada proporción de los explantes sobrevivan a las condiciones de incubación.

Ault y Blackmon (1985), Gratton y Fay (1990), Fay y Gratton (1992) agregan que en cactáceas la probabilidad de contaminación se debe al conjunto de espinas y vellosidades que presentan la mayoría de las especies, lo que hace que se albergue polvo y microbios. Debido al origen del material utilizado (vivero o campo) y del tipo de tejido seleccionado como explante (joven o maduro), se han generado diferentes protocolos de desinfección. En todos ellos se ha logrado el establecimiento aséptico utilizando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (ingrediente activo de muchos blanqueadores comerciales) más un surfactante para mejorar el contacto entre el explante y el producto desinfectante.

Cuando la presencia de espinas leñosas y lana dificulta la desinfección, ambas se deben remover, luego utilizar cloruro de mercurio (Hubstenberger *et al.*, 1992) o peróxido de hidrógeno como desinfectante (Escobar, 1985). Sin embargo, aunque la acción efervescente del peróxido hace que se promueva la salida de partículas de polvo de la areola, la remoción de espinas no garantiza la efectividad en la desinfección (Gratton y Fay, 1990). En la mayoría de los protocolos se utiliza alcohol en diferentes concentraciones y de tres hasta cinco enjuagues con agua destilada o doblemente esterilizada.

Vyskot y Jara (1984) establecieron inóculos asépticos obtenidos de plantas de dos años de *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus* sp. Ellos lavaron las plantas madre sin raíz con agua corriente por varias horas, posteriormente las sumergieron en etanol al 70% por 5 min. y por otro tiempo similar con una solución de cloramine B al 3% más unas gotas de Tween 80, luego sumergieron repetidas veces en etanol al 70% y enjuagaron 3 veces con agua

estéril. Después de la desinfestación, las plantas se cortaron en 4 a 5 segmentos, de los cuales se obtuvieron explantes de 4 a 8 mm conteniendo mamilas o areolas.

Johnson y Emino (1979a), Starling y Dodds (1983) y Ault y Blackmon (1987) han propuesto que otra de las causas de contaminación es la presencia de patógenos endógenos, principalmente en plantas de campo, los cuales no pueden ser controlados durante la desinfestación, ya que ésta es exógena. Por eso es necesario cuidar el estado nutricional de las plantas donadoras, aplicar bactericidas para eliminar patógenos endógenos, seleccionar plantas sin evidencias de plagas o enfermedades y tener un ambiente controlado de crecimiento.

En diferentes semillas de cactáceas, Clayton *et al.* (1990) lograron establecer un cultivo sin bacterias y hongos sumergiéndolas en etanol al 95% por 2 min., luego en hipoclorito de sodio al 2% (a partir de la concentración comercial) por 7 min., y enjuagándolas tres veces con agua estéril. Hernández (1994), en cambio, utilizó hipoclorito de sodio al 1% más unas gotas de surfactante (shampoo comercial) por 10 min. obteniendo también resultados satisfactorios.

La eficiencia del protocolo de desinfestación de las semillas depende del tipo y tiempo de exposición de los reactivos empleados. La selección de éstos debe estar en función de la consistencia de la testa, pues altas concentraciones pueden dañarla, necrosar el micrópilo e impedir la emergencia de la radícula y en caso extremo matar al embrión.

Con el objetivo de estimular la brotación múltiple, Zapata *et al.* (1998) colectaron plantas silvestres de *Mammillaria gaumeri*, una cactácea de la Península de Yucatán; cuyas poblaciones silvestres han disminuido considerablemente en los últimos años, y emplearon segmentos de tallo y raíz para desinfectarlos eliminando las espinas, lavando con agua y detergente, e inmersiones de etanol al 70% (5 minutos); dos tratamientos con hipoclorito de sodio comercial al 30% (30 minutos) y al 20% (20 minutos), así como enjuagues posteriores con agua destilada estéril. De lo anterior reportan la obtención del 25% de asepsia en los explantes de tallo, y la obtención de callos, brotes y raíces en diversas concentraciones de BAP y ANA.

Enríquez y Díaz (1994) propagaron *in vitro* *Opuntia amyclacea*, utilizando yemas axilares como inóculo tomados de viveros, sin embargo, reportan la presencia

de bacterias y hongos a partir del tercer día de cultivo en explantes tomados en la temporada de lluvia; por lo que para reducir la contaminación *in vitro*, aplicaron funguicidas a las plantas en el vivero varias semanas antes de tomar material vegetativo; para el establecimiento del cultivo *in vitro* en presencia de citocininas. Limpiaron los fragmentos de tallo sumergiéndolos en alcohol al 70% (30 segundos) e hipoclorito de sodio al 2.5% (15 minutos) seguidamente los sometieron a tres enjuagues sucesivos con agua esterilizada, obteniendo como resultado un 100% de brotación en yemas axilares.

2.5.1.3. Germinación *in vitro* de cactáceas.

En nuestro país se ha reportado la germinación exitosa de semillas asépticas de diversas especies cactáceas en peligro de extinción (Bustamante *et al.*, 1990), así mismo la proliferación de callos, regeneración de brotes y plantas normales de *Pelecyphora aselliformis*, *Neolloydia lophophoroides*, cuyas semillas tienen un bajo porcentaje de germinación en condiciones naturales, y las plantas presentan una baja o nula producción de vástagos ((Bustamante and Heras (1990 a y b) y Bustamante and García (1994)).

En la germinación de *Pelecyphora aselliformis*, *Mammillaria gumífera*, *Neolloydia lophophoroides*, *Obregonia denegri*, *Aztekium ritteri* y *Epithelantha micromeris*, Heras (1990), utilizó medio MS variando la concentración de macroelementos a $\frac{1}{4}X$, $\frac{1}{2}X$ y $1X$; los micronutrientes se tuvieron en concentración normal y sin utilizar reguladores de crecimiento, 20 gr/l de sacarosa, 8 gr/l de bactoagar, ajustando el pH a 5.8, colocó 20 ml de medio en frasco gerber y se esterilizó a 121° C y 1.4 kg/cm² por 15 minutos en una autoclave. Colocó 4 semillas por frasco, que incubó a 25° C en el día y 18° C en la noche, con fotoperíodo de 16 h. Evaluó el porcentaje de germinación a los 45, 90, 135 y 180 días. Encontró a los 45 días que *Pelecyphora aselliformis* presentó, en el medio $1X$ 0%, $\frac{1}{4}X$ y $\frac{1}{2}X$ 8% de germinación, manteniéndose así hasta la última evaluación. Para *Mammillaria gumífera* a los 45 días no habían germinado a ninguna de las concentraciones; a los 90 días alcanzó 8% en los tres medios; a los 135 días, en $\frac{1}{4}X$ y $1X$ se elevaron a 17% y $\frac{1}{2}X$ se mantuvo en 8%; a los 180 días, el medio $\frac{1}{4}X$ alcanzó 33%, $\frac{1}{2}X$ 25% y

el 1X 17% de germinación. En *Neolloydia lophophoroides* mostraron 8% de germinación a los 45 días en los tres medios; a los 90 días la concentración 1X alcanzó 58%, $\frac{1}{4}$ X presentó 50%, manteniéndose así hasta los 180 días; en el medio $\frac{1}{2}$ X, 33% a los 90 días, se mantuvo así a los 135 días y a los 180 días alcanzó 42% de germinación. En *Obregonia denegri*, las semillas no germinaron en ninguno de los medios para ninguna de las fechas de evaluación. En *Aztekium ritteri*, a los 45 días el medio 1X alcanzó 8%, en $\frac{1}{4}$ X 25% y $\frac{1}{2}$ X 58% de germinación; a los 90 días, el medio $\frac{1}{2}$ X mostró 75%, en 1X 42% y $\frac{1}{4}$ X 33% de germinación, manteniéndose estos resultados para las dos fechas posteriores. En *Epithelantha micromeris*, en el medio 1X germinaron 83%, $\frac{1}{4}$ X y $\frac{1}{2}$ X alcanzaron 100% de germinación a los 45 días, manteniéndose estos valores para las otras evaluaciones.

2.5.1.4. Multiplicación de Propágulos (Proliferación).

Después del establecimiento del cultivo aséptico, los explantes generan brotes o callo, los cuales pueden subcultivarse y pasar a etapa de multiplicación. Se busca que produzca un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente pueden dar origen a plantas. La multiplicación de brotes puede originarse a partir de micropropagación (yemas axilares), organogénesis (Starling y Dodds, 1983) y embriogénesis somática (Stuppy y Nagl, 1992).

Murashige (1974) y Litz y Gray (1992) mencionaron que la respuesta morfogénica de dichas vías de regeneración es estimulada por el tipo de explante, medio de cultivo, tipo y concentración de fitohormonas, y factores ambientales, por lo que en un protocolo de multiplicación *in vitro* deben considerarse dichos aspectos. Las citocininas estimulan el crecimiento y desarrollo del tejido, además altas concentraciones de ellas promuevan la formación de brotes pero limitan la formación de raíces (Manzanares, 1994). Entre las citocininas más usadas tenemos: la BA (N6 bencil aminopurina), la Kinetina (N6 furfuril aminopurina), 2iP (N6 dimetil alilaminopurina) y Zeatina; siendo las dos primeras más estables durante la esterilización (Margara, 1988; Villalobos, 1990).

En la micropropagación, dichas fitohormonas rompen el letargo de las yemas laterales presentes en las areolas o mamilas generando brotes debido a que

promueve la división, elongación celular e hidratación del tejido. En el explante las citocininas se concentran en los sitios de crecimiento activo, en el floema y xilema; dependiendo del nivel endógeno que presente el explante será la cantidad de brotes que se generen (Villalobos, 1990; Manzanares, 1994).

En la multiplicación de brotes la relación auxina-citocinina es importante, por lo que se han utilizado medios con bajos niveles de auxina o sin auxina en combinación con altos niveles de citocininas, manteniéndose una relación 0:5, 0:10, 1:2, 1:5, 1:10, debido a que muchas parecen tener un exceso de auxinas endógenas que si no se controla puede estimular callo en lugar de brotes, afectando la tasa de proliferación (Hubstenberger *et al.*, 1992).

Clayton *et al.* (1990) y Fay y Gratton (1992) para inducir y multiplicar callo, mencionaron que se requieren dosis de auxinas en relación 10:1, empleándose preferentemente ANA (ácido naftalenacético) y 2, 4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), consideradas como auxinas fuertes y muy fuertes, respectivamente.

2.5.1.5. Multiplicación a través de yemas.

Litz y Gray (1992) mencionaron que la multiplicación de brotes a partir de yemas (morfogénesis directa) puede darse utilizando explantes con mamilas o areolas obtenidos de plantas de vivero (Mauseth, 1979a), campo (Clayton *et al.*, 1990; Kolar *et al.*, 1989) y plántulas generadas *in vitro* (Mauseth, 1977).

Ault y Blackmon (1987) mencionan que la brotación de yemas axilares se da mediante la activación de areolas o mamilas; ambos son centros meristemáticos que presentan diferentes grados de letargo, pero tienen la capacidad de desarrollar uno o más brotes idénticos a la planta que les dio origen, debido a que contienen meristemas preexistentes.

En la respuesta morfogénica influyen los niveles endógenos de auxinas y citocininas, así como relación exógena de fitohormonas del medio de cultivo. En la caulogénesis, los brotes generados no presentan un callo como intermediario y se originan con una alta concentración de citocininas; la Bencilaminopurina (BA) es la fitohormona que frecuentemente se ha usado para inducir brotes en angiospermas

debido al efecto sinérgico que tiene con las auxinas como el ANA (ácido naftalenacético) o el AIB (ácido indolbutírico).

Johnson y Emino (1979a) mencionaron que al activarse las areolas o mamilas se rompe el letargo de yemas laterales haciendo que éstas se elongen. Este efecto es inducido por la acción de auxinas y citocininas que orientan la morfogénesis hacia la emergencia de un brote (Mauseth, 1979b)

a) Cultivo de yemas axilares (activación de areolas).

En cactáceas, la micropropagación a través de brotes axilares se ha reportado con éxito para más de 50 especies, la mitad de las cuales están registradas como amenazadas o en peligro de extinción; y así mismo se han establecido bancos de germoplasma para su conservación (Phillips *et al.* 1989).

Desde hace varios años, muchos estudios en los sistemas de propagación de cultivos de tejidos de cactus han reportado uniformidad y proliferación de plantas a partir de yemas axilares tomadas de la germinación *in vitro* de semillas asépticas de *Cereus peruvianus*, (Mauseth, 1979; Vyskot and Jara, 1984; Starling, 1985); ya que esto minimiza los problemas de la contaminación que esta asociada con las yemas axilares de plantas adultas *in vivo*.

Estrada (1988) encontró que al cultivar yemas axilares obtenidas de cladodios jóvenes nopal (*Opuntia* sp.) en un medio basal MS suplementado con diferentes concentraciones hormonales se obtienen brotes suficientes de cada morfoespecie.

Johnson y Emiro (1979b) reportan que para el desarrollo de retoños de *Mamillaria elongata in vitro* se utilizó 10 mg/l de 2iP y 1 mg/l de AIA.

El efecto de las citocininas sobre explantes con areolas de *Opuntia polyacantha*, fue activar al meristemo axilar y un brote de hojas verdes fue producido. Con 10 ppm de BA se activaron el 100% de las areolas (Mauseth y Halperin, 1975).

Mauseth (1979b y 1983a) y Subhash y Mehra (1974) coinciden en que la proliferación de brotes axilares es una forma de multiplicación clonal que puede utilizarse en la propagación masiva de cactáceas, ya que tiene menor variabilidad genética en comparación con los brotes adventicios generados vía organogénesis.

b) Cultivo de yemas apicales.

Starling (1985) utilizó yemas apicales de *Leuchtenbergia principis*, *Ariocarpus trigonus*, *Obregonia denegrii* y *Astrophytum asterias* obtenidas de plántulas germinadas *in vitro* con seis semanas de edad. Estas se establecieron en medio MS con diferente concentración de citocininas y auxinas en relación 100:1, encontrando después de 8 semanas con 10 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de ANA se generaron 6 brotes/explante en *A. trigonus*, *O. denegrii* y *A. asterias*. En el caso de *L. Principis* se requirieron 24 semanas para que hubiera inducción de brotes, generando 25 brotes/explante. Concluyéndose que algunas especies tienen mayor dominancia apical que otras y que ésta tiende a romperse con altas concentraciones de citocininas y bajas concentraciones de auxinas.

Ault y Blackmon (1987) cultivaron yemas apicales de *Ferocactus acanthodes* obtenidas de plantas germinadas *in vitro*, en medio MS suplementado con diferente tipo de citocinina en una relación 10:1 (10 mg L⁻¹ de Kinetina y 1.0 mg L⁻¹ de ANA), después de 6 semanas se generaron 6.9 brotes/explante. Estos resultados demuestran que la tasa de proliferación depende del genotipo y en el caso del cultivo de yemas apicales se requieren de una concentración mayor de citocininas que la utilizada en el cultivo de yemas axilares. Además agregan que al multiplicar por más de cinco veces los brotes obtenidos a partir de yemas apicales se incrementa el número de brotes anormales como consecuencia del efecto acumulativo de las citocininas.

2.5.1.6. Organogénesis.

Se refiere a la producción de brotes adventicios a partir de tejido somático; estos brotes se caracterizan por ser estructuras unipolares conectadas físicamente al tejido que les dio origen. Los brotes pueden generarse sin la fase de callo (organogénesis directa) o bien, generarse a partir de callo (organogénesis indirecta). Esta vía de regeneración se ha utilizado en genotipos mejorados con baja tasa de propagación *in vitro*, en especies de difícil propagación por métodos convencionales y en especies susceptibles a plagas y enfermedades.

En cactáceas, la organogénesis indirecta se ha derivado de hipocótilos tomados de plántulas germinadas *in vitro* (Minocha y Mehra, 1974), brotes (Mauseth y Halpering, 1975), tallo (Bones *et al.* 1994) y yemas vegetativas (Minocha y Mehra, 1974), a partir de las cuales se ha inducido callo y posteriormente brotes adventicios. Estos explantes se han establecido preferentemente en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Skoog y Miller (1957) demostraron que el proceso organogénico está gobernado por un balance de auxinas y citocininas; la influencia de este balance la estudiaron en *Nicotiana tabacum* L., encontrando que una mayor proporción de auxinas que de citocininas induce raíces, mientras que una proporción opuesta induce brotes. Estos resultados demostraron que el balance hormonal marca el destino de las células morfológicamente competentes, donde auxinas como 2,4-D, ANA y AIB son importantes en la inducción de raíces y callo, mientras que citocininas como la BA, 2iP, Kin y Zeatina son necesarias para mantener el crecimiento celular del tejido e inducir regiones meristemáticas de acuerdo al esquema presentado en la Figura 1.



Figura 4. Fases del proceso de organogénesis (Christianson y Warnick, 1988; Litz y Gray, 1992).

La formación de callo en el explante es referida como “desdiferenciación del explante”, mientras que la capacidad del explante para responder al efecto inductivo del medio es llamada “competencia”. Según Walker *et al.* (1979) la “competencia”

para inducir brotes está en función de la acción de los genes y del tamaño de los agregados celulares. La fase de inducción está influenciada por fitohormonas exógenas, las cuales juegan un papel importante en la síntesis de proteínas que “determinan” mediante la “diferenciación” la generación de un brote o raíz (Meins y Binns, 1979; Distabanjong y Geneve, 1993).

Como producto de la “competencia y determinación” se da el proceso de “desdiferenciación-diferenciación” celular, generándose brotes adventicios, los cuales presentan un origen unicelular o multicelular y emergen de lugares distintos a la región de la yema, por lo que no son producto de un meristemo axilar preexistente como ocurre en la micropropagación (Minocha y Mehra, 1974). Christianson y Warnick (1988) agregan que durante este proceso el tejido tiene una alta actividad mitótica, lo que provoca que grupos de células y callosidades puedan organizarse para formar yemas, primordios de raíz o brotes que posteriormente se desarrollarán como plantas. Durante las fases de desdiferenciación-inducción-diferenciación, el explante debe satisfacer sus requerimientos nutrimentales, por lo que todos los componentes del medio de cultivo incluyendo las fitohormonas son importantes (Reynolds, 1986; Litz y Gray, 1992).

La falta de respuesta no sólo se debe al efecto que tiene el medio de cultivo sino también a una selección equivocada del explante (Christianson y Warnick, 1988), edad del callo (Jain y Datta, 1992), tiempos de exposición cortos o prolongados del explante al medio de inducción de callo y al medio de inducción de brotes (Distabanjong y Geneve, 1993), balance hormonal incorrecto, genotipos con altos niveles endógenos de giberelinas y presencia de fenoles que inhiben a las células del callo haciendo que éste se quede verde, incremente su biomasa y parezca sano sin generar respuesta (Benmoussa *et al.*, 1996).

a) Organogénesis indirecta.

Manchado y Prioli (1996) indujeron plantas a partir de la organogénesis indirecta, utilizando como material vegetal brotes laterales y apicales de *Cereus peruvianus* Mill., establecieron sus explantes en un medio MS, suplementado con vitaminas de Gamborg B₅, 3% sacarosa y 0.8% de agar; lograron resultados positivos

con los brotes laterales, mientras que los brotes apicales no respondieron a la multiplicación *in vitro*.

Arenas *et al.* (2001) trabajaron en la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeberg) Glass & Foster, donde plántulas (0.5-1 cm altura) *in vitro* se dividieron en ápices y bases que fueron sembradas asépticamente en medio de inducción MS (45 días) con BA 0,0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg L⁻¹ y ANA 0, 0.01, 0.1 y 0.5 mg L⁻¹; se establecieron 20 explantes/tratamiento mismos que fueron incubados a 25 ±2° C, fotoperíodo de 16 h. Los primeros cambios (callo, crecimiento del tejido) se observaron después de 15 a 25 días. Después de la inducción y ya en MS 50%, a los dos meses, se diferenciaron los primeros brotes vía indirecta. Al término de 3 meses la mejor respuesta de organogénesis indirecta se encontró asociada a la inducción con BA 2 mg L⁻¹ en ausencia de ANA: ápices 23 brotes/trat; bases 34 brotes/trat; el mejor tratamiento de enraizamiento se logró con ANA 0.01 mg L⁻¹.

Gómez *et al.* (2001) trabajaron con *Ariocarpus bravoanus* en donde a partir de plántulas germinadas asépticamente fueron disectados 450 tubérculos y sembrados en seis tratamientos en medio de inducción MS (8 semanas) con AIB (0-2 mg L⁻¹) y ANA (0-1 mg L⁻¹) e incubados a 25 ±2° C, con fotoperíodo 16 h. Se logró la regeneración *in vitro* a partir del enraizamiento de tubérculos y de brotes múltiples que se originaron de callo vía organogénesis. El desarrollo de raíces y de callo se observó desde las primeras 2 semanas en medio de inducción, obteniendo mejores resultados en tres tratamientos cuyos explantes formaron callo en su porción lateral o apical, dentro de las primeras ocho semanas; el porcentaje de enraizamiento de tubérculos fue cercano al 25%, las raíces obtenidas fueron vigorosas y de 4-8 en cada tubérculo. Si bien, a tres meses de iniciados los cultivos, la formación de brotes ha sido escasa (1%), este porcentaje se ha incrementado por lo que estos resultados permiten vislumbrar el establecimiento de un método efectivo para la regeneración y conservación de esta especie en serio peligro de extinción.

b) Organogénesis directa.

Jiménez *et al.* (2001) trabajaron con *Astrophytum myriostigma*, en el que disecaron plántulas germinadas *in vitro* retirando el ápice y las raíces, los tallos se dividieron en dos porciones longitudinales y se sembraron en medio MS adicionado

con Bencilaminopurina (0, 1, 3, y 5 mg L⁻¹) y ácido naftalén acético (0, 0.1, y 0.5 mg L⁻¹), se incubaron a 25 ± 1° C, fotoperíodo 16 h luz. La regeneración se logró principalmente por organogénesis directa, la mayor formación de brotes por explante (7 a 8) se obtuvo en medio adicionado con 2-3 mg L⁻¹ de BA con nulas o bajas concentraciones de ANA. Se probaron 4 tratamientos para el enraizamiento de brotes adventicios, el más efectivo fue MS sin reguladores del crecimiento. Se logró el 100% de supervivencia al trasplantar las plántulas a condiciones de invernadero.

Ortiz *et al.* (2003) trabajaron en la micropropagación de *Astrophytum myriostigma*, utilizaron plantas clonadas *in vitro* de 3 cm. de altura, de las cuales se obtuvieron dos tipos de explantes a) sección ápice y b) secciones laterales del tallo. Los dos tipos de explantes se establecieron bajo condiciones asépticas y se sujetaron a tratamientos de manera independiente en medio MS modificado con 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹ de ANA en combinación con 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 6.0 mg L⁻¹ de BA. Los frascos se incubaron a una temperatura de 27 ± 2° C, con un fotoperíodo de 16 horas luz, 2000 lux de intensidad luminosa durante 65 días. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos; en ápice el tratamiento con 3.0 mg L⁻¹ de BA y 0 mg L⁻¹ de ANA se presentó como el mejor inductor de brotación múltiple presentando una media de 16.7. En secciones laterales de tallo el tratamiento con 6.0 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de ANA se presentó como el mejor inductor de brotación múltiple con 12.64 brotes por explante.

Villavicencio *et al.* (2000) trabajaron en la Germinación y multiplicación *in vitro* de *A. myriostigma*, en la fase de inducción de brotes se utilizaron plantas con 15 mm. de altura que se cortaron transversalmente para obtener dos tipos de explantes (basal y apical). Se utilizó el medio MS sustituyendo el CaCl por el CaNO₃ sin adición de KI, en el que se evaluaron dos tipos de citocininas (BA y Kin) con cuatro concentraciones (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹) combinadas con 0.1 mg L⁻¹ de AIB. El desarrollo de brotes se logró por organogénesis directa y activación de areolas. El número de brotes fue similar entre tipos de explante (basal μ= 4.3, apical μ= 4.0), a pesar de que existieron diferencias significativas con el tipo y concentración de citocinina. El número de brotes aumentó al incrementar la concentración de citocinina, siendo mayor con BA alcanzando 6.6 y 6.0 brotes/explante basal y apical

respectivamente con 2.0 mg L^{-1} de BA. La misma tendencia pero en menor proporción, se observó en explantes basales en medio con Kin donde se obtuvieron 4.5 brotes/explante. La interacción tipo y concentración de citocinina también tuvo efecto, los brotes de explantes basales con 1.0 mg L^{-1} de Kin y 2.0 mg L^{-1} de BA presentaron mayor altura, 7.7 y 8.0 mm, respectivamente.

Villavicencio (2002) trabajó con *Astrophytum myriostigma* y *Turbinicarpus valdezianus* iniciando la micropropagación con el establecimiento de semillas *in vitro* en un medio elaborado con 3.0% de sacarosa y 0.6% de agar. En este medio se obtiene una germinación superior al 80% a los 42 días. Las plántulas se subcultivaron cuatro veces en medio MS al 50% adicionado con 0.15 % de carbón activado y antioxidantes. Plántulas con altura mayor a 15 mm se utilizaron para obtener de dos a tres explantes. Los explantes se establecieron en medio MS para la inducción de brotes, adicionando citocininas (4.4 a 8.8 mM) combinada con auxina en una relación de 10:1. Después de seis a ocho semanas se indujo la activación de areolas obteniendo en promedio de 7 a 10 brotes por explante respectivamente. Posteriormente las plántulas se elongaron y hicieron enraizar utilizando un medio MS adicionado con 4.1 mM de AIB. Con este medio las plántulas alcanzaron una altura de hasta 20 mm generando tres raíces por planta de 5 cm de longitud.

Escobedo *et al.* (2000) trabajaron en la propagación *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus*, donde utilizaron plántulas germinadas y crecidas bajo condiciones *in vitro* por cuatro subcultivos consecutivos cada cuatro semanas en medio MS. Los brotes se dividieron transversalmente para generar fragmentos cilíndricos; la parte apical no fue considerada. Los explantes se colocaron en frascos de gerber con medio nutritivo y se transfirieron al cuarto de incubación. Se estableció cada tratamiento con tres repeticiones, cada repetición constó de un frasco de gerber con cuatro explantes, que conformaron un total de 48 tratamientos procedentes de la combinación de cuatro factores, Facto A correspondió a medios nutritivos, MS y PCL2; Factor B a tipos de citocininas, BAP y Kin; Factor C a concentraciones de citocininas (0.0, 1, 3 y 10 mg L^{-1}); y el Factor D a concentraciones de ANA (0.0, 0.1 y 1 mg L^{-1}). Todos los medios fueron suplementados con 250 mg L^{-1} de mioinositol, 1 mg L^{-1} de tiamina-HCl, 1 mg L^{-1} de piridoxina-HCl, 30 mg L^{-1} de sacarosa, 8 mg L^{-1} de

agar; ajustado a un pH de 5.7. El número de brotes conformados en cada tratamiento se registró a las doce semanas de desarrollo. Los resultados obtenidos por el estadístico de prueba indicaron que únicamente el Factor C, concentraciones de citocininas, resultó altamente significativo, encontrándose que los tratamientos que produjeron la mayor cantidad de brotes por explante 3.04, 2.5 y 2.2 correspondieron a los tratamientos que contenían 1 mg L⁻¹ de Kin, 3 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de BAP respectivamente, mientras que los tratamientos que no contenían citocininas formaron muy pocos brotes, 0.05 y 0.08.

2.5.1.7. Elongación.

En brotes pequeños Maene y Debergh (1983) proponen realizar 1 o 2 subcultivos después de la micropropagación, debido a que éstos son incapaces de autoportar el crecimiento si se enraízan *in vivo*. Los brotes requieren de una etapa de elongación para que las plantitas alcancen mayor tamaño, sean uniformes al momento de pasarlas al invernadero y puedan llevar a cabo una vida autótrofa durante el enraizamiento en suelo.

2.5.1.8. Enraizamiento y Aclimatación.

Con el propósito de mejorar la acción de las auxinas durante esta etapa es necesario reducir la concentración de algunas sales y aplicar carbón activado al medio de cultivo (Moncousin, 1991; Dumas y Monteouis, 1995). Damiano *et al.*, (1991) y Manzanares (1994) mencionan que el proceso de rizogénesis es mediado por las auxinas, y abarca tres etapas:

- a) Etapa de fenoles. Estos involucran y tienen un efecto sinérgico, inhibiendo la enzima AIA-oxidasa. Esta inhibición permite que la auxina se acumule en la parte basal del brote, promoviendo la división celular e induciendo la formación de raíces.
- b) Etapa de inducción temprana. Los monofenoles se cambian a polifenoles e inactivan a la auxina dando comienzo a la tercera etapa.
- c) Etapa de iniciación tardía. Los primordios se organizan y finalmente se da el crecimiento y diferenciación de raíces.

Algunas especies de cactáceas presentan una concentración endógena alta de auxinas, que permite el enraizamiento de los brotes en el mismo medio sin la aplicación de auxinas o bien pueden enraizarse *in vivo*. En cambio, otras requieren subcultivarse en medios específicos para la inducción de raíces (Vyskot y Jara, 1984; Escobar, 1985; Clayton *et al.*, 1990). Antes de sacar las plantas al invernadero se deben tomar en cuenta lo siguiente:

- a) Enraizamiento de los brotes (en algunas especies).
- b) Crecimiento de los brotes.
- c) Endurecimiento de las plantas para proporcionar alguna tolerancia a tensión de humedad.
- d) Obtención de cierto grado de resistencia a algunos patógenos.
- e) Conversión de las plantas de un estado heterotrófico a uno autotrófico.

En la aclimatación, las plantas se preparan para un cambio ambiental y fisiológico, en donde se requiere que el tallo y hojas generen una capa de cera, los estomas sean fisiológicamente funcionales para que puedan controlar la transpiración y el aparato fotosintético genere sus propios carbohidratos.

Dumas y Monteouis (1995) mencionaron que el paso de la condición *in vitro* al invernadero es esencial para el éxito en la micropropagación. Este se logra manteniendo el material en áreas con alta humedad relativa (90-100%) por un periodo de tiempo determinado, reduciendo las sales durante los subcultivos previos a la aclimatación e incrementando la concentración de sacarosa para que los carbohidratos sirvan de fuente de energía durante el enraizamiento (Cabaleiro, 1991; Hernández, 1994).

a) Enraizamiento *in vitro*.

Se ve afectado por la especie, tipo y tamaño de explante, estado fisiológico del tejido, números de subcultivos, composición del medio de cultivo y condiciones de incubación (Starling, 1985; Roberts y Matthews, 1995). Maene y Debergh (1983) señalan que el sistema radical desarrollado *in vitro* no es completamente funcional, por lo cual sugieren el enraizamiento *in vivo*; sin embargo, Cabaleiro (1991) demostró que a pesar de que las raíces generadas *in vitro* son más delgadas que las generadas *in vivo*, ambas tienen la misma capacidad para absorber nutrientes. El

problema del enraizamiento *in vitro* radica en que las raíces llegan a ser largas y numerosas, haciéndose sensibles al daño mecánico cuando se realiza el transplante a suelo.

Debergh y Maene (1981) han propuesto objeciones al enraizamiento *in vitro* de plantas debido a las siguientes afirmaciones:

- A) Que el enraizamiento *in vitro* de brotes es una labor que ocupa mucha mano de obra y que esta etapa es responsable de al menos 35% del costo de las plantas producidas *in vitro*.
- B) Usualmente hay un retraso en el crecimiento de brotes enraizados *in vitro*, después de la transferencia fuera del medio de cultivo.
- C) Es difícil inducir un buen funcionamiento del sistema radical producido *in vitro* y se ha observado que dos semanas después del transplante del medio de cultivo a suelo, las raíces formadas *in vitro* han muerto y nuevas raíces comienzan a desarrollar.
- D) Las plantas derivadas *in vitro* tienen menos cera cuticular en sus hojas en comparación con plantas que crecen en campo o invernadero, esto provoca que las plantas producidas *in vitro* pierdan agua con más rapidez.
- E) Inicialmente las plantas producidas *in vitro* tienen un control inefectivo de apertura de estomas.

Vyskot y Jara (1984) enraizaron *in vitro* cactáceas con una altura de 5 a 10 mm en medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de AIA. Después de seis semanas las plantas se aclimataron en un invernadero obteniendo 80% de supervivencia. En cambio, Rodríguez-Garay y Rublo (1992) en *Aztekium ritteri* utilizaron la misma auxina en concentración más alta (2 mg L⁻¹ de AIA) obteniendo 90% de supervivencia.

Hernández (1994) enraizó *Melocactus bellavistensis* en medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de AIB; las plantas enraizadas se aclimataron en invernadero, empleando como sustrato un producto comercial elaborado a base de turba, vermiculita, dolomita y agentes humectantes. Para dar mayor porosidad a la mezcla se agregó Agrolita en una proporción 4:1. Después de 15 días de transplante se obtuvo 80% de supervivencia.

Ault y Blackmon (1987) enraizaron brotes de *Ferocactus acanthodes* de 5 a 15 mm de longitud utilizando medio MS modificado sin hormonas, encontrando 96.2% de enraizamiento con 14.6 mM de sacarosa. Posteriormente, las plántulas se transplantaron a suelo empleando un sustrato elaborado a base de Peatmoss y corteza de abeto fina en una proporción 1:1. Los contenedores se cubrieron con poliestireno para prevenir la desecación y promover su aclimatación en invernadero. Se obtuvo 90% de supervivencia de las plántulas. Rubluo *et al.*, (1993) recomienda que cuando se utilice el enraizamiento *in vitro* se lave el agar de las raíces, porque éste puede ser un foco de infección de hongos y bacterias.

b) Enraizamiento *in vivo*.

Se realiza durante la aclimatación en invernadero, en esta etapa los brotes sin raíz son más susceptibles al ataque de hongos, requiriéndose controlar las condiciones de humedad (90%), temperatura (23 a 25° C) y aplicar un enraizador comercial que contenga funguicidas para evitar la incidencia de patógenos (Fay y Gratton, 1992). Asimismo, Johnson y Emino (1979a) proponen manejar un sustrato poroso estéril compuesto por una mezcla de peat moss, vermiculita y perlita en proporción 2:1:1, o probar otros que sean porosos pero que mantengan cierta humedad.

Escobar (1985) y Hernández (1994) sugieren colocar una cubierta plástica agujerada con un alfiler durante las primeras 2 a 3 semanas para promover la inducción de raíces, además se puede optimizar si la mezcla orgánica es suplementada con 1.0 mg L⁻¹ de AIA o con un enraizador en polvo y cuidar las condiciones del ambiente; inicialmente con humedad cercana al 100% y disminuirse gradualmente, al igual que la luz y la temperatura; esto protegerá la parte aérea de la plántula de una transpiración excesiva y promoverá la redistribución de fotosintatos en la parte basal y la inducción de raíces (Clayton *et al.*, 1990; Rubluo *et al.*, 1993).

Yassen-Mohamed *et al.* (1995a) comparó el enraizamiento *in vitro* con el *in vivo* y no encontró diferencias en el número de raíces generadas a las cuatro semanas de evaluación, registrando en promedio 3.6 raíces/plántula; sin embargo, las raíces generadas *in vivo* presentaron mayor cantidad de pelos radicales, lo que pudo influir en su mejor adaptación durante su aclimatación.

Entre las ventajas del enraizamiento *in vivo* sobre el enraizamiento *in vitro* tenemos: ahorro del medio de cultivo, espacio, equipo, mano de obra, facilidad de manipulación durante el establecimiento *in vivo* y efectuar la aclimatación en el mismo período en que ocurre el enraizamiento.

2.6. Condiciones de crecimiento del material vegetativo obtenido por cultivo de tejidos.

El material vegetativo en las etapas de multiplicación, elongación y enraizamiento *in vitro* se mantiene en un área con ambiente controlado llamado cuarto de incubación. En él se han considerado todos los factores (Temperatura, Humedad Relativa, Intensidad Lumínica, Nutrientos) que influyen favorablemente sobre el crecimiento vegetal. Es importante considerar estas condiciones, ya que la tendencia en la etapa de adaptación será imitar dichas condiciones, de tal forma, que se presente la máxima sobrevivencia posible (Hurtado y Merino, 2000).

Considerando que el proceso de micropropagación involucra un manejo en condiciones asépticas, esto significa que se ha logrado la eliminación de todo tipo de microorganismos contaminantes durante las diferentes etapas de este proceso, “acostumbrado” a mantenerse aislado de cualquier agente biológico, acentúa su susceptibilidad; más esto no quiere decir que se pierda un carácter intrínseco de tolerancia o resistencia.

En cada una de las etapas se abastece una serie de materiales que en conjunto componen un medio de cultivo y de sostenimiento. Este contiene los elementos necesarios (hormonas, sales minerales, vitaminas, etc.) que coactuarán para un objetivo particular que dependerá de la etapa (Hurtado y Merino, 2000).

La etapa de adaptación tiene a la multiplicación y al enraizamiento *in vitro* como las etapas precedentes, de las cuales se recibirá el material vegetativo para dar entrada a su manejo en invernadero y, prácticamente culminar de esta forma, con el proceso.

De la etapa de multiplicación se reciben partes vegetativas sin enraizar llamados brotes o vitroplantas y de la etapa de enraizamiento *in vitro*, normalmente se recibe material vegetativo con un sistema radicular bien formado. Ambas etapas

persiguen objetivos diferentes, por lo que la composición del medio resulta de vital importancia; ya que el material encuentra todo lo necesario para tener buenas respuestas; proliferación de brotes o emisión de raíces, además de vigor, crecimiento, sanidad, etc (Hurtado y Merino, 2000).

Los recipientes son colocados en un cuarto de incubación donde la temperatura, fotoperíodo e intensidad lumínica están controlados; y factores como la humedad relativa se mantiene, en un porcentaje alto. La temperatura idónea para un buen ritmo de crecimiento es de $25 \pm 2^\circ \text{C}$; el fotoperíodo varía desde 12 horas diarias de luminosidad hasta luz continua dependiendo de las especies. El rango de intensidad fluctúa entre 1 000 a 10 000 luxes; a diferencia de la temperatura, fotoperíodo e intensidad lumínica; la humedad relativa no es controlada mediante algún equipo especial. Sin embargo, se reporta que ésta se da en un nivel muy cercano al 100%, ya que en el frasco o recipiente mismo se conserva ese nivel de humedad (Hurtado y Merino, 2000).

La consideración de estos aspectos ambientales, a los cuales el material vegetativo esta adaptado, son decisivos para lograr el éxito durante la aclimatación.

2.7. Importancia de la fase de adaptación en el proceso de la micropropagación comercial.

Normalmente se considera a la etapa de adaptación como la más insegura de todo el proceso de micropropagación. Representa la culminación de una metodología de propagación *in vitro*; no se puede hablar de una metodología exitosa mientras no se haya logrado la sobrevivencia de un porcentaje considerablemente alto de vitroplantas y será verdaderamente valorable en el momento en que pueda ser aplicada bajo condiciones de manejo reales, en términos masivos y con resultados consistentes.

Se han frenado trabajos prometedores de propagación clonal a consecuencia de la alta tasa de mortandad en la fase de adaptación o por los irregulares resultados de sobrevivencia. La facilidad para la deshidratación, la falta de respuesta fisiológica y la susceptibilidad a problemas de contaminación son las causas más comunes por las cuales el material no sobrevive.

Para la micropropagación comercial esta fase es sumamente importante, se considera como un período de transición que debe planearse y manejarse cuidadosamente para lograr los mejores resultados. Su principal función es, desde luego, llevar el más alto porcentaje de vitroplantas a producto terminado, de la forma más presentable, con alta calidad fitosanitaria y al más bajo costo.

En esta fase se decide la forma de recepción técnica y económicamente viables, lo cual repercute sobremanera en los costos totales de producción; se empeña por reducir al mínimo los costos de producción, comprometiéndose en minimizar los desechos de material vegetativo, utilizar materiales e insumos económicos, evitar la ocurrencia de mortandades, eficientar los procesos y elevar la productividad.

2.8. Influencia del manejo *in vitro* sobre las características morfofisiológicas y la capacidad adaptativa del material vegetativo.

Por las características anatómicas y fisiológicas que presentan las plantas micropropagadas se hace necesario para su sobrevivencia en condiciones *ex vitro*, una gradual adaptación o aclimatación a las condiciones medioambientales del invernadero o del campo, de no hacerse así, las probabilidades de sobrevivencia de las plantas son muy bajas o nulas para algunas especies (Mendoza, 1993).

Una causa muy común de la mortandad que ocurre en la etapa de adaptación es la pérdida excesiva e inexorable de agua en los tejidos del material vegetativo.

Debido a que el material obtenido por cultivo *in vitro* se aclimatan en lugares con condiciones diferentes a las del cuarto de incubación, donde el ambiente es controlado, cualquier variación física puede ser perjudicial para dicho material. Por lo tanto, en la aclimatación del material vegetativo se promueven cambios graduales en las condiciones ambientales. Por lo que la parte fundamental de la adaptación es proporcionar cambios no drásticos y, que en consecuencia, no ocasionen algún tipo de estrés o daño (Mendoza, 1993).

Cuando una especie se maneja como microesqueje (sin enraizar) en las áreas de aclimatación, la susceptibilidad para presentar el fenómeno de deshidratación es

mayor, por lo que las atenciones y su manejo serán relativamente diferentes comparado con el de un material enraizado.

Los cambios en las dosificaciones del medio, fotoperíodo, temperatura, pH, entre otras cosas, pueden ocasionar alteraciones morfológicas, retraso de crecimiento, toxicidad, etc. Asimismo, cambios en los factores físicos pueden provocar cambios en procesos como absorción de agua, fotosíntesis, respiración y crecimiento, tal como ocurre *in vivo* (Mendoza, 1993).

2.8.1. Influencia de la Humedad Relativa en las Vitroplantas.

La condición de alta humedad relativa (H. R.) que ocurre dentro del recipiente repercute en la formación de las células en empalizada con grandes espacios intercelulares y baja frecuencia de estomas e incluso se discute que en algunas especies, como manzano, es muy baja la respuesta estomática (Lewandowski, 1991).

Se ha sabido desde hace varios años que la alta humedad en los contenedores de cultivo afectan negativamente el desarrollo de ceras cuticulares y de estomas funcionales. Las plantas en cultivo *in vitro* son crecidas con baja demanda evaporativa, por la alta humedad relativa y la baja intensidad luminosa (30 a 75 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$); bajo estas condiciones puede haber una baja tasa de transpiración aún cuando los estomas estén completamente abiertos (Santamaría, 1996).

Cuando las vitroplantas son expuestas a más bajas humedades relativas, como ocurre durante el transplante, pueden presentar altas tasas de transpiración debido a la conductancia inicial de las hojas, lo cual al ser excesivo, provoca en la planta un severo déficit de agua. Esta pérdida de agua es una de las principales causas de mortalidad de plantas después de su transferencia a invernadero (Santamaría, 1996). Ni Lee *et al.* (1985) menciona que la causa de la mortalidad de plantas durante la aclimatación es debido a daños por estrés hídrico.

2.8.2. Influencia de las Condiciones *in vitro* en la Anatomía de las hojas.

Mediante observaciones microscópicas se han determinado algunas modificaciones, tanto en la anatomía de la hoja como en el sistema radicular de especies obtenidas por cultivo de tejidos.

Las plantas de cultivos de tejidos tienen una anatomía divergente comparada con plantas *ex vitro*, que incluyen reducidas cantidades de cera epicuticular, reducido desarrollo cuticular, amplios espacios intercelulares y estomas levantados, más grandes, de más alta densidad y con reducido cierre estomático.

Tal parece que el manejo bajo las condiciones *in vitro* altera sustancialmente las características internas y externas de las hojas. Puesto que, además de los cambios a nivel de estomas y de las formas y arreglos de las células en empalizada y mesófilo esponjoso, el contenido de cera en la cutícula de la hoja también sufre cambios.

Normalmente se señala que en el manejo *in vitro* puede ocurrir una disminución o ausencia total de cera en la cutícula de las hojas de algunas especies (Grout y Aston, 1977), aunque un estudio señala un incremento de cera epicuticular en la superficie abaxial de hojas *in vitro* (Knight y Chu, 1991). El espesor de la cera epicuticular es un punto de importancia para la sobrevivencia del material vegetativo, ya que en la medida de que ésta sea mayor, la tasa transpiratoria tenderá a ser menor, puesto que implica una película opositora para la pérdida excesiva de agua. También, en el contenido de cera de las hojas se han apreciado modificaciones según la etapa de crecimiento y la especie en estudio.

Si los estomas no son completamente funcionales al momento del manejo *ex vitro*, aparentemente sí hay una deposición de cera en las hojas, probablemente entre los 7 y 14 días posteriores al trasplante (Grout y Aston, 1977; Lewandowski, 1991); o bien, una homogeneidad de la película de cera una vez establecidos afuera (Knight y Chu, 1991).

Santamaría *et al.* (1993) mencionan que muchos son los factores que podrían estar envueltos en la respuesta al reducido cierre del estoma que ocasiona la deshidratación en plantas micropropagadas. Una posibilidad sería que tienen una limitada capacidad para producir ácido abscísico (ABA).

2.8.3. Influencia de las Condiciones *in vitro* sobre la Transpiración.

La tasa de transpiración de las plantas *in vitro* generalmente es bajo debido a la alta humedad existente en el recipiente hermético, así que la transpiración no tendría mayor contribución en la absorción de nutrientes por las plantas en la micropropagación convencional.

Además, las concentraciones de iones en el medio tienden a decrecer con el incremento de la absorción de los iones correspondientes, porque hay poca disminución con el tiempo en la cantidad de agua en el medio. En otras palabras, la absorción de nutrientes y, de aquí, el crecimiento podría ser mejorado con la promoción de la transpiración (Kozai, 1991).

La alta transpiración en vitroplantas se atribuye a la pobre función estomatal como resultado de un arreglo anormal de las microfibrillas de las células guarda, reducida cera epicuticular de la hoja y alta densidad estomatal (Santamaría, 1996).

Los Agaves (*A. Americana* y *A. deserti*), como muchas otras plantas CAM pueden controlar transpiracionalmente las pérdidas de agua. Esta situación es debida parcialmente a su capacidad para abrir el estoma en la noche. Otros investigadores sugieren que los agaves irrigados frecuentemente pueden alterar su metabolismo abriendo el estoma durante las horas lumínicas, además Malda *et al.* (1999) con *Coryphantha minima* y con *Chamaecereus sylvestrii* reportan los mismos comportamientos. Así, puede suponerse que bajo las condiciones de cultivo de alta humedad relativa y un continuo suministro de agua del medio, las plantas CAM bajo cultivo se comporten como plantas C₃, probablemente perdiendo su ventajoso control hídrico (Santamaría *et al.*, 1995).

Santamaría *et al.* (1995) realizó experimentos cuyo objetivo fue determinar la capacidad que tienen las plantas cultivadas *in vitro* de *Agave tequilana* para controlar las perdidas de agua y, a su vez, examinar las respuestas de sus estomas a varios factores. En sus resultados obtuvo que en hojas separadas deshidratadas en aire de plantas micropropagadas la pérdida de agua fue similar al de las plantas cultivadas en campo; e incluso, tanto en la morfología como en la respuesta a varios factores (como oscuridad y luz, ABA y fusicoccina. De este modo, comprueba que en el

cultivo *in vitro* de plantas CAM no se afecta su capacidad de controlar las pérdidas de agua por las hojas ni altera la apertura estomática nocturna.

2.8.4. Cambios a Nivel Radicular de las Vitroplantas.

Como se mencionó anteriormente, no tan solo los cambios a nivel foliar han sido reportados como factores determinantes para el éxito de la adaptación, sino también a nivel radicular existen puntos importantes a discutir.

Grout y Aston (1977) observaron cómo tras el enraizamiento *in vitro* de sus plantas la zona de transición entre la raíz y el tallo era anormal, con unas conexiones vasculares débiles y malformadas, lo que producía problemas en la absorción y circulación desde las raíces al tallo. En otras ocasiones el problema estriba en que las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen necrosarse al transplantar las plántulas, lo que provoca una detención en el crecimiento de la planta (Debergh y Maene, 1981).

También se ha observado como las raíces formadas *in vitro* eran gruesas y con pelos radicales engrosados y anormales, siendo sus sistemas vasculares anómalos, en comparación con raíces formadas en un sustrato arenoso. En las raíces que no mueren durante el proceso de trasplante se producen nuevas raíces laterales y adventicias normales durante el proceso de aclimatación y estas ya crecen activamente. Por ello la proporción raíz: tallo siempre es más alta en plantas enraizadas *ex vitro* que *in vitro*.

El balance de agua de la planta depende también de su capacidad de incorporación de agua por sus raíces. La incorporación de agua puede limitarse por la cantidad de raíz, las características hidráulicas del medio o soporte, el potencial hídrico del medio de cultivo, su temperatura y aireación (Santamaría, 1996).

Indudablemente, la composición de los medios en la etapa de enraizamiento, particularmente el tipo y concentración del regulador de crecimiento, y las características del genotipo son dos aspectos de relevancia (Clayton *et al.*, 1990; Dabekaussen *et al.*, 1991; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Yassen-Mohamed 1995 a y b; Escobedo *et al.*, 2000 y Gaspar *et al.*, 2003. Existen especies tan benevolentes que enraízan sin la necesidad de utilizar un regulador, o bien, algunas otras que con

dosis mínimas enraízan sin mayor problema. Sin embargo, existen otras que a pesar de utilizar los reguladores más agresivos y la combinación con otros, las respuestas de enraizamiento no son favorables (Villavicencio *et al.*, 2000).

Para la etapa de adaptación es importante determinar los sitios de formación de las raíces, su ramificación y formación de raíces laterales y la velocidad de respuesta (capacidad de absorción) con el transplante; interesa un material vegetativo con raíces conectadas al sistema vascular y no directamente de los callos preformados en la base de los microbrotes. Pueden transferirse a sustrato plántulas con raíces de buena longitud, pero pueden morir en un plazo de dos semanas o menos. En algunas ocasiones esto es debido a que las raíces realmente no tienen la capacidad para cumplir su papel fisiológico.

La formación de callo en la parte basal del microbrote no es más que una acumulación de células indiferenciadas que se aglutinan amorfamente; esto es consecuencia del regulador empleado, su concentración y la síntesis endógena de auxinas, que por la naturaleza de la especie, el explante sea capaz de producir (Clayton *et al.*, 1990; Dabekaussen *et al.*, 1991; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Yassen-Mohamed 1995 a y b; y Gaspar *et al.*, 2003).

Algunos estudios han demostrado que las auxinas tienen la capacidad de provocar la diferenciación de raíces en callos y, posiblemente, las raíces pueden diferenciarse en células del callo en un material y no conectarse a los haces vasculares del tallo (Santamaría, 1996).

Se ha encontrado que al cultivar brotes *in vitro* la base de éstos puede formar callo en presencia de ácido indolbutírico (AIB), e incluso de haber diferente respuesta de desarrollo dependiendo del tipo de regulador usado. Por ejemplo, en *Opuntia* a 3 meses de transplante, se apreció mayor desarrollo de las plantas enraizadas con ácido indolbutírico que con ácido naftalenacético (ANA) (Escobar, 1985).

La distribución y longitud de las raíces son dos aspectos que repercuten en la adaptación; un material con raíces bien formadas (no excesivamente alargadas) y abundantemente distribuidas, aumentan la probabilidad de sobrevivencia; quizá por tener mayores sitios de contacto y de exploración. Hay que considerar también, que el manejo de un material con raíces demasiado largas puede ser contraproducente,

ya que su fragilidad, facilidad de rompimiento y la suberización pueden ser mayores y dificultar la correcta introducción del sistema radicular entero en el sustrato. En el enraizamiento *in vitro* debe procurarse obtener raíces bien constituidas, con las características anteriormente señaladas y, junto con estas, la formación de raíces laterales para una más rápida respuesta *ex vitro* (Villavicencio *et al.*, 2000).

Vinterhalter (1992) señala que la formación de raíces laterales esta bajo el control de las hormonas de la planta y que existen pocos datos que indiquen que la ramificación pueda ser controlada por otros factores como nutrición inorgánica o iluminación. Este investigador condujo un experimento cuyo objetivo fue inducir la formación de raíces laterales en *Dracaena fragans*. Obtuvo que la disminución de macronutrientes en el medio incrementó el porcentaje de formación de raíces laterales y el número de raíces laterales por brote. Al mismo tiempo decrecieron la longitud radicular, la distancia de penetración de la raíz a través del medio y el número de raíces adventicias primarias por brote. Sin embargo, determinó que la presencia en el medio del ión sulfato inhibió la formación de dichas raíces y la adición de nitrato de amonio sólo o en combinación con nitrato de potasio redujeron significativamente el porcentaje de raíces que forman laterales y el número de raíces laterales por brote.

En otras especies, la razón de la falta de ramificación puede ser el regulador empleado. Por ejemplo, en nopal, el aumento en la concentración de AIB provocó la inhibición de la ramificación lateral de las raíces primarias, limitando el desarrollo de éstas; después de 3 meses de desarrollo de las raíces en plantas enraizadas con AIB a 5×10^{-5} M fue menor que las enraizadas con AIB 10^{-5} M, atribuyéndose esto a la mayor superficie de absorción radical como la responsable del mejor desarrollo de las plantas (Escobar, 1985).

En algunas especies, las plántulas obtenidas *in vitro* responden inicialmente de una manera lenta, mientras que un microesqueje presenta una dinámica de crecimiento más intensa. Igualmente, la capacidad de respuesta para absorber y translocar nutrimentos es menor al principio. Esto normalmente lo atribuyen a asuntos netamente fisiológicos o metabólicos, más que a alteraciones morfológicas (Apter *et al.*, 1991b).

2.8.5. Efecto de la Fuente de Carbono en la Actividad Fotosintética.

Definitivamente, toda alteración morfológica tiene como consecuencia también una diferente respuesta fisiológica. El crecimiento del material en las condiciones que se dan *in vitro* son poco apropiadas para la fotosíntesis; por ello, el azúcar es un componente muy importante en el medio nutritivo y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Pero también la concentración de CO₂ en el tubo de ensaye o frasco puede ser un factor limitante para este proceso vital de las planta (Mendoza, 1993).

Kozai (1991) menciona que el crecimiento y desarrollo de explantes *in vitro* probablemente es mejorado más con azúcar que sin ella en las etapas más tempranas de multiplicación, aún si las condiciones *in vitro* están controladas apropiadamente para la promoción de fotosíntesis. Esto puede resultar para explantes con poca clorofila y/o poca área foliar. Así, si el azúcar es añadido solamente en la etapa temprana de multiplicación y es removida más tarde, la tasa de crecimiento más grande de plantas *in vitro* puede ser obtenida.

Santamaría (1996) menciona que se ha considerado que los explantes y las plántulas *in vitro* tienen poca o ninguna capacidad fotosintética y que requieren de azúcar como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Investigaciones recientes han demostrado que las plántulas *in vitro* por lo general tienen relativa capacidad fotosintética, que les permitirá desarrollarse en algunos casos con mayor velocidad en condiciones fotoautotróficas que bajo condiciones hetero- o mixotróficas si se les provee de los factores medioambientales, como luz, CO₂, humedad, temperatura, oxígeno, etileno, azúcar.

Kozai (1991) menciona que la presencia de azúcar en combinación con alta humedad a una temperatura constante de alrededor de 25° C parece tener varios efectos detrimentales para el crecimiento vigoroso de las plantas y sobre su protección de contaminación por bacterias y/o hongos. De este modo, reportan que Debergh y Maene (1981) propusieron el término “en vitrificación” para identificar todos los tipos de anormalidades causadas por el ambiente ecológico *in vitro*.

La humedad en el recipiente y el potencial osmótico del medio, influyen las relaciones hídricas de las plantas *in vitro*, afectando su crecimiento, desarrollo y fotosíntesis en diferentes modos (Kozai, 1991).

Durante mucho tiempo se pensó que las plantas cultivadas *in vitro* no tenían actividad fotosintética por el suplemento abundante de carbohidratos a través del medio nutritivo. Sin embargo, en recipientes semicerrados conteniendo plantas ornamentales cultivadas en un medio con sacarosa, la iluminación fue acompañada por un decremento significativo en la concentración de CO₂ (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

Las plantas que se cultivan *in vitro* presentan una estructura y funciones fisiológicas modificadas del aparato fotosintético como un resultado de las condiciones particulares: baja radiación, altos niveles de sacarosa y baja disponibilidad de CO₂. Estas condiciones pueden afectar los sucesos de aclimatación a condiciones *ex vitro* (Serret *et al.*, 1996).

Además de la composición del medio de cultivo existen otros factores que afectan la capacidad fotosintética del material vegetativo *in vitro*. En experimentos realizados en *Fragaria ananassa* y *Betula verucosa* determinaron que el tipo de lámpara tiene influencia sobre la fotosíntesis, ya que el nivel fue más alto con luz azul que con roja (Saebo *et al.*, 1991).

Desjardins (1995) resalta que dependiendo del estado de crecimiento, las plantas mostrarán diferente potencial de fijación de CO₂. Demostró que las hojas durante la etapa de aclimatación o tempranamente en la etapa de enraizamiento mostraron solamente la mitad de la actividad fotosintética.

2.8.6. Influencia de las Condiciones *in vitro* sobre la Fotosíntesis.

La morfología y crecimiento de plantas *in vitro* son influenciadas por la densidad de plantación, en particular, bajo condiciones fotoautotróficas. De acuerdo con Kozai (1991) bajo estas condiciones los explantes compiten entre sí por luz, CO₂ y sustancias inorgánicas.

Esquejes de tallo con un nudo son usados como explantes en la micropropagación heterotrófica (dependiendo de azúcar), fotomixotrófica

(dependiendo de azúcar y fotosíntesis) y fotoautotrófica (fotosintética). En la micropropagación heterotrófica, la parte frondosa del explante es removida porque no se considera importante para promover el crecimiento subsecuente de plantas regeneradas. Por otro lado, el tamaño del área foliar, peso fresco y longitud del tallo puede influenciar el crecimiento de las plantas regeneradas *in vitro*, por lo menos bajo condiciones de cultivo fotomixotrófica y fotoautotrófica. Bajo condiciones de cultivo fotoautotrófica, la parte frondosa del explante debe jugar un importante papel sobre el crecimiento subsecuente de plantas regeneradas porque éste produce carbohidratos por la fotosíntesis. Así, las diferencias en el área foliar de explantes puede afectar la tasa inicial de crecimiento y la variación en las plantas regeneradas, como afecta la tasa fotosintética durante el período temprano de cultivo. Esto demuestra que los explantes frondosos tienen alta habilidad fotosintética y que el patrón de crecimiento y características fisiológicas de explantes frondosos *in vitro* son similares a aquellos de plántulas *in vitro* sin raíces cuando crecen bajo condiciones ambientales *in vitro* idénticos (Miyashita *et al.*, 1996).

2.8.7. La Concentración de Gases y la Fotosíntesis.

a) Concentración de Etileno.

Las concentraciones de etileno y los componentes tóxicos (productos de la oxidación de fenoles) que dan al medio un color café y/o negro tienden a ser altos en algunos casos en recipientes herméticos. Generalmente, una cierta cantidad de etileno es requerido para la iniciación de órganos, pero inhibe el crecimiento de estos órganos e induce senescencia.

El etileno es producido por el cultivo de células vegetales, tejidos, órganos y plantas completas. Las diferencias en la tasa de producción de etileno *in vitro* son atribuidas al tipo de tejido, el estado fisiológico del material biológico y la naturaleza y concentración de los reguladores de crecimiento añadidos al medio nutritivo (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

Buddendorf-Joosten y Woltering (1994) aseveraron que los efectos del etileno en el crecimiento y desarrollo de las plantas son obvias: muestran epinastia, las hojas son extremadamente pequeñas y los tallos son engrosados. Paradójicamente,

también se han citado efectos positivos del etileno. En *Bromelias* suprime la dominancia apical y por ello incrementa el número de brotes axilares que se forman. También incrementó el número de yemas por bulbo-explante de *Lilium speciosum in vitro* y aumentó el desarrollo de primordios de bulbo en la base de brotes regenerados de *Tulipán*. Además observó un pico en la producción de etileno que coincidió con la iniciación de brotes laterales consecuencia de yemas axilares basales en explantes cultivados de *Rosa*. Concluyeron que el etileno promueve organogénesis (raíces y brotes) y crecimiento de meristemos de *Clavel*, protocormos de *Cymbidium*, miniesquejes de *Chrysanthemum* y *Papa*, y brotes de *Gerbera*.

Buddendorf-Joosten y Woltering (1994) reportan que el etileno ha mostrado ser un factor importante en el enraizamiento, pero los resultados experimentales son contradictorios. En algunos estudios el etileno estimula enraizamiento mientras que en otros ha inhibido o no ha tenido efecto sobre el enraizamiento. Los efectos del etileno sobre el enraizamiento probablemente dependan de la concentración y estado fisiológico de los explantes.

La acumulación de etileno y la alta concentración de iones de calcio y amonio así como de citocininas en el medio de cultivo, se han reportado que promueven la vitrificación de las plantas. Estas plantas han reducido la deposición de celulosa y lignina en su pared celular, lo cual reduce su resistencia a la presión (Santamaría, 1996).

La vitrificación es un fenómeno que se presenta en algunas especies manejadas *in vitro* y que normalmente no logran sobrevivir en la fase de adaptación. Phan y Hegedus (1986) describen este fenómeno como un desarrollo anormal que resulta en tallos numerosos con entrenudos cortos, casi inexistentes; los tallos son rechonchos, las hojas tienen amplias bases, las láminas son estrechas (curvada longitudinalmente hacia afuera) y menos clorofiladas que las hojas normales, los pedúnculos y la lámina de las hojas exhiben un aspecto translúcido y acuoso. Se han encontrado que en plantas normales la síntesis de lignina es activa y, la actividad de las enzimas envueltas en la síntesis de flavanona-chalcona es débil y estas enzimas no están activas en plantas vitrificadas (Phan y Hegedus, 1986).

b) Concentración de oxígeno.

El oxígeno, como componente de la atmósfera gaseosa también juega un papel importante. Kozai (1991) menciona que la concentración de O₂ disuelto en el medio puede afectar el crecimiento de raíces y el crecimiento de plantas *in vitro*.

Hay muy pocos reportes que mencionen la influencia de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento de la planta *in vitro*. Es de suponerse que un decremento moderado de la concentración de oxígeno no afectará el crecimiento y desarrollo de la planta. Generalmente, con el incremento de la concentración de CO₂ en los recipientes, un decrecimiento comparable de oxígeno puede esperarse. Una ventaja de la disminución de las concentraciones de oxígeno es que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias en el recipiente de cultivo. Los efectos de la concentración baja de oxígeno sobre el crecimiento de la planta *in vitro* puede (parcialmente) ser explicada por su efecto sobre la fotorrespiración. No obstante, las condiciones limitantes de oxígeno pueden resultar en la supresión del crecimiento, tal y como ocurrió con el cultivo de células de *Catharanthus roseus* (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

Las plantas C₃ creciendo fotoautotróficamente pierden el 50% del carbono fijado, debido a la activación de la fotorrespiración a concentraciones atmosféricas normales de oxígeno (21%) y 350 ppm de CO₂. La fotorrespiración es reprimida cuando decrece la concentración de oxígeno, en algunos casos a 2%, lo cual favorece la fotosíntesis. Sin embargo, no hay que olvidar que en condiciones de oscuridad, habrá que aumentar en algunos casos al 10% la concentración de oxígeno, para tener una adecuada respiración. La concentración de oxígeno en el medio de cultivo también puede afectar el crecimiento de raíces y por lo tanto el desarrollo de la plántula. Esto se puede mejorar utilizando como soporte materiales fibrosos en lugar de agentes gelificantes (Santamaría, 1996).

c) Concentración de CO₂.

Por otro lado, las plantas cultivadas *in vitro* que se les proveen de carbohidratos en el medio nutritivo, teóricamente no necesitan CO₂ y luz para la producción de materia seca. Sin embargo, existen reportes que muestran mejor crecimiento de plantas cultivadas *in vitro* bajo condiciones fotoautotróficas que bajo

condiciones con sacarosa en el medio nutritivo (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994). Además mencionan que niveles superiores a 0.3% de CO₂ han tenido efectos positivos en el crecimiento de las plantas. El enriquecimiento con CO₂ durante el cultivo *in vitro* se utiliza para promover la fotosíntesis neta con el fin de preparar a las plantas para la transferencia a suelo y su crecimiento *ex vitro*. Mencionan que las concentraciones de CO₂ que se usan para el incremento de la fotosíntesis son usualmente debajo de 0.3%. Sin embargo, hay otros reportes en los cuales se aplican concentraciones mucho más altas.

La tasa fotosintética y la tasa de transpiración de las plantas son influenciadas por la velocidad del aire (coeficiente de difusión de gases). Es probable que el crecimiento sea promovido con ventilación forzada bajo condiciones de alto CO₂, alto PPF (Photosynthetic Photon Flux) y alta humedad relativa (Kozai, 1991).

Con la intención de proteger el cultivo aséptico de la infección y para prevenir la deshidratación de la planta y del medio nutritivo, el cultivo *in vitro* se lleva a cabo en contenedores cerrados, restringiendo el intercambio de gases entre la atmósfera del contenedor y el aire exterior, por lo que la composición de la atmósfera gaseosa puede afectar el crecimiento y desarrollo de plantas y explantes como lo refieren Buddendorf-Joosten y Woltering (1994).

Los factores más importantes que afectan la acumulación de gases son el tipo y cantidad de material vegetativo, las propiedades físicas del contenedor y material sellador, los componentes del medio nutritivo y aspectos macroclimáticos como: temperatura, ventilación e intensidad lumínica.

Los componentes gaseosos producidos por el material vegetativo, el medio nutritivo o el material del contenedor pueden acumularse en el interior del recipiente. Se ha observado que el tipo de recipiente y particularmente el tipo de sello pueden tener efectos significativos sobre la apariencia y el desarrollo de las plantas (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

Además del CO₂, etileno y oxígeno está pendiente por mencionar que existen otros componentes que pueden influenciar el crecimiento y desarrollo de la planta y están presentes en el ambiente gaseoso, como etanol, acetaldehído, etano, acetona, propileno, propano, metanol, y butano; tal y como han sido encontrados en algunas

especies como *Cerezo*, *Arroz*, *Zanahoria*, *Phoenix dactylifera*, *Gerbera* y *Prunus* (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994).

2.8.8. Micropropagación Fotoautotrófica.

En micropropagación fotoautotrófica, durante el día se puede mejorar el balance de incorporación de CO₂ bajando la temperatura del aire durante el período de oscuridad. La producción de CO₂ durante la respiración es generalmente reducida a bajas temperaturas, lo cual da un incremento neto de mayor incorporación de CO₂ por día (Kozai, 1991; Santamaría, 1996).

El crecimiento bajo condiciones fotoautotróficas puede ser estimulado con el enriquecimiento de CO₂ en combinación con altas intensidades lumínicas. Debido a las bajas concentraciones de CO₂ observados durante el período luminoso, Buddendorf-Joosten y Woltering (1994) concluyeron que las plantas *in vitro* son aparentemente activas fotosintéticamente. Sin embargo, cuando el azúcar está presente en el medio, las plantas no desarrollan fotoautotrofía, lo cual puede causar un lento crecimiento y en algunos casos un alto porcentaje de muertes durante la aclimatación (Kozai, 1991).

Para obtener plantas que sean capaces de desarrollarse de manera fotoautotrófica y crecer en un medio libre de azúcar, la concentración del CO₂ y la intensidad y calidad de luz en los cuartos de cultivo deben mejorarse. Aunado a esto, las plantas deben ser capaces de sobrevivir a baja humedad relativa, regulando su transpiración (Santamaría, 1996).

La absorción de excesiva energía luminosa por las hojas se ha reconocido como una fuente de daño no solamente en el campo, sino también *in vitro*. Adicionalmente, la combinación de alta luz y altas temperaturas puede tener un efecto sinérgico sobre el desarrollo de la fotoinhibición. Durante la micropropagación la baja concentración de CO₂ dentro de tubos sellados se pueden alcanzar en unas cuantas horas con luz (Kozai, 1991), el cual puede también estimular fotoinhibición. Efectivamente, la reducida disponibilidad de CO₂ puede afectar consecuentemente el transporte de electrones por el limitado consumo de poder asimilatorio (Serret *et al.*, 1996).

Algunas investigaciones han revelado que los explantes/plantas clorofiladas tienen relativamente una alta habilidad fotosintética y que pueden crecer más rápido en algunos casos bajo condiciones fotoautotróficas que bajo condiciones hetero- o mixotróficas, con tal que los ambientes *in vitro* físico y químico estén propiamente controlados para fotosíntesis. La micropropagación fotoautotrófica o simplemente micropropagación autotrófica es definida como un método de propagación basada en el cultivo fotoautotrófico de tejidos con todo el carbono del CO₂, en este tipo de cultivo el crecimiento y desarrollo son grandemente influenciados por los factores ambientales físicos que incluyen luz, CO₂, humedad, velocidad de flujo del aire, temperatura, oxígeno, etc.

Kozai (1991) menciona que de acuerdo con los resultados experimentales las siguientes suposiciones podrían hacerse para explantes/plantas clorofílicas que son cultivadas *in vitro* por la micropropagación convencional: (1) los explantes/plantas tienen habilidad fotosintética. (2) su fotosíntesis está restringida por bajas concentraciones de CO₂ durante el fotoperíodo. (3) son forzadas para desarrollar hetero- o mixotrofia y un PPF más alto que no incrementará las tasas fotosintéticas netas bajo tales condiciones de bajo CO₂. (4) las plantas pueden desarrollar fotoautotrofia y crecer más rápido bajo condiciones fotoautotróficas, alto CO₂ y alto PPF que bajo condiciones de hetero- o mixotróficas. (5) la tasa de crecimiento inicial es más grande para un explante con un área más grande de tejido (hojas) altamente clorofiladas. En orden de confirmar estas suposiciones experimentales necesitamos conocer las curvas de respuestas fotosintéticas (las tasas fotosintéticas netas como una función de la concentración de CO₂ y PPF) de las plantas *in vitro*.

Además de la reducción en los costos de producción, la micropropagación fotoautotrófica presenta las siguientes ventajas: promoción del crecimiento de plantas *in vitro* y *ex vitro* por medio del control ambiental, una tasa más alta de multiplicación, un más alto porcentaje de sobrevivencia, una reducción en la contaminación biológica, utilización de recipientes de cultivo más grandes, una reducción en los costos de la labor mediante un manejo manual simplificado y automático y la simplificación de todo el proceso de micropropagación (Kozai,1991).

Finalmente, la expansión de la micropropagación para especies agrícolas, forestales y hortícolas requiere de una reducción de costos de producción de cerca de 90% (Kozai, 1991). La eliminación de la necesidad de la aclimatación, el aumento de la habilidad fotosintética de las plántulas, la simplificación del medio de cultivo y el uso de invernaderos de bajo costo, pueden contribuir significativamente a la reducción de los costos. El uso de la micropropagación fotoautotrófica es uno de los métodos posibles en los cuales el sistema de micropropagación futura debiera de basarse en obtener plantas a bajo costo y más cercanas a las obtenidas en forma natural (Santamaría, 1996).

2.9. Recomendaciones para mejorar la adaptación *ex vitro* de plantas.

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido en condiciones *in vitro* expuestas a un microambiente controlado sometidas a condiciones mínimas de estrés, tienen que adaptarse a las condiciones *ex vitro*, donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas.

El crecimiento *ex vitro* es autotrófico y no heterotrófico como en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario reconstruir y desarrollar los sistemas adaptativos como lignificación, cubiertas cuticulares, estomas y estructuras fotosintéticas.

Todas estas deficiencias o disfunciones provocadas por o durante la incubación *in vitro* es necesario corregirlas de forma gradual, e incluso comenzar la adaptación en condiciones *in vitro*, induciendo fotoautotrofia *in vitro* mediante incrementos de la tasa de CO₂ y de irradiancia en los contenedores de cultivo, con objeto de mejorar la calidad de la planta, los niveles de producción y los costos del proceso de micropropagación.

Buddendorf-Joosten y Woltering (1994) señalaron que la estimación de la fotosíntesis durante el cultivo *in vitro* puede ser útil para mejorar el crecimiento de la planta y la sobrevivencia después de transferir del cultivo *in vitro* a suelo y otra posibilidad es estimular la fotosíntesis durante el período de aclimatación *ex vitro*.

Serret *et al.* (1996) indican que al aumentar la habilidad fotosintética en plantas *in vitro* puede mejorar las condiciones de crecimiento en los tubos de cultivo y

aclimatación a condiciones *ex vitro* (Kozai, 1991) y generalmente es aceptado que cambiando los factores medioambientales tales como el nivel de sacarosa en el medio, alta intensidad o concentración de CO₂, puede afectar el desarrollo de las características fotosintéticas (fotoautotrofia) *in vitro*.

Todos los factores que influyen negativamente en lo que respecta a la raíz (zona de transición entre raíz y tallo anormal, conexiones vasculares débiles y malformadas, defectuosas, carecientes de pelos radicales y que suelen necrosarse) que traen problemas en la absorción y circulación desde la raíz al tallo; hacen que muchos de los laboratorios que trabajan produciendo plantas *in vitro*, no realicen el enraizamiento de los brotes *in vitro*, al resultar problemático, difícil y caro, ya que se estima que implica un costo de entre el 35 a 75% del costo total de la micropropagación. Por supuesto, no es posible generalizar, ya que la elección del método de enraizamiento va a depender totalmente de la especie y de sus características: porcentajes de enraizamiento y supervivencia final, que varían enormemente de unas especies a otras. Así, cuando el enraizamiento y aclimatación se pueden realizar simultáneamente, sin que haya demasiada pérdida de plantas, tanto los costos como la eficiencia de la producción se ven muy favorecidos.

Algunos investigadores han propuesto una técnica híbrida, que combina las ventajas del enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*. Para ello los brotes son incubados inicialmente en un medio estéril que incluye hormonas para la inducción de raíces, y azúcares, durante un periodo de 3 a 7 días, para la inducción-inicio de las raíces. Esto se puede hacer en un medio sólido o líquido normalmente en oscuridad. Luego el material es repicado en un medio no estéril, o incluso transplantado a tierra, para la fase de elongación y desarrollo de las raíces, mejorándose de esta forma en muchos casos el resultado final de aclimatación y supervivencia.

Algunos investigadores proponen realizar el enraizamiento y la aclimatación simultáneamente, transplantando los brotes directamente en el campo, después de una etapa previa de endurecimiento *in vitro*: tras la inducción del enraizamiento, las plantas aún en condiciones *in vitro* eran sometidas a una elevada intensidad luminosa, un fotoperíodo más corto y una temperatura inferior a la normal, durante un par de semanas. Esto favorecía la lignificación y el desarrollo cuticular y estomático

del material y permitía su trasplante directo al campo en condiciones controladas de humedad, luz y nutrientes (Minitunel).

Enríquez (1994) trabajó sobre la micropropagación y aclimatación de *Neolloydia* ssp. Los tallos con raíz y los tallos sin raíz producidos *in vitro* aseguran en la aclimatación un 100% de sobrevivencia al ponerlos a secar en incubadora por tres días en caja petri y después tratarlos con AIB por 5 segundos a una concentración de 50 mg L^{-1} , para después sembrarlos en maceta. Este tipo de tratamiento aseguró un crecimiento uniforme de tallos y raíces a los 60 días.

Vinterhalter (1992) reconoce que al forzar la formación de raíces laterales facilita la adaptación de plantas enraizadas a condiciones *ex vitro* y promueve su crecimiento en invernadero.

Dentro de los recipientes de cultivo la humedad relativa (H. R.) generalmente es muy alta, reducir este efecto podría ser una importante herramienta para mejorar la calidad de la planta. Para unas cuantas especies una baja H. R. permite que las plantas sobrevivan a la transferencia *ex vitro* más fácilmente (Maene y Debergh, 1983).

Varios procedimientos de aclimatación que se han sugerido para aumentar la tasa de sobrevivencia, son: (a) el enfriamiento de la base del medio de cultivo utilizando charolas heladas, para condensar el vapor de agua sobre el medio y bajar la H. R. medioambiental dentro de la vasija de cultivo; (b) vasijas de cultivo con filtros de aire insertados que reduce la humedad interna del aire de la vasija de cultivo, lo cual ha incrementado la resistencia a desecación (Santamaría, 1996).

2.10. Transferencia de las Vitroplantas a Sustrato.

En esta etapa se considera como plántula aquella que presenta raíces bien formadas.

Un alto porcentaje de las especies manejadas por esta técnica deben pasar por la etapa de enraizamiento, aunque en la actualidad se procura prescindir de ella con el fin de reducir los costos de producción. Esta forma de manejo da mayor confiabilidad para el éxito en la etapa de aclimatación, siempre y cuando el material vegetativo haya sido colocado correctamente en el sustrato.

El procedimiento de transferencia a sustrato o transplante consiste en el humedecimiento del mismo y su perforación con un instrumento puntiagudo. Este a su vez servirá para ayudar en la introducción cuidadosa de las raíces por medio del orificio y posteriormente asentar el sustrato para que sea posible el sostenimiento de la plántula. El acomodamiento de las raíces en el sustrato es una labor de importancia ya que los errores repercuten en los bancales de adaptación.

Es preferible recibir material con un sistema radicular poco desarrollado que uno con raíces demasiado largas, ya que éstas dificultan y retrasan la labor de transplante y esto no deja de ser riesgoso puesto que existen especies cuyas raíces se han alargado demasiado, éstas se presentan muy frágiles y tienden romperse con facilidad. Una longitud de 1 a 2 cm es suficiente para que las vitroplantas respondan favorablemente.

En ocasiones las raíces por tener contacto con el fondo del recipiente tienden a “abrirse” en sentido contrario y pueden dificultar su acomodamiento. Sin embargo, las pinzas de disección facilitan su sujeción e introducción al sustrato.

Durante la colocación en el sustrato es conveniente asperjar agua con un atomizador para evitar la deshidratación aérea de las plántulas.

El contenido de humedad del sustrato que recibirá al material vegetativo es importante. Cuando el sustrato no está lo suficientemente húmedo la introducción de la herramienta no permite formar el orificio íntegramente y el acomodamiento de las raíces se dificulta.

El asentamiento del sustrato, una vez acomodada la plántula, es una labor relevante; particularmente en aquellas especies, como helecho y violeta africana, cuyo sistema radicular es pequeño y delgado, por lo que es preciso asentar adecuadamente el sustrato para propiciar un contacto íntimo con las raíces de la vitroplanta.

2.10.1. Características del sustrato.

Este es un factor de gran relevancia. La sobrevivencia y velocidad de crecimiento de las vitroplantas dependen grandemente de las características físicas y químicas del sustrato, junto con sus interrelaciones biológicas.

Entre las características generales que se pretenden en los sustratos que sirvan para los fines de adaptación se tienen:

- a) Un sustrato fino a microgranulado que permita en él la introducción, colocación y fijación de la plántula o microesqueje. Partículas mayores de 4 mm dificultan el transplante, el agua drena demasiado rápido y no sostienen adecuadamente el brote, especialmente cuando se trata de microesqueje.
- b) Buena cohesión. Esto es, que la unión de sus partículas permita la formación del orificio central cuando se va a transplantar y el cepellón mantenga su integridad al momento de la extracción de la plántula del contenedor.
- c) Buena porosidad y drenaje, pero suficiente retención de humedad (de acuerdo con las necesidades de cada especie).
- d) Que no reaccione negativamente con el paso del tiempo ni con la adición de materiales o sustancias exógenas (fertilizantes, por ejemplo).
- e) Un sustrato que pueda ser útil para la mayor cantidad de especies posibles.
- f) Sustrato compuesto por materiales de fácil adquisición.
- g) Sustrato que tenga el mas bajo costo posible.

Las características fisicoquímicas de un sustrato útil para fines de plantas micropropagadas pueden apreciarse en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Características fisicoquímicas de un sustrato útil.

Retención de agua	40 a 50%
Drenaje	0.8 a 1.1 cc/min
Aireación	10 a 20%
Densidad Real	0.6 a 1.2 cc
Estabilidad de la Estructura	40 a 50%
Retención de Nutrientos	75 a 190 meq./100 gr.
Conductividad Eléctrica	< 1.75 mmhos/cm
Potencial Hidrógeno (pH)	5.5 a 6.5

2.10.2. Desinfectación del Sustrato.

El uso de un sustrato biológicamente limpio es una condición en esta etapa, para lograrlo podemos recurrir a métodos físicos y químicos:

Dentro de los métodos físicos tenemos a la pasteurización y la esterilización. La primera se efectúa mediante la generación de vapor de agua y una temperatura de entre 70 y 80° C durante un tiempo de 40 a 60 minutos, teniendo con esto un sustrato altamente confiable. La completa eliminación de microorganismos se logra con la esterilización mediante el uso de autoclave, en las cuales la temperatura que se alcanza es de 120° C en un periodo de tiempo de 30 a 45 minutos.

Químicamente el sustrato puede tratarse. Uno bien conocido es el Bromuro de Metilo, aunque existen algunos reportes que no lo recomiendan por la fitotoxicidad que ocasionan los residuos del producto que llegan a quedar en el sustrato. También hay otros productos que se pueden utilizar para esterilizar sustratos como, Cloropicrina, Vapam y Formol, entre otros.

Funguicidas como el PCNB y Captán (+ terramicina agrícola) también pueden ser agregados al momento del humedecimiento del sustrato previo al llenado de contenedores o una vez rellenos éstos.

Está claramente establecido que las vitroplantas adquieren una mejor presentación en cuanto tengan un sustrato con buenas características fisicoquímicas. Se observa con claridad el efecto del sustrato sobre la supervivencia, tiempo de enraizamiento *ex vitro*, crecimiento longitudinal y ramificación de la raíz y el vigor de la planta.

Una buena combinación y proporción de los diferentes materiales que compongan el sustrato, aunado a una buena programación y dosificación de la fertilización, prácticamente garantizan una buena calidad de plántulas.

Cuando se prepara el sustrato normalmente se piensa en tres tipos de materiales: (1) aquel que posee una buena riqueza nutrimental, (2) el que mejora las características físicas (porosidad, aireación, drenaje) y, (3) el que da volumen (para moderar el costo del sustrato).

Para la fase de adaptación pueden utilizarse una gran variedad de materiales, de tipo orgánico e inorgánico. Por ejemplo, tezontle fino, tepojal, polvillo de coco, perlita, tierra de hoja molida, peat moss, vermiculita, bagazo de caña de azúcar molido, cascarilla de arroz, arena, aserrín, tierra de banco, atocle, etc. Algunos materiales que se emplean en viverismo son de desecho o residuos industriales que abundan en la región. En la actualidad se comercializan una gran variedad de sustratos premezclados para diferentes propósitos. Muy comunes son los preparados a base de peat moss junto con diferentes materiales adicionales como perlita, vermiculita, corteza de pino, poliestireno, fertilizantes iniciadores, etc., pero resultan muy costosos. Con la intención de reducir los costos se hacen combinaciones y sustituciones de materiales.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Localización del experimento.

El presente trabajo se realizó en dos lugares diferentes; en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicado en la carretera 57 Saltillo-México, donde se realizaron las pruebas sobre inducción de brotes y en el Invernadero Sierra Alta ubicado en la carretera a La Carbonera, donde se realizaron las pruebas sobre aclimatación de plántulas.

3.1.1. Características del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

El laboratorio de cultivo de tejidos esta conformado por 4 áreas de trabajo distintas:

- a) **Área de lavado:** En esta área se hace la limpieza del material utilizado en las demás áreas del laboratorio, contando además con el siguiente equipo: Autoclave, Destilador y Deionizador de agua.
- b) **Área de preparación de medios:** En ésta se preparan distintos medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio; contando con reactivos y sustancias para su realización así como, equipos; Balanza analítica, Potenciómetro, Agitadores magnéticos, Microondas y Refrigerador.
- c) **Área de siembra:** Se realiza el establecimiento *in vitro* y subcultivo de diferente material vegetativo dentro de una campana de flujo laminar que permite trabajar bajo condiciones de asepsia.
- d) **Área de incubación:** El área de incubación es un lugar con ambiente controlado, en donde se hacen crecer los diferentes explantes establecidos en tubos, frascos y envases de capacidad variable que son colocados en anaqueles con lámparas de luz artificial bajo una temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C y fotoperíodo de 16 horas luz.

3.1.2. Características del invernadero Sierra Alta.

El invernadero Sierra Alta, es un complejo de invernaderos que se dedican a la producción de diferentes tipos de plantas de ornato que comercializan en el centro

de la Republica mexicana. Las plantas que se propagaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales fueron llevadas a una nave que cuenta con un sistema de aclimatación, conformado por un sistema de riego, fertilización, temperatura y humedad relativa controlado.

3.2. Procedimiento experimental.

3.2.1. Inducción de Brotes.

Se utilizaron plántulas germinadas *in vitro*, las cuales fueron subcultivadas cada cuatro semanas en un medio base hasta que alcanzaron una altura deseable (15 mm). Dichas plántulas se fraccionaron obteniendo 4 explantes a los que se les eliminó el segmento apical, estableciendo 4 explantes por frasco gerber con 20 ml de medio, los cuales se transfirieron al cuarto de incubación con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a temperatura de 25 ± 2 ° C y una intensidad lumínica de 4 000 lux empleando lámparas fluorescentes de luz blanca.

3.2.1.1. *Astrophytum myriostigma* Lem.

Mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 X 2 X 2 se evaluaron 4 tratamientos, considerando las citocininas (BA y Kin) como factor A, dos niveles de concentración de citocininas (11.05 y 22.1µM BA y 11.61 y 23.23 µM Kin) como factor B y dos niveles de auxina (1.23 y 2.46 µM de AIB) como factor C en relación 10:1. En total se tuvieron 4 tratamientos 2 para cada una de las citocininas. Por tratamiento se consideraron como repetición 4 explantes por frasco con 20 ml de medio de cultivo, estableciendo 20 repeticiones por cada tratamiento.

3.2.1.2. *Turbincarpus knuthianus* Boed.

Mediante un diseño experimental completamente al azar, se evaluó el efecto de seis concentraciones de BA (0.0, 6.63, 11.05, 22.1, 33.15 y 44.2 µM), combinadas en relación 10:1 con seis concentraciones de AIB (0.0, 0.74, 1.23, 2.46, 3.69 y 4.90 µM). Se tuvieron un total de 6 tratamientos cada uno con 8 repeticiones, considerando un frasco con 20 ml de medio de cultivo con 4 explantes como una repetición.

3.2.1.3. Parámetros evaluados.

Después de seis semanas se realizó un subcultivo a medio fresco y se cuantificó el número de brotes por explante y altura de los mismos.

3.2.2. Enraizamiento *in vitro*.

Después de cuantificar el número de brotes y la altura de los mismos, estos se subcultivaron en medio fresco sin fitohormonas donde enraizaron y alcanzaron la altura requerida para su aclimatación.

3.2.3. Aclimatación de plántulas.

En esta fase interesan plantas con porte fisonómico, buena altura, diámetro y con sistema radicular, seleccionando aquellas que presentaron una altura promedio entre 10 a 20 mm (Figura 2).



Figura 5. Plantas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales listas para aclimatar.

3.2.3.1. Pre-tratamiento de las plántulas (Laboratorio).

Estas se llevaron a la sala de lavado, donde se extrajeron de los recipientes y con agua corriente se les quitó con cuidado los residuos de medio de cultivo. Posteriormente se sumergieron en una solución desinfectante que se mantuvo en constante agitación, en donde se colocaron las plantas de las tres especies durante 15 minutos, después se dejaron escurrir y aplicó un enraizador en el área rizógena. Las plantas así preparadas se colocaron y cubrieron con una toalla húmeda para evitar la deshidratación y así poder trasladarlas desde el laboratorio hasta el invernadero.

3.2.3.2. Preparación de sustratos.

En el invernadero se prepararon las mezclas de sustratos deseados (Cuadro 2); estos ya estaban previamente estériles, además de que unos son comercialmente estériles, se hicieron las combinaciones tratando de proporcionar buena cantidad de materia orgánica, porosidad y retención de humedad. Las mezclas de sustrato se colocaron en charolas de 72 cavidades a las que se les dio un riego previo al establecimiento de las plantas.

Cuadro 2. Combinaciones de Sustratos para cada Tratamiento.

Tratamiento	Componentes de cada sustrato
T1	Peatmoss (75 %) + Agrolita (20 %) + Humus (5 %)
T2	Suelo Orgánico (75 %)+ Agrolita (20 %) + Humus (5 %)
T3	Suelo Arenoso (75 %) + Agrolita (20 %) + Humus (5 %)
T4	Arena fina (75 %) + Peatmoss (20 %) + Humus (5 %)
T5	Gravilla (75 %) + Peatmoss (20 %) + Humus (5%)

3.2.3.3. Establecimiento de las plantas.

En el invernadero se hizo el transplante de las plántulas en los diferentes sustratos, estableciendo una planta por cada cavidad de la charola (Figura 3). El riego de las plantas se realizó diariamente durante los primeros cinco días, luego éste estuvo sujeto al comportamiento de las plantas en los diferentes sustratos; realizándose cada tercer día, para evitar la pudrición de las mismas por exceso de humedad en el suelo o bien por una contaminación con hongos. Una planta correspondió a un individuo, al que se le estuvo midiendo su altura y supervivencia. Las poblaciones de plantas de las tres especies se llevaron en diferentes fechas al invernadero en cantidad variable (Cuadro 3), debido a que se fueron sacando conforme se tenían listas en el Laboratorio. Estas plantas fueron establecidas en los sustratos en los que se deseaban estudiar su comportamiento.

Cuadro 3. Número de plantas por especies en los diferentes tratamientos.

Trat. Esp.	T1	T2	T3	T4	T5
S1	72	72	72	72	110
S2	120	120	65	65	-----
S3	-----	-----	-----	105	100

S1= *A. myriostigma*; S2= *T. knuthianus*; S3= *T. lophophoroides*

3.2.3.4. Parámetros evaluados.

En esta fase los parámetros que se evaluaron fueron: el porcentaje de supervivencia y la altura de plantas cada 15 días después del establecimiento en las charolas.

3.3. Análisis Estadístico

Los datos generados en cada experimento, se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento GLM del Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 1988), empleando los cuadrados medios del error, respectivas significancias obtenidas del análisis de varianza, así como las medias obtenidas para en caso necesario aplicar la prueba de comparación de medias (Tukey ($P \leq 0.05$)).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Inducción de Brotes en *Astrophytum myriostigma* Lem.

Los resultados del análisis estadístico muestran diferencias altamente significativas ($P(\alpha \leq 0.01)$) entre tratamientos en cuanto al número de brotes obtenidos (Cuadro 12 Apéndice), registrando en promedio 4.1 brotes por explante, y diferencias significativas ($P(\alpha \leq 0.05)$) en la altura de los mismos (Cuadro 12 Apéndice), obteniendo brotes con altura media de 2.9 mm (Cuadro 4, Figura 6).

4.1.1. Número de Brotes.

En ambos tipos de citocinina y concentración se encontraron diferencias, siendo los tratamientos con Kin los generaron mejor respuesta en número de brotes que los tratamientos donde se utilizó BA. A pesar de que ambas concentraciones de Kin generaron un número estadísticamente igual en número de brotes, el tratamiento con 23.23 μM de Kin

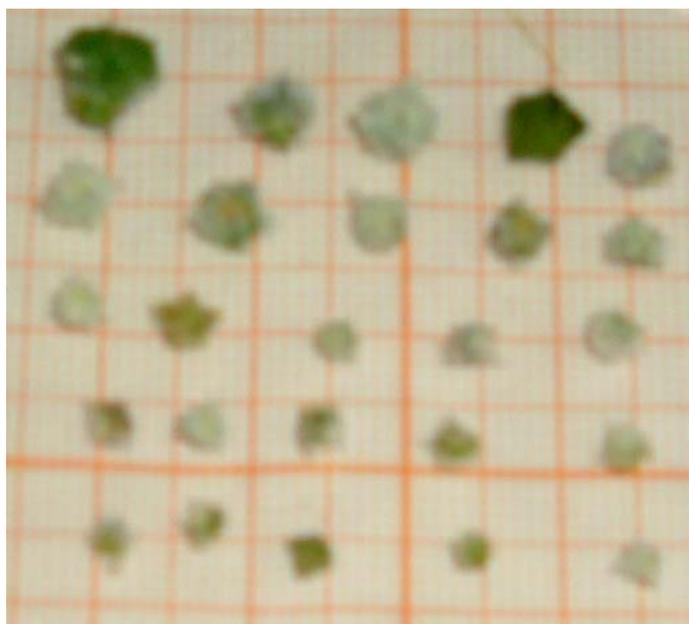


Figura 6. Inducción de brotes en *A. myriostigma* Lem.

es del que se obtuvo mejor respuesta generando hasta 4.4 brotes por explante. Un efecto contrario ocurrió con su homólogo adicionado con 22.1 μM de BA del que se obtuvo la media más baja (3.6 brotes por explante) (Cuadro 4).

Los tratamientos adicionados con 11.05 μM de BA y 11.61 μM de Kin, fueron estadísticamente iguales generando 4.2 brotes por explante (Cuadro 4). Con esta especie se han obtenido de 6 hasta 12 brotes por explante utilizando secciones basales o laterales y con secciones apicales de 5 hasta 16 brotes por explante (Villavicencio, 1998; Villavicencio *et al.* 2000, 2002; Jiménez *et al.* 2001; Ortiz *et al.* 2003). En este trabajo se utilizaron segmentos tomados de las costillas de la planta, lo que implica obtener hasta 16 brotes por planta, dado que de cada planta

fraccionada se obtienen 4 explantes, los cuales generan cada uno 4.4 brotes (Figura 6).

Existieron diferencias entre el tipo de citocinina y concentración utilizada para la inducción de brotes. Con Kin se encontró que el número de brotes aumenta al incrementar la concentración de esta fitohormona; en cambio, con BA sucede un efecto inverso (Cuadro 4). Esto demuestra lo reportado por Clayton *et al.* (1990); Dabekaussen *et al.* (1991); Rodríguez-Garay y Rubluo, (1992); Yassen-Mohamed (1995 a y b); y Gaspar *et al.* (2003) quienes mencionan que el efecto citocinínico depende no solo del tipo de explante sino también de la fitohormona y concentración que se utilice y de la concentración de sales del medio de cultivo. Al utilizar una baja concentración de BA (11.01 μM) se genera un número mayor de brotes; a diferencia de Kin en donde para generar este mismo tipo de efecto se requiere duplicar la concentración (23.23 μM) (Cuadro 4). Estos resultados muestran que la BA es una fitohormona que tiene mayor poder citocinínico que la Kin requiriendo menores niveles de concentración para generar un respuesta, como lo han reportado (Villavicencio *et al.* 2000). Sin embargo, con una concentración alta de Kin el número de brotes aumenta.

Al comparar el efecto de ambas citocininas (BA y Kin) en la inducción de brotes, se encontró que los tratamientos con Kin tuvieron mejor efecto citocinínico en la inducción de brotes que los tratamientos con BA (Cuadro 4). Esta misma respuesta se obtuvo para el género *Turbinicarpus*, en donde se encontraron resultados significativos con 1 mg L⁻¹ de Kin sobre 3 mg L⁻¹ de BA en la inducción de brotes, registrando un promedio de 3.04 y 2.54, respectivamente (Escobedo *et al.*, 2000).

Cuadro No. 4. Comparación de Medias para Número y Altura de Brotes en *A. myriostigma* Lem.

Citocinina	Concentración (μM)	Tratamientos	N. B.	A. B.
BA	11.05	T1	4.2 a	2.8 ab
BA	22.1	T2	3.6 b	2.6 b
Kin	11.61	T1	4.2 a	2.9 ab
Kin	23.23	T2	4.4 a	3.1 a
Media			4.1	2.9

Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P(\alpha \leq 0.05)$); N. B.= Núm. de Brotes; A. B.= Altura de Brotes.

4.1.2. Altura de Brotes.

El poder citocinínico de ambas fitohormonas tuvo un efecto sinergista entre el número de brotes y la altura de los mismos, generando la misma tendencia, es decir, la altura de brotes generados con Kin aumentó al aumentar la concentración, como también ocurrió con la variable número de brotes, siendo el tratamiento con 23.23 μM el que resultó con una altura superior (3.1 mm) al resto de los tratamientos evaluados (Figura 6). Una tendencia opuesta ocurrió con BA, en donde, la altura de los mismos disminuyó al incrementarse la concentración de esta fitohormona, siendo el tratamiento adicionado con 11.1 μM de BA (T1) estadísticamente igual a su homólogo adicionado con Kin (T1) registrando una altura de 2.8 mm (Cuadro 4).

Estos resultados muestran que la altura de los brotes generados con BA son menores a los generados con Kin, por lo que podemos decir que en un esquema de micropropagación el uso de Kin puede ser más efectivo.

4.2. Inducción de Brotes en *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencias altamente significativas ($P(\alpha \leq 0.01)$) entre tratamientos para la variable número de brotes obtenidos y no muestran diferencias significativas entre tratamientos para la altura de los mismos (Cuadro 14 Apéndice), registrando en promedio 6.0 brotes por explante, con un altura media de 4.0 mm (Cuadro 5, Figura 7).

4.2.1. Número de brotes.

Los resultados muestran que el número de brotes aumenta al incrementar la concentración de fitohormonas, siendo con la concentración de 22.1 μM de BA en donde se obtiene mayor respuesta, generando 6.04 brotes por explante (Figura 7). Al aumentar la concentración de fitohormonas al doble, el número de brotes disminuye (4.9 brotes por explante) (Cuadro 5).



Figura 7. Inducción de brotes en *T. knuthianus* Boed.

La tasa de multiplicación registrada con el tratamiento T4 es superior a la reportada para *T. valdezianus* especie que pertenece al mismo género, en donde con un tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BAP se obtuvo la mayor inducción de brotes; 3.04 brotes por explante (Escobedo *et al.*, 2000). Esta producción es inferior a la obtenida con *T. knuthianus* mostrando que la respuesta morfogénica depende del genotipo y del tipo de tratamiento que se utilice, como lo reportan Clayton *et al.* (1990); Dabekaussen *et al.* (1991); Rodríguez-Garay y Rubluo, (1992); Yassen-Mohamed (1995 a y b); Villavicencio *et al.* (2000) y Gaspar *et al.* (2003).

4.2.2. Altura de brotes.

En la altura de brotes, los resultados obtenidos por el análisis de varianza no muestran diferencia significativa entre los tratamientos (Cuadro 14 Apéndice), manteniéndose una altura promedio de brotes superior a 4 mm (Cuadro 5, Figura 7).

Cuadro No. 5. Comparación de Medias para Número y Altura de Brotes en *T. knuthianus* Boed.

Concentración BA (μM)	Tratamiento	N. B.	A. B.
0.0	T1	6.24 a	4.25 a
6.63	T2	5.65 abc	4.15 a
11.05	T3	5.46 bc	4.32 a
22.1	T4	6.04 ab	4.03 a
33.15	T5	5.13 c	4.12 a
44.2	T6	4.90 c	4.15 a
Media		5.57	4.17

Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P(\alpha \leq 0.05)$); N. B.= Núm. de Brotes; A. B.= Altura de Brotes.

La tasa de multiplicación (número de brotes/explante) de *A. myriostigma* y *T. knuthianus* fue similar a la reportada para otros géneros como: *Escobaria*, *Pediocactus*, *Sclerocactus* (Clayton *et al.*, 1990); *Ariocarpus* (Olguín, 1994); *Coryphantha*, *Echinocereus*, *Mammillaria* (Perez-Molphe *et al.*, 1996) y *Wilcoxia* (Escudero *et al.*, 1996). Con base en lo anterior podemos decir que el número de brotes fue alto, si consideramos que por métodos convencionales la tasa de multiplicación es limitada debido a que la semilla tiene bajo porcentaje de germinación y el crecimiento de las plántulas es lento, como lo refieren Hubstenberger *et al.* (1992).

La diferencia entre géneros pudo deberse al nivel endógeno de auxinas y citocininas que presentó cada una de ellas y al grado de letargo de los meristemas preexistentes en las yemas axilares. Este efecto también se ha encontrado en otros géneros cultivado *in vitro* como: *Opuntia* (Escobar, 1985; Yassen-Mohamed *et al.*, 1995a); *Escobaria*, *Pediocactus* (Clayton *et al.*, 1990) y *Mammillaria* (Vyskot y Jara, 1984; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), en donde unas especies respondieron mejor que otras.

En esta investigación se utilizó la relación citocinina-auxina 10:1, porque ha dado buenos resultados tanto en estos géneros como en otros, como lo reporta Starling (1985) en *Leuchtenbergia sp.*; Pérez-Molphe *et al.* (1996) en *Ferocactus sp.* y *Mammillaria sp.*

4.3. Aclimatación en *A. myriostigma* Lem.

4.3.1. Porcentaje de Supervivencia.

En el análisis de varianza realizado se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 13 Apéndice); siendo el tratamiento T4 el sustrato del que se obtuvo una mayor supervivencia (99.0%) de las plantas durante la aclimatación; sin embargo, las plantas no presentaron buena calidad reflejada en su conformación (Cuadro 6). Reportes similares en el porcentaje de supervivencia del mismo género fueron encontrados por Vyskot y Jara (1984); Martínez (1994) y Jiménez *et al.* (2001) en la adaptación de plántulas a condiciones de invernadero, con la utilización del sustrato peat moss, obteniendo 80, 95% y 100 de supervivencia en la aclimatación, respectivamente.

Durante la aclimatación, los sustratos de los tratamientos T3 y T5 fueron estadísticamente iguales registrando una media de 94 y 89%, respectivamente (Cuadro 6, Figura 8); sin embargo, por la composición de ambos sustratos se observó que a las 8 semanas de aclimatación en el sustrato compuesto por gravilla, peat moss y humus presentó una mayor mortalidad de las plantas, debido a que este sustrato presentaba poca capacidad de retención de humedad y nutrientes afectando el desarrollo de las plantas, comportamientos similares fueron encontrados por Vyskot y Jara (1984) en *M. prolifera*, *Trichocereus spachianus* y por Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) en *Aztekium ritteri*, obteniendo 80 y 90% de supervivencia, respectivamente.

En los sustratos con alta capacidad de retención de humedad, como en los tratamientos T1 y T2, se registró un bajo porcentaje de



Figura 8. Plantas de *A. myriostigma* Lem. aclimatadas en el sustrato T3.

supervivencia de las plantas siendo de 75 y 81%, respectivamente (Cuadro 6); en otros trabajos Hernández (1994) en *Melocactus bellavistensis* y Ault y Blackmon (1987) en *Ferocactus acanthodes*; utilizaron sustratos con características similares elaborado con turba, vermiculita, dolomita, agente humectante y agrolita en una proporción 4:1 y, peat moss y corteza de abeto fina en proporción 1:1, obteniendo 80 y 90% de supervivencia, respectivamente. El tratamiento T1 es un sustrato estéril comúnmente usado en plantas ornamentales de tallo suculento; sin embargo, para esta especie es poco recomendable porque incrementan su mortalidad en 25%, ya que sus requerimientos de humedad son bajos. Las plantas que fueron aclimatadas en el sustrato T2 crecieron en un sustrato con alto contenido de materia orgánica y alta capacidad de retención de humedad lo que hizo que el 19% de las plantas establecidas murieran por pudrición, este efecto hace suponer que para cactáceas es recomendable un sustrato con mayor porosidad como lo reportan Johnson y Emino (1979a) quienes proponen utilizar sustratos porosos en la aclimatación de cactáceas, debido a que estas plantas son de condiciones semiáridas y no requieren de mucha humedad para su desarrollo, porque una alta retención de humedad en el suelo puede provocar pudrición o contaminación por microorganismos.

4.3.2. Incrementos en Altura.

Después de 8 semanas de aclimatación se encontraron diferencias altamente significativas entre las plantas crecidas en los diferentes sustratos evaluados (Cuadro 13 Apéndice), siendo el sustrato de los tratamientos T1 y T2 los que registraron mayor incremento en altura de las plantas con de 6 mm y 5 mm, respectivamente (Cuadro 6); sin embargo, ambos tratamientos presentaron porcentajes de supervivencia menores al 80%.

Las plantas crecidas en los sustratos de los tratamientos T3 y T4 fueron estadísticamente iguales registrando un incremento en altura de 2.5 mm y 0.5 mm, respectivamente (Cuadro 6). Aunque ambos sustratos presentaron arena en su composición el sustrato T4 fue más poroso que el sustrato del tratamiento T3 lo que provocó poca retención de humedad y nutrientes afectando la conformación de las plantas reflejada en su pobre crecimiento (0.5 mm) después de 8 semanas; en

cambio, con el sustrato del tratamiento T3 se obtuvo durante el mismo período un mayor incremento en altura (2.5 mm) (Figura 8). Con este sustrato T3 se obtiene un porcentaje de supervivencia mayor de 90% y plantas con mejor conformación, por lo que para esta especie este sustrato puede utilizarse satisfactoriamente para la aclimatación de plantas generadas por cultivo de tejidos (Cuadro 6 y 7, Figura 8).

Las plantas que fueron aclimatadas en el sustrato T5 registraron un decremento en su crecimiento de 2 mm (Cuadro 6 y 7), mostrando que la falta de retención de humedad y nutrientes generan en la planta un estrés hídrico que provoca una deshidratación y reducción de su área foliar (Bidwell, 1979).

Cuadro No. 6. Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en *A. myriostigma* Lem.

Tratamiento	Supervivencia	Incrementos
1	75.00 c	6.11 a
2	81.39 bc	4.82 a
3	94.44 ab	2.56 ab
4	99.17 a	0.56 ab
5	89.08 abc	-2.13 c
Media	87.82	2.38

Valores con la misma letra dentro de columnas para supervivencia e incrementos en altura en las tres especies son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Cuadro No. 7. Concentración de Incrementos entre Fechas por cada Tratamiento para *A. myriostigma* Lem.

Trat.	AI	F1	F2	F3	F4	AF
T1	13.43	2.25	4.17	7.81	10.2	23.63
T2	9.74	1.84	3.61	6.36	7.46	17.2
T3	12.47	1.23	2.18	2.66	4.15	16.62
T4	14.56	0.38	0.24	0.27	1.34	15.9
T5	13.96	-1.38	-1.07	-0.2	-5.81	8.148

AI= Altura inicial; F1= Fecha 1; F2= Fecha 2; F3= Fecha 3; F4= Fecha 4; AF= Altura final

4.4. Aclimatación en *Turbinicarpus knuthianus* Boed.

4.4.1. Porcentajes de Supervivencia.

En el análisis de varianza realizado se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos (Cuadro 15 Apéndice), siendo los tratamientos T3 y T4 los sustratos de los que se obtuvo una mayor supervivencia (100%, en promedio) de las plantas durante la aclimatación (Figura 9), aunque estos dos tratamientos obtuvieron menores valores en altura de planta en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 8 y 9), resultados similares en este mismo género fue reportado por Martínez (1994) en la adaptación de plántulas a condiciones de invernadero con la utilización del sustrato peat moss, obteniendo 95% de supervivencia en la aclimatación. Resultados similares reportan Vyskot y Jara (1984); Ault y Blackmon (1987); Rodríguez-Garay y Rubluo (1992); Hernández (1994) y Jiménez *et al.* (2001) en otros géneros de cactáceas encontrando porcentajes de supervivencia que van desde 80 hasta 100%.

En los sustratos con alta capacidad de retención de humedad, como en los tratamientos T1 y T2, se registró un bajo porcentaje de supervivencia de las plantas siendo de 20 y 60%, respectivamente (Cuadro 8). El tratamiento T1 es un sustrato estéril comúnmente usado en plantas



Figura 9. Plantas de *T. knuthianus* Boed. aclimatadas en los sustratos T3 y T4.

ornamentales de tallo suculento; sin embargo, para esta especie es poco recomendable porque incrementan en 80% su mortalidad, ya que sus requerimientos de humedad son bajos. Las plantas que fueron aclimatadas en el sustrato T2 crecieron en un sustrato con alto contenido de materia orgánica y alta capacidad de retención de humedad lo que hizo que el 40% de las plantas establecidas murieran por pudrición, como lo refieren Johnson y Emimo (1979a) que proponen utilizar

sustratos porosos, debido a que estas plantas son de condiciones semiáridas y no requieren de mucha humedad para su desarrollo, además una alta retención de humedad en el suelo puede provocar pudrición o contaminación por microorganismos.

4.4.2. Incrementos en Altura.

Después de 10 semanas de aclimatación se encontraron diferencias altamente significativas entre las plantas crecidas en los diferentes sustratos evaluados (Cuadro 15 Apéndice), siendo el sustrato de los tratamientos T1 y T2 los que registraron mayor incremento en altura de las plantas con de 9 mm y 7 mm en promedio, respectivamente (Cuadro 8); sin embargo, ambos tratamientos presentaron porcentajes de supervivencia menores al 60% (Cuadro 8).

Las plantas crecidas en los sustratos de los tratamientos T3 y T4 fueron estadísticamente iguales registrando un incremento en altura de 2.0 mm y 3.0 mm, respectivamente (Cuadro 8, Figura 9). Cualquiera de estos dos sustratos son recomendables para esta especie, porque se obtienen porcentajes de supervivencia altos y la conformación de las plantas es buena (Cuadro 9, Figura 9), además que la retención de humedad y nutrientes es buena para el desarrollo de las mismas, como lo reportan Johnson y Emino (1979a).

Cuadro No. 8. Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en *T. knuthianus* Boed.

Tratamientos	Supervivencia	Incrementos
1	20.14 c	8.80 a
2	59.72 b	6.68 a
3	99.75 a	2.04 b
4	100.00 a	2.82 b
Media	69.90	5.09

Valores con la misma letra dentro de columnas para supervivencia e incrementos en altura en las tres especies son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Cuadro No. 9. Concentración de Incrementos entre Fechas por cada Tratamiento para *T. knuthianus* Boed.

Trat.	AI	F1	F2	F3	F4	F5	AF
T1	13.83	3.33	6.67	9	10.33	14.67	28.5
T2	17.55	2.38	4.34	7.56	9.23	9.889	27.44
T3	13.94	-2.31	1.78	0.73	4.085	5.892	19.83
T4	12.42	-0.46	3.17	2.53	3.877	4.992	17.41

AI= Altura inicial; F1= Fecha 1; F2= Fecha 2; F3= Fecha 3; F4= Fecha 4; F5= Fecha 5; AF= Alt. final

4.5. Aclimatación en *Turbinicarpus lophophoroides* Werd.

En el análisis estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos para ambas variables (Cuadro 16 Apéndice), obteniéndose porcentajes de supervivencias promedio superior al 90% y alturas promedio que van de 3 a 4 mm, respectivamente, después de 6 semanas de aclimatación (Cuadro 10, Figura 10); resultados similares en este mismo género fue reportado por Martínez (1994) con la utilización del sustrato peat moss, obteniendo 95% de supervivencia en la aclimatación, además en otros géneros se han obtenido porcentajes de supervivencia que van desde 80 a 100%, como lo reportan Vyskot y Jara (1984); Ault y Blackmon (1987); Rodríguez-Garay y Rubluo (1992); Hernández (1994) y Jiménez *et al.* (2001).

Para esta especie es recomendable el tratamiento T4, porque se obtiene mayor porcentaje de supervivencia y mayor incremento en altura de las plantas, además el sustrato retiene la suficiente humedad y nutrientes



Figura 10. Plantas de *T. lophophoroides* Werd. aclimatadas en el sustrato T4.

requeridos para el desarrollo de las plantas (Cuadro 11, Figura 10), como lo reportan Johnson y Emino (1979a); mismo efecto tuvo el tezontle de textura fina combinado con materiales orgánicos en *crisantemo* y *Anthurium*.

El tratamiento T5, no es recomendable ya que su composición es muy porosa y no le permite retener suficiente humedad y nutrientes que requieren las plantas para obtener un desarrollo deseado (Cuadro 11), efecto contrario ha sido reportado en plantas fundación de Fresa (*Fragaria sp.*) donde se desarrollan mejor en un sustratos más poroso y en orquídeas del género *Phalaenopsis* se desarrollan mejor en tezontle con granulometría de 1.5 a 2 cm.

Cuadro No. 10. Comparación de Medias para el Porcentaje de Supervivencia e Incrementos de Altura en *T. lophophoroides* Werd.

Tratamiento	Supervivencia	Incrementos
4	96.19 a	4.21 a
5	93.45 a	2.90 a
Media	94.82	3.56

Valores con la misma letra dentro de columnas para sobrevivencia e incrementos en altura en las tres especies son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha \leq 0.05$).

Cuadro No. 11. Concentración de Incrementos entre Fechas por cada Tratamiento para *T. lophophoroides* Werd.

Trat.	AI	F1	F2	F3	AF
T4	4.15	2.56	3.58	6.48	10.63
T5	4.75	1.7	3.44	3.56	8.312

AI= Altura inicial; F1= Fecha 1; F2= Fecha 2; F3= Fecha 3; AF= Altura final

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en ésta investigación se puede concluir que:

1. Es posible establecer protocolos de multiplicación para *A. myriostigma* Lem y *T. knuthianus* Boed.
2. El uso de diferentes fitohormonas y de diferentes concentraciones permite tener un amplio rango en la inducción de brotes.
3. Para *A. myriostigma* Lem. la concentración que mejoró la inducción de brotes fue el de 23.23 μM de Kin.
4. Para *T. knuthianus* Boed. la concentración que mejoró la inducción de brotes fue el de 22.1 μM de BA.
5. Con el uso de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales se pueden obtener masivamente plántulas con calidad fitosanitaria, en menor tiempo, bajo un reducido espacio de trabajo y sin importar la estación del año, además permite la propagación y conservación de las especies más vulnerables y las especies comerciales.
6. Las tres especies de cactáceas propagadas por cultivo de tejidos vegetales se pueden aclimatar a condiciones de invernadero, obteniendo un alto porcentaje de supervivencia de las plantas y además altos incrementos en altura comparado con el crecimiento en condiciones naturales.
7. Para *A. myriostigma* Lem., el sustrato del T3 (suelo arenoso, agrolita y humus) fue el más adecuado para la aclimatación.

8. Para *T. knuthianus* Boed., los sustratos del T3 (suelo arenoso, agrolita y humus) y el T4 (arena fina, peat moss y humus), fueron los más adecuados para la aclimatación de ésta especie.
9. Para *T. lophophoroides* Werd., el T4 (arena fina, peat moss y humus) fue el sustrato en el que se aclimataron mejor las plantas.
10. El uso de sustratos arenosos combinados con una buena porción de materia orgánica y un fertirriego adecuado propiciará la aclimatación adecuada de cactáceas que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción.

6. LITERATURA CITADA.

- Aceves Rubio, José L. y Jacinto, Hernández H. 1997. Propagación Comercial de Plantas Ornamentales por Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales para Beneficio Social de la Comunidad. Ciencia Administrativa. Nueva época. Vol. No.1. Disponible en: <http://www.uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html>
- Anderson, F. E. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland, Oregon. 776 p.
- Anderson, F. E., Arias M. S., Taylor N. P. 1994. Threatened Cacti of Mexico. Edit. Royal Botanic Gardens Kew. England. pp.: 111-114.
- Apter, R. C. *et al.* 1991b. Physiological Comparisons of *in vitro* and *ex vitro* Formed Adventitious Roots of *Trachelospermum asiaticum*. Hort. Science. 26(6). June.
- Arenas, T., Mario A. M., Martín M., Ángel J., y Víctor M., C. Ávila. 2001. Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeberg) Glass & Foster. Instituto de Ecología A. C. e Instituto de Biología, UNAM. XV Congreso Mexicano de Botánica. Querétaro. México. Disponible en: <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen985.html>
- Arredondo G., A. y F. Camacho M. 1995. Germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire. en Relación con la Procedencia de Semillas y Temperatura de Incubación. Cact. Suc. Mex. 40(2): 34-38.
- Ault, James R. and William, J. Blackmon. 1985. *In vitro* Propagation of Selected Native Cacti Species. Hort. Sci. 3: 541.
- Ault, James R. and William, J. Blackmon. 1987. *In vitro* Propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). Hort. Sci. 22 (1): 126-127.
- Benmoussa, M. S. Mukhopadhyay and Y. Desjardins. 1996. Optimization of Callus Culture and Shoot Multiplication of *Asparagus densiflorus*. Plant Cell and Tissue Culture. 47: 91-94.
- Bidwell. R. G. S. 1979. Fisiología Vegetal. Primera Edición. H. G. T. Editor. S. A. México. 784 p.
- Bonnes, M. S., P. W. Paré and T. J. Mabry. 1994. Novel Callus and Suspension Cultures of the "Old Man" Cactus (*Cephalocereus senilis*). Cact. And Succ. J. 65: 144-147.

- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 1. México, D. F. 743 p.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C. and Woltering, E. J. 1994. Components of the Gaseous Environment and their Effects on Plant Growth and Development *in vitro*. Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. pp.: 165-190.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C. and Woltering, E. J. 1996. Controlling the Gaseous Composition *in vitro*- Description of a Flow System and Effects of the Different Gaseous Components on *in vitro* Growth of Potato Plantlets. Scientia Horticulturae. 65: 11- 23.
- Bustamante, M. A. and Garcia, G. 1994. Survival of Micropropagated Cacti Shoot after IBA and Desecation Treatments. XXIV International Horticultural Congress. Kyoto, Japan. 137 p.
- Bustamante, M. A. and Heras, M. G. 1990a. Tissue Culture of Cacti Species. XXIII International Horticultural Congress. Firenze, Italy. 163 p.
- Bustamante, M. A.; Heras, M. G. y Bustamante L. A. 1990b. Germinación de Semillas de Especies Cactáceas *in vitro*. XIII Seminario Panamericano de Semillas. Guatemala. 47 p.
- Cabaleiro, C. 1991. Effect of Light on Rooting *in vitro* of *Petunia* Microshoots. Acta Hort. 300: 189-195.
- Christianson, M. L. and D. A. Warnick. 1988. Organogenesis *in vitro* as a Developmental Process. Hort. Sci. 23 (5): 515-519.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2): 337-343.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van Der Lancken and J. Hoek Spaans. 1991. Factors Affecting Areole Activation *in vitro* in the Cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Hort. Sci. 46: 283-294.
- Damiano, C., A. Charlotti, E. Caboni, R. Quarta and G. Boumis. 1991. Some Factors Affecting the Induction and the Expression of Rooting in Different Fruit Species *in vitro*. Acta Hort. 200: 211-221.

- Debergh, P. C. A. and Maene, L. M. 1981. A Scheme for Comercial Propagation of Ornamental Plants by Tissue Culture. *Scientia Hort.* 14: 335-345.
- Desjardins, Yves. 1995. Factors Affecting CO₂ Fixation in Striving to Optimize Photoautotrophy in Micropropagated Plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* Vol. 1 No. 1. pp.: 13-25.
- Distabanjong, K. and L. Geneve. 1993. Adventitious Shoot Formation in Eastern Redbud (*Cercis canadensis*). *Hort. Sci.* Vol. 28 (5):546.
- Dumas, E. and O. Monteuis. 1995. *In vitro* Rooting of Micropropagated Shoot from Juvenile and Mature *Pinus pinaster* Explants; Influence of Activated Charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 40: 231-235.
- Elizondo, E. J. L., J. Valdés R. y A. Rodríguez G. 1990. Cactáceas Vulnerables y en Peligro de Extinción para Coahuila, México. *BIOTAM.* 2(2): 17- 22.
- Enríquez Limón, Aarón. 1994. Micropropagación y Aclimatación de *Neolloydia* ssp. Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. 128 p.
- Enríquez V., J. R. y B. Díaz R. 1994. Experiencias sobre la Propagación *In Vitro* de Plantas. CIGA. Instituto Tecnológico de Oaxaca No. 1. México. 39 p.
- Escobar Araya, H. A. 1985. Micropropagación y Almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclacea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias en Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 80 p.
- Escobedo B. L., H. T., García O. y Rubén, R. M. 2000. Propagación *in vitro* de *Turbnicarpus valdezianus* (MOLLER) GL&F. XVIII Congreso Nacional. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. Universidad de Guanajuato. Irapuato, Guanajuato. pp.: 330.
- Escudero G., F., N. Juárez D., J. M. Salgado C., M. Ramírez Y. 1996. Brotación *in vitro* de Yemas Axilares de *Wilcoxia viperina* var. tomentosa (Cactaceae). III Congreso Nacional de Biotecnología. pp.: 88.
- Estrada A., A. y C., López. 1988. Microinjertos de Diferentes Morfoespecies de Nopal (*Opuntia* sp). 3ª Reunión Nacional y 1ª Reunión Internacional del Nopal. Programa y Resúmenes. UAAAN. Saltillo. Coahuila. México.

- Fay, M. F. and J. Gratton. 1992. Tissue Culture of Cacti and other Succulents; a Literature Review and a Report on Micropropagation at Kew. *Bradleya*. (10):33-48.
- Gaspar, T. H., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crevecoeur, M., Penel, C. L., Greppin, H. y Dommes, J. 2003. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 85- 106.
- Glass C., E. 1998. Guía para la Identificación de Cactáceas Amenazadas de México. Vol. 1. Editorial CANTE-CONABIO. México. pp.: 55- 56.
- Gómez Jacinto, R., B. Romero, A. Jiménez, M. Monroy, M. Mata, H. Hernández y V. Chávez. 2001. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* Hernández & Anderson, Especie Endémica Mexicana en Peligro de Extinción. Instituto de Biología. UNAM. XV Congreso Mexicano de Botánica. Querétaro. México. Disponible en: <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen680.html>
- Gordillo Camacho, Gabriela. 1991. Micropropagación del *Kalanchoe*. Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. 82 p.
- Gratton, J. and M. F. Fay. 1990. Vegetative Propagation of Cacti and other Succulent *in vitro*. In: Pollard, J. W. and Walker, J. M. (eds). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. pp.: 219-225.
- Grout, W. W. and Aston, M. J. 1977. Transplanting of Cauliflower Plants Regenerated from Meristem Culture. I. Water Loss and Water Transfer Related to Change in Leaf Wax and to Xylem Regeneration. *Hort. Res.* 17: 1-7.
- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM-CONABIO. México. 315 p.
- Harrington, H. A. 1980. The Need of Protection of Our Native Cacti. *Cactus & Succulent Journal (USA)*. 52 (5): 224-232.
- Heras Cuevas, Marco G. 1990. Germinación y Cultivo de Tejidos de Especies Cactáceas *in vitro*. Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. 88 p.
- Hernández H., J. 1994. Notes on *in vitro* Propagation of *Melocactus bellavistensis* Rauh et Backeb from Peru. *Botanic Gardens Micropropagation News*. 1 (7): 85-86.

- Hofer, A. 1995. Quelques Considerations Sur le Genere *Turbinicarpus* (Backeberg) Buxbaum et Beckeberg. Succulentas (Francia). 18:22-28.
- Hu, C. Y. and P. J. Wang. 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Culture. pp.: 177-227. In: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. W. Ammirato, and Y. Yamada (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Macmillan, New York.
- Hubstenberger, J. F., P. W. Clayton and G. C. Phillips. 1992. IV Micropropagation of Cacti (Cactaceae). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 20:49-68.
- Jain, A. K. and R. K. Datta. 1992. Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in Mulberry (*Morus bombycis* Koidz): Factors Influencing Morphogenetic Potential in Callus Cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 29: 43-50.
- Jiménez Rodríguez, J. A., Martín, M. R. y Víctor Manuel, C. A. 2001. Micropropagación de *Astrophytum myriostigma* Lem. Instituto de Ecología A. C. e Instituto de Biología, UNAM. XV Congreso Mexicano de Botánica. Querétaro. México. Disponible en: <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen46.html>
- Johnson, J. L. and E. R. Emino 1979a. Tissue Culture Propagation in the Cactaceae. Cact. Succ. J. 51: 275-277.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino 1979b. *In vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. Hort. Science. 4(5): 605-606.
- Knight, S. L. and Chu, C. Y. 1991. Scanning Electron Microscopy (SEM) of *in vitro*-Grown Miniature Rose Transferred to Greenhouse Conditions. Hort. Science. 26(6): 732.
- Kolar, Z., J. Bártek and B. Vyskot. 1989. Vegetative Propagation of the Cactus *Mammillaria woodsii* Craig Through Tissue Cultures. Experientia. 32(3):668-669.
- Kozai, T. 1991. Micropropagation Under Photoautotrophic Conditions. Micropropagation. pp.: 447-469.
- Lewandowski, Verónica T. 1991. Rooting and Acclimatization of Micropropagated *Vitis labrusca* "Delaware". Hort. Science. 26(5): 586- 589.

- Litz, E. R. and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. In: Ed. by F. A. Hammerschlag and Relitz. Biotechnology of Perennials Fruit Crops. Cab International. pp.: 3-25.
- López E., Carlos. Colaborador Científico en la E. E. La Mayora (CSIC). 1992. Disponible en: http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS31/enr_aizamiento.html
- López González, J. J. y G. García Ponce. 2004. Distribución y Evaluación de las Poblaciones Naturales del Género *Ariocarpus* (Scheidweiler) en Coahuila, México. Departamento de Recursos Naturales Renovables. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. pp: 68-75.
- López González, J. J.; A., Rodríguez G.; L., Pérez R.; M. J., Ayala O.; G., García P. y V., Rodríguez C. 2003. Evaluación del Estado Actual de las Poblaciones de Cactáceas en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México.
- Machado M., H. S. and A. J. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by Areola Activation. *In vitro* Cel. Dev. Biol. Plant. 32: 199 -203.
- Maene, L. M., and P. C. Debergh. 1983. Rooting of Tissue Cultured Plants Under *in vivo* Conditions. *Acta Hort.* 131: 201-208.
- Malda, G., H. Suzán 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.
- Manzanares M., M. E., 1994. Medio de Cultivo In: Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. México. pp.: 67-86.
- Margara, I. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. pp.: 172-197..
- Martínez C., Vicente.1999. Importancia de las Cactáceas. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/index.html>
- Martínez Vara, Paulino. 1994. Propagación *in vitro* de Cactáceas. I.T.E.S.M. Campus Querétaro. Disponible en: http://www.gro.itesm.mx/servicios_int/bioingenieria/labc_ultivo.html

- Martínez Vázquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* Mass Propagation of the Near-Extinct *Mammillaria san-angelensis*. J. Hort. Sci. 64:99-105.
- Mauseth, D. J. 1977. Cactus Tissue Culture: A Potential Method of Propagation. Cact. and Succ. J. Vol. 59:80-81.
- Mauseth, D. J. 1979a. A New Method for the Propagation of Cacti: Sterile Culture of Axillary Buds. Cact. and Succ. J. 51: 186- 187.
- Mauseth, D. J. 1979b. Cytokinin-elicited Formation of the Pith-Rib Meristem and Effects of Growth Regulators on Morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) Seedling Shoot Apical Meristems. Amer. J. Bot. 66(4): 446-451.
- Mauseth, D. J. 1983a. Introduction to Cactus Anatomy. Part 2. Apical Meristems. Cact. and Succ. J. 55:18-21.
- Mauseth, D. J. and W. Halperin. 1975. Hormonal Control of Organogenesis in *Opuntia polycantha* (Cactaceae). Amer. J. Bot. 62(8):869-877.
- Meins, F. and A. N. Binns. 1979. Cell Determination in Plant Development. BioSci. 29(4): 221-225.
- Meins, F. and A. N. Binns. 1979. Shoot Histogenesis in Tabaco Callus Cultures. *In vitro*. 15: 415-424.
- Mendoza Sánchez, Manuel. 1993. Memorias del Diplomado de Biotecnología Aplicada a la Agricultura. S.E.P.-I.T.A. No. 9-I.T.E.S.M. 208 p.
- Minocha, C. S. and P. N. Mehra. 1974. Nutritional and Morphogenetic Investigations on Callus Cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). Amer. J. Bot. 61(2): 168-173.
- Miyashita, Yoshie, Kitaya, Yoshiaki, Kubota, and Kozai, Toyoki. 1996. Photoautotrophic Growth of Potato Plantlets as Affected by Explant Leaf Area, Fresh Weight and Stem Length. Scientia Horticulturae. 65: 199-202.
- Monatsschrift der Deutschen Kakteen-Gesellschaft. 1930. Características y Clasificación Taxonómica de *T. knuthianus* (Boedeker) John & Riha. pp.: 139-140. Disponible en: <http://www.mfaint.demon.co.uk/cactus/turbo/desc/knuthianus.html>
- Moncousin, Ch. 1991. Rooting of Microcuttings; General Aspects. Acta Hort. 289: 301-310.

- Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135- 166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Narváez González, Jorge Luis. 2000. Efecto del TDZ y el BA, sobre la Brotación Múltiple en Explantes de Pitahaya (*Hylocereus undatus*). Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. 53 p.
- Nava, C. V. y Yáñez, L. L. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* Mediante Cultivo de Tejidos. *Cact. Suc. Méx.* 29(1): 3-7.
- Nessman J. D. 1994. Para el Cuidado de los Cactus y Plantas Crasas. Ed. SUSAETA. Madrid, España. 153 p.
- Neutelings, T. M. N. 1982. *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) Gl. & F. *Suculenta* (Ámsterdam). 61:188-190.
- Ni Lee, Hazel, Wetzstein, Y. and Sommer, Harry E. 1985. Effects of Quantum Flux Density on Photosynthesis and Chloroplast Ultrastructure in Tissue- Cultured Plantlets and Seedling of *Liquidambar styraciflua* L. Towards Improved Acclimatization and Field Survival. *Plant Physiol.* 78: 637- 641.
- Nobel, P. S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México. 211 p.
- Olguín S., L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), Especie en Peligro de Extinción. Tesis de Licenciatura. UNAM. 85 p.
- Ortiz A., F. y A. Martínez Palacios. 2003. Micropropagación de *Astrophytum myriostigma* Lem. Programa y Memoria de Resúmenes del X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, IX Congreso Nacional y II Internacional de Horticultura Ornamental. Texcoco, Estado de México. pp.: 217.
- Pérez-Molphe B., E., E. Villalobos A. M., E. Meza R. y H. J. Lizalde V. 1995. Desarrollo de Sistemas para la Propagación Masiva y Conservación de Germoplasma *in vitro* de 20 Especies Mexicanas de Cactáceas. *Investigación y Científica.* 15: 36-43.
- Perez-Molphe B., E., E. Villalobos A. M., Pérez R., E. Meza R. y H. J. Lizalde V. 1996. Propagación y Conservación *in vitro* de 22 Especies Mexicanas de Cactáceas. III Congreso Nacional de Biotecnología. pp.: 55.

- Phan, C. T. and Hegedus, P. 1986. Possible Metabolic Basis for Developmental Anomaly Observed in *in vitro* Culture, Called "Vitreous Plants". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 6: 83- 94.
- Phillips, C. G., Clayton, W. P. and Hubstenberg, J. F. 1989. Micropropagation of Threatened and Endangered Species of the Cactaceae. *In vitro*. 25: 32-39.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. pp.: 55.
- Reynolds, L. T. 1986. Somatic Embryogenesis and Organogenesis from Callus Cultures of *Solanum carolinense*. *Amer. J. Bot.* 73(6): 914-918.
- Roberts, A. and D. Matthews. 1995. The Preparation *in vitro* of Chrysanthemum for Transplantation to Soil. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture*. 40: 191-193.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* Morphogenetic Responses of the Endangered Cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cact. and Succ. J.* 64 (3): 116-119.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez P. y O. Martínez Vázquez. 1993. Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti Through *in vitro* Culture. *Biological Conservation*. (63): 163-169.
- Rzendowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México.
- Saebo, A. 1991. Photosynthesis of *in vitro* Cultures of *Fragaria ananassa* cv. Sengana Sengana and a Clone of *Betula verucosa* as Influenced by Lamps Types. *Hort. Science*. 26 (6). June.
- Sagawa, Y. and J. Kunisaki, T. 1990. Micropropagation of Floriculture Crops.
- Sánchez, R. M. D. 1998. Conteo Cromosómico y Estudio de la Semilla de *Turbnicarpus valdezianus* (Môller) Gl. & F. Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. pp.: 35-38.
- Sánchez-Mejorada, R. y H. Bravo-Hollis. 1991. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. II. 404 p.
- Santamaría, J. M., Davies, W. J., and Atkinson, C. J. 1993. Stomata of Micropropagated *Delphinium* Plants Respond to ABA, CO₂, Light and Water

- Potential, but Fail to Close Fully. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 44. No. 258. Pp. 99- 107.
- Santamaría, J. M., Herrera, José L., and Robert, Manuel L. 1995. Stomatal Physiology of Micropropagated CAM Plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*. 16: 211- 214.
- Santamaría, Jorge M. 1996. Antologías del Curso “Fisiología de Plantas Cultivadas *in vitro*”. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Asociación Etnobiológica Mexicana A. C.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT User’s Guide. Release 6.03. SAS Inst., Cary, N.C.
- SEMARNAT. 2001. Norma Oficial Mexicana de Protección de Flora y Fauna Silvestre. Diario Oficial de la Federación. Lunes 16 de Mayo. Tomo CDLXXXVIII, No. 10.
- Serret, Maria D., Trillas, Maria I., Joseph and Araus, José L. 1996. Development of Photoautotrophic and Photoinhibition of *Gardenia jasminoides* Plantlets during Micropropagation. *Plant. Cell., Tissue and Organ Culture*. 45: 1- 16.
- Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Expt. Biol.* 11: 118-140.
- Sociedad Mexicana de Cactología A. C. 2000. Las Cactáceas y Suculentas Mexicanas. <http://cactus-mall.com/smc/scerca.html>
- Starling, R. J. 1985. *In vitro* Propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. and Succ. J.* 57: 114-115.
- Starling, R. J. and J. H. Dodds. 1983. Tissue-Culture Propagation of Cacti and other Succulents. *Bradleya*. pp.: 84-90.
- Street, H. E. 1977. Growth Patterns in Tissue (Callus) Cultures In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Botanical Monographs. Vol. II. Ed. Blackwell Scientific Publications. pp.: 267-307.
- Stuppy, W. and N. Nagl. 1992. Regeneration and Propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cact.) Via Somatic Embryogenesis. *Bradleya*. 10: 85-88.

- Subhash, C. M. and P. N. Mehra N. 1974. Nutritional and Morphogenetic Investigations on Callus Cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). Amer. Bot. J. 61(2): 168-173.
- Torres Barrera, Carlos. 1996. El Proceso de Adaptación de Plantas Micropropagadas a Condiciones de Invernaderos. Tesis de Licenciatura UAAAN. Saltillo. Coahuila. México. 129 p.
- Trejo, M. M. y Cruickshank, V. M. 1987. Estrategia para la Recuperación de Especies en Peligro de Extinción en México. Resumen X Congreso Mexicano de Botánica. México.
- Villalobos A., V. M and M. Thorpe. 1985. La Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. En: Fundamentos y Aplicaciones del Cultivo de Tejidos en la Agricultura. W. Roca CIAT. Colombia. pp.: 67-85.
- Villalobos A., V. M. 1990. Historia del Cultivo de Tejidos Vegetales. In: Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Colegio de Postgraduados, FAO. pp.: 3-7.
- Villalobos A., V. M. y Escobar, A. H. A. 1990. Micropropagación de Nopal (*Opuntia* spp). In: Rosell, C. H. y Villalobos A., V. M. 1990. Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Colegio de Postgraduados, FAO, Producción y Protección Vegetal. Roma. 111 p.
- Villarreal Quintanilla, José Ángel. 1993. Introducción a la Botánica Forestal. Editorial Trillas. México D. F. pp.: 153.
- Villavicencio G., E. E., Ángel, V. M. y M. Cristina, López P. 2000. Germinación y Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. XVIII congreso Nacional. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. Universidad de Guanajuato. Irapuato, Guanajuato. pp.: 83.
- Villavicencio G., E. Edith. 1998. Cultivo *in vitro* de dos Especies de Cactáceas (*Astrophytum myriostigma* Lem. y *A. capricorne* (Diertr.) Britton y Rose) Amenazadas de Extinción. Tesis de Maestría en Ciencias Especialidad de Forestal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 115 p.
- Villavicencio G., E. Edith. 2002. Micropropagación de Cactáceas Ornamentales Amenazadas o en Peligro de Extinción. INIFAP. Campo Experimental

Saltillo.

Disponible

en:

<http://www.inifap.gob.mx/logros/noviembre/Cactaceas.PDF>

- Vinterhalter, D. and Vinterhalter, B. 1992. Effect of Inorganic Nutrition on the Formation of Lateral Roots in *Dracaena fragans* Ker- Gawl Cultured *in vitro*. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 28: 267- 274.
- Vyskot, B. and Z. Jara 1984. Clonal Propagation of Cacti Through Axillary Buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 59 (3): 449-452.
- Walker, K. A., M. L. Wendeln and E. G. Laworski. 1979. Organogenesis in Callus Tissue of *Medicago sativa*. The Temporal Separation of Induction Process from Differentiation Process. Plant Sci. 16: 23-30.
- Yassen-Mohamed, Y., S. A. Barringer, W. E. Splittstoesser, and R. J. Schnell. 1995a. Rapid Propagation of Tuna (*Opuntia ficus indica*) and Plant Establishment in Soil. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 42: 117-119.
- Yassen-Mohamed, Y., S. A. Barringer, W. E. Splittstoesser. 1995b. Micropropagation of the Endangered Succulent, *Stapelia semota*, by axillary Proliferation. Cact. and Succ. J. (67): 366-368.
- Zachar M., R. Staník, A. Lux, I. Dráb, P. Lechner. 1997. Características y Clasificación Taxonómica de *T. lophophoroides* Werd. Disponible en: <http://www.mfaint.demon.co.uk/cactus/turbo/desc/lophophoroides.html>

7. APÉNDICE.

Cuadro No. 12. Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Número y Altura de Brotes de *A. myriostigma* Lem. Bajo Diferentes Concentraciones de Citocininas.

F. V.	G. L.	N. B.	A. B.
Tratamientos	3	35.48 **	13.56 *
Error	1069	6.26	2.64
Total	1072		
C. V. (%)		61.36	56.75

F. V.= Frec. de Variación; G. L.= Grados de Libertad; C. V.= Coef. De Variación; N. B.= Número de Brotes; A. B.= Altura de Brotes; * significativo ($P (\alpha \leq 0.05)$); ** altamente significativo ($P (\alpha \leq 0.01)$)

Cuadro No. 13. Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de *A. myriostigma* Lem. en los Diferentes Sustratos Evaluados.

F. V.	G. L.	Supervivencia	Incrementos
Tratamientos	4	284.92 *	32.61 **
Error	10	82.41	2.84
Total	14		
C. V. (%)		10.34	70.64

F. V.= Frec. de Variación; G. L.= Grados de Libertad; C. V.= Coef. de Variación; * significativo ($P (\alpha \leq 0.05)$); ** altamente significativo ($P (\alpha \leq 0.01)$)

Cuadro No. 14. Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Número y Altura de Brotes de *T. knuthianus* Boed. Bajo Diferentes Concentraciones de BA.

F. V.	G. L.	N. B.	A. B.
Tratamientos	5	30.48 **	1.23 ^{NS}
Error	720	4.83	1.63
Total	725		
C. V. (%)		39.32	30.65

F. V.= Frec. de Variación; G. L.= Grados de Libertad; C. V.= Coef. De Variación; N. B.= Número de Brotes; A. B.= Altura de Brotes; ** altamente significativo ($P (\alpha \leq 0.01)$)

Cuadro No. 15. Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de *T. knuthianus* Boed. en los Diferentes Sustratos Evaluados.

F. V.	G. L.	Supervivencia	Incrementos
Tratamientos	3	4376.65 **	30.73 **
Error	8	12.67	1.19
Total	11		
C. V. (%)		5.09	21.48

F. V.= Frec. de Variación; G. L.= Grados de Libertad; C. V.= Coef. De Variación; ** altamente significativo (P ($\alpha \leq 0.01$))

Cuadro No. 16. Cuadrados Medios del Análisis de Varianza y Significancia del Efecto Supervivencia y Altura de Plantas de *T. lophophoroides* Werd. en los Diferentes Sustratos Evaluados.

F. V.	G. L.	Supervivencia	Incrementos
Tratamientos	1	11.16 ^{NS}	2.57 ^{NS}
Error	4	28.64	0.61
Total	5		
C. V. (%)		5.64	22.02

F. V.= Frec. de Variación; G. L.= Grados de Libertad; C. V.= Coef. De Variación; ^{NS} No Significativo

ABREVIATURAS

BA	N6- Bencilaminopurina
Kin	Kinetina; N6- Furfurilaminopurina
2iP	N6 Dimetil alil aminopurina
AIA	Ácido Indol-3-acético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
2,4-D	Ácido 2,4- diclorofexiacético
ABA	Ácido Abscísico
MS	Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962)
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca
CaCl	Cloruro de Calcio
CaNO ₃	Nitrato de Calcio
H. R.	Humedad Relativa
CAM	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas
CO ₂	Bióxido de Carbono
O ₂	Oxígeno divalente
Ppm	Partes por millón
Mm	Milimol
μM	Micromol
PPF	Photosynthetic Photon Flux