

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



***Enraizamiento in vitro de Epithelantha micromeris*
Engelmann (CACTACEAE)**

Por:

HORACIO SANTIAGO MEJÍA

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
Ingeniero Agrónomo en Producción**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo del 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Enraizamiento *in vitro* de *Epithelantha micromeris* Engelmann
(CACTACEAE)

Realizado por:
HORACIO SANTIAGO MEJÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo en Producción

Aprobada por:

M.C. Leticia Escobedo Bocado
Presidente del Jurado

M.C. Reynaldo Alonso Velasco
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo del 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Enraizamiento *in vitro* de *Epithelantha micromeris* Engelmann
(CACTACEAE)

Realizado por:
HORACIO SANTIAGO MEJÍA

Que somete a Consideración del H. Jurado Examinador
Como requisito Parcial para Obtener el Título de:
Ingeniero Agrónomo en Producción

Aprobado por:

M.C. Leticia Escobedo Bocardo
Presidente del Jurado

M.C. Ricardo Requejo López
Sinodal

M.C. Ma. Elena García Hernández
Sinodal

M.C. Reynaldo Alonso Velasco
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo del 2001

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo trabajador, pues gracias a la riqueza que generan, se reciben servicios como la educación en universidades públicas como la UAAAN.

A todos los maestros que influyeron en mi formación desde los primeros peldaños de mi vida académica y personal.

A la M. C. Leticia por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la asesoría y paciencia durante mi estancia en la universidad y en el transcurso del trabajo de tesis.

A la Bióloga Hermila T. Ozuma por su gran apoyo moral y técnico para la realización del trabajo de investigación, por sus consejos y regaños en los momentos más oportunos.

A la señora Faustina y Chela por el apoyo que me ofrecieron en el trabajo de laboratorio en el presente trabajo y, por su amistad y consejos durante todo el tiempo convivido.

A la M.C Ma. Elena García H. por las sugerencias y correcciones para poder culminar mi trabajo de tesis, también por compartir muchos de sus conocimientos para aprender a luchar en esta vida.

Al M.C. Ricardo Requejo por la revisión y consejos para concluir este trabajo.

DEDICATORIA

Para mi familia, mis camaradas y/o amigos por enseñarme lo valioso de la vida: por su espíritu incansable de lucha, amor a la vida y el trabajo común para poder vencer todos los obstáculos que nos pone este sistema y construir un mundo justo.

A mis abuelos, Basilio e Inés, por el amor y ejemplo brindado; a mis padres, Jacinto y Célida, por darme la vida, educación, amor y por guardar las esperanzas en terminar esta meta; a mis hermanos y hermanas, Jacinto, Angelica, Sergio, Patricia, Rocio, Elizabeth y Blanca Estela; porque gracias a su apoyo y comprensión me dan la fortaleza humana para seguir caminando; a mi cuñado Salvador por compartir la vida para con la familia; de igual manera a mi cuñada Araceli; a mis sobrinas, Janitzzy (por tu valor y cariño), Andrea Sarahí, Zetzin Rubí y Minerva Donají, por la alegría que brindan a la familia.

A mis camaradas de lucha, que con todos sus ideales, energía, coraje y sobre todo la gran amistad compartida, realizan todo su esfuerzo en la lucha contra la injusticia, la corrupción y por tener una universidad en mejores condiciones. Porque organizaciones como la Coordinación de Derechos Estudiantiles (**CDE**), cuenta con personas que poseen muchos de los lastres que nos heredan este sistema, pero que tienen valores humanos que nuestro enemigo común nunca tendrá, a todos nada les duele más que ver y sentir las violencias, la opresión y el escarnio a que las autoridades, gobiernos y capitalistas someten a nuestro pueblo. Tenemos orgullo de que esas violencias hayan originado resistencia en nuestro medio, entre los estudiantes, a ellos un gran homenaje: Lupillo, Edgardo, Mario, Rafael D., Delfino, Juan Aragón, José Omar, Gabriel, Gabriela, Buenaventura, F. Mora, C. G. Canché, Iber, José Luis R., José Ignacio,

Manuel V., José Edilberto, Diómedes, Hilario, Manuel T., Cesar R., Idalia, Yanina, Eduardo A., C. Lemus, Serafín M., Melesio, Pancho López, Silvano, Miguel Luis, Octavio, Cesar P., Odilón, Brosbely, Israel, Moisés, Alonso, Gustavo, Rafael R., J. Alberto, Juan Carlos, Lorenzo, Barreto, Nacho, Venegas, Wilfred, Braulio, Alfredo, Pancho A., los "chilangos", a los compañeros de U A de C de la Facultad de Ciencias de la Comunicación y muchos "incógnitos" o algunos otros que todavía no se han aventurado. Y como dijera *Marcos* "somos una voz entre todas esas voces, un eco que dignidad repite entre todas las voces, a ellas nos sumamos, nos multiplicamos con ellas, seguiremos siendo eco, voz somos y seremos. Somos reflexión y grito, siempre lo seremos. *No somos la paz simulada que anhela guerra eterna*. No seremos. No somos quienes esperan el perdón y la limosna de quien simula ayuda, cuando en realidad compra y que no perdona, sino humilla; quien siendo es desafío y reclamo y demanda y exigencia. No seremos".

A personas que con su amor, amistad, respeto y cariño estuvieron siempre conmigo, a doña Magui por ocupar un espacio muy importante en mi vida, Imelda, Juanita, Martha E., Rebeca, Grisel, Brigida, Manuel L., Porfirio y Jorge B.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iv</i>
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Particulares.....	3
HIPÓTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Clasificación taxonómica de <i>Epithelantha micromeris</i>	4
Fisiología y morfología de raíces de cactáceas.....	4
Papel que juegan las auxinas en el enraizamiento.....	7
Proceso de formación de raíces.....	9
Antecedentes de enraizamiento <i>in vitro</i> de cactáceas.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Ubicación del lugar experimental.....	21
Sistema radicular de <i>E. micromeris</i>	21
Obtención del explante.....	22
Hidratación del material vegetal.....	22
Propagación de <i>E. micromeris</i>	22

Crecimiento de los brotes de <i>E. micromeris</i>	23
Inducción a enraizamiento.....	23
Metodología de evaluación.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	38
RESUMEN	39
LITERATURA CITADA	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
1 Concentraciones de auxinas en el medio de cultivo MS para enraizamiento <i>in vitro</i> de propágulos de <i>E. micromeris</i> de cuatro meses de edad.....	24
2 Concentraciones de auxinas en el medio de cultivo MS para enraizamiento <i>in vitro</i> de propágulos de <i>E. micromeris</i> de diez meses de edad.....	26
3 Número de raíces, longitud de raíces, peso fresco y seco de raíces de propágulos de <i>E. micromeris</i>	28
4 Porcentaje de enraizamiento de propágulos de 4 meses de edad de <i>E. micromeris</i> después de 1 mes en el medio de enraizamiento y 3 meses en medio libre de hormonas.....	31
5 Porcentaje de cicatrización en propágulos de <i>E. micromeris</i> jóvenes (4 meses de edad), después de 4 meses de desarrollo...	33
6 Porcentaje de enraizamiento de propágulos de 10 meses de edad de <i>E. micromeris</i> después de 1 mes en el medio de enraizamiento y 3 meses en medio libre de hormonas.....	34
7 Porcentaje de cicatrización en propágulos de <i>E. micromeris</i> de 10 meses de edad, después de 4 meses de desarrollo.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Planta de <i>Epithelantha micromeris</i> donde se muestra su sistema radical.....	21
2	Esquema general para la generación de propágulos e inducción a enraizamiento de <i>E. micromeris</i>	29
3	Propágulo sin raíz y plántula con raíz de 8 meses de edad de <i>E. micromeris</i>	32
4	Plántula de <i>E. micromeris</i> de 8 meses de edad con raíz.....	32
5	Completa cicatrización en la base de los propágulos de <i>E. micromeris</i> a los 8 meses de edad.....	32
6	Vista lateral de la cicatrización de un propágulo de <i>E. micromeris</i> a los 8 meses de edad.....	
7	Formación de callo en propágulos de <i>E. micromeris</i> de 8 meses de edad con ANA a 5 mg/l.....	32
8	Irregular cicatrización de la base de propágulos de <i>E. micromeris</i> a los 18 meses de edad.....	37
9	Vista lateral de la cicatrización de la base de un propágulo de <i>E. micromeris</i> de 18 meses de edad.....	37
10	Formación de callo en propágulo de 14 meses de edad con ANA a 3 mg/l.....	37

INTRODUCCIÓN

México es uno de los países de mayor diversidad vegetal, dentro de ella se encuentra una importante familia, la Cactaceae, que se caracteriza por presentar hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializadas, adquiridas a través de todo un proceso evolutivo, lo que les confiere una fisonomía particular. 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 permite 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 corresponde 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 como una de las áreas cactológicas más importantes del país (Elizondo *et al.*, 1990).

La desaparición 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 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. 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).

Epithelantha micromeris se distribuye en el Desierto de Chihuahua; principalmente en los estados de Chihuahua y Coahuila, en este último se le encuentra en algunas lomas de la región central (Bravo-Hollis, 1978; Glass, 1998), está considerada dentro de las categorías rara y en peligro de extinción; de acuerdo a los criterios de la NOM-059-ECOL-1994 y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN) respectivamente (Elizondo *et al.*, 1990). Se ha propagado satisfactoriamente en cultivo *in vitro* (Bertaud, 1998 y Heras, 1990) pero a diferencia de la mayoría de las cactáceas propagadas bajo estas condiciones, durante el proceso de aclimatación no se da el enraizamiento espontáneo. Esto ha sido una limitante para culminar el proceso de propagación en esta especie. Por lo anterior en el presente trabajo se pretende lograr el enraizamiento de los propágulos para conformar una plántula completa, que permita transferirlas sin problema a la etapa de aclimatación.

OBJETIVOS

Objetivo General

*Determinar el tipo y concentración de auxina para lograr el enraizamiento *in vitro* de propágulos de *Epithelantha micromeris*.

Objetivos Particulares

*Evaluar el efecto de tres auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), y ácido indolacético (AIA) sobre el enraizamiento *in vitro* de *Epithelantha micromeris*.

*Determinar cual de las concentraciones de auxina es la más adecuada en la producción de raíces.

*Evaluar el efecto de la edad del propágulo sobre el enraizamiento *in vitro*.

HIPÓTESIS

Bajo condiciones *in vitro*, se determinará el regulador de crecimiento y la concentración que permita la producción de raíces de *Epithelantha micromeris* lo que asegurará su sobrevivencia en el proceso de aclimatación.

REVISIÓN DE LITERATURA

Clasificación taxonómica de *Epithelantha micromeris* Engelmann,
según Bravo Hollis (1991)

ORDEN Cactales

FAMILIA Cactaceae

SUBFAMILIA Cactoidea

TRIBU Cacteeae

SUBTRIBU Thelocactinae

GÉNERO *Epithelantha*

ESPECIE *micromeris*

Fisiología y morfología de raíces de cactáceas

Bravo-Hollis (1978), Nobel (1998), Rodríguez y Apezteguía (1980) mencionan que como ocurre en todo el reino vegetal, los cactus utilizan las raíces para extraer del suelo agua y nutrientes, así como para fijarse. La raíz de las

cactáceas es semejante, por lo general, a la de otras dicotiledóneas, procede de la radícula del embrión y en algunos casos es adventicia.

Nobel (1998), Rodríguez y Apezteguía (1980), mencionan que existen varios tipos y formas de raíces, las cuales desempeñan distintas funciones. Las raíces principales que se originan en el tallo tienden a ser largas, exploran gran volumen de suelo para obtener agua y nutrimentos. Las raíces principales también ayudan a anclar la planta. Las raíces laterales delgadas se originan en las raíces principales e incrementan mucho el área de contacto entre el sistema radical y las partículas del suelo, lo cual facilita la toma de agua y de nutrimentos del suelo. Algunas veces inmediatamente debajo del tallo hay una raíz pivotante y no sólo puede anclar a la planta sino también almacenar grandes cantidades de agua y carbohidratos. Hay especies que crecen con raíces trepadoras o rastreras (raíces adventicias), que hacen las funciones de las normales cuando sus puntas entran en contacto con la tierra. Mencionan que existen especies grandes, como *Carnegiea*, donde la raíz principal tiene una forma absoluta de estaca. Ella penetra profundamente en la tierra y tiene raíces laterales fuertes y ramificadas. Asimismo las especies que crecen en tierras pedregosas, barrosas y muy secas, tienen raíces muy fuertes, algunas en forma de nabo. Las raíces en forma de fascículos se hallan, sobre todo, en especies de *Aylostera*, *Notocactus* y *Rebutia*, que pueden encontrarse en lugares con césped y tierras relativamente húmedas. En lugares secos, algunas especies como *Ferocactus* y *Melocactus* desarrollan un sistema radical muy extenso, cuyos mechones y ramificaciones se deslizan a pocos centímetros de la superficie, para poder captar enseguida la escasa lluvia o el rocío. Las lluvias ligeras que caracterizan a las zonas áridas y semiáridas, por lo general no humedecen al suelo a gran profundidad, así que las raíces someras están idealmente situadas para responder a las lluvias ligeras.

Dubrovsky (1997) señala que el crecimiento indeterminado de las raíces es característico de la mayoría de las plantas, debido a este tipo de crecimiento se

mantiene la actividad prolifera de sus meristemos apicales. Sin embargo, algunas de las Cactáceas, como *Ferocactus peninsulæ* y *Stenocereus gummosus*, poseen crecimiento determinado de su raíz primaria, caracterizado por un corto período de actividad prolifera en el meristemo. Al cesar la actividad meristemática en el meristemo apical de la raíz primaria se da la inducción de la formación de raíces laterales.

Dubrovsky *et al* (1998) determinaron que tasas lentas de crecimiento de cactus en el desierto sonorensis y la alta productividad de algunas cactáceas bajo cultivo, lo primero no es consecuencia de una larga duración de división celular, pero sí de períodos cortos de condiciones óptimas que dan crecimiento y factores ambientales adversos. La duración del ciclo de la división celular fue inversamente proporcional a la tasa de crecimiento de la raíz. Indicando que algunas especies pueden ser más productivas bajo cultivo que en forma silvestre debido a la relativamente corta duración del ciclo de división celular.

Aguilar y Dubrovsky (1999) estimaron el número de ciclos celulares durante todo el periodo de crecimiento inicial de la raíz, para analizar el comportamiento del crecimiento determinado de la raíz primaria de *Stenocereus gummosus* bajo diferentes temperaturas, pH y fitorreguladores. Constataron que pH ácido, 30°C de temperatura constante y zeatina + AIA 10^{-8} M, son las condiciones óptimas para la promoción del crecimiento de las raíces de *S. gummosus*. Sin embargo, en términos de número de ciclos celulares no se observaron cambios significativos en los diferentes tratamientos y su patrón de crecimiento determinado no cambió. Por consiguiente concluyeron que el crecimiento determinado es un programa de desarrollo genéticamente fijado durante la evolución de la especie y no representa una respuesta a condiciones particulares de cultivo temporal de la planta.

Dubrovsky (1999) al estudiar el desarrollo de adaptaciones de las raíces en el desierto, fue encontrado en muchas cactáceas que el primer sistema radical es relativamente pequeño (caracterizado por crecimiento determinado y raíces laterales) pero suficiente para un rápido establecimiento, toma de agua y sobrevivencia de la planta y no requiere de una gran cantidad de carbono y agua para su construcción y desarrollo.

Papel que juegan las auxinas en el enraizamiento

Hurtado y Merino (2000) indican que el término auxina proviene del griego *auxein*, que significa crecer. Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de raíces, debido a que en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación y crecimiento de segmentos aislados de raíces *in vitro*.

Bidwell (1993) menciona que las auxinas se sintetizan en el ápice del tallo (en el meristemo terminal o cerca de él) y en tejidos jóvenes y se mueven principalmente hacia abajo del tallo. Algunos experimentos sobre crecimiento radical sugieren que la auxina es el agente mediador en el control de la morfología de la raíz por el ápice, sin embargo, la cantidad de auxina presente en la raíz es casi inmensurable y no se ha tenido una evidencia directa de que se produzca en ese órgano. Sus actividades incluyen tanto estimulación como inhibición de crecimiento y la misma célula o estructura puede exhibir respuestas opuestas dependiendo de la concentración de AIA. Además, los diferentes tejidos responden a concentraciones muy diferentes, las raíces son estimuladas a concentraciones inferiores a las que estimulan los tallos.

Margara (1988) afirma que la aplicación de auxinas naturales y auxinas sintéticas estimulan el enraizamiento de los esquejes. Las más eficaces son el

ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y el ácido indolacético (AIA). El nivel de la auxina puede aumentar con relación a la neoformación de raíces. La elección de las concentraciones, combinaciones y eventualmente de las secuencias de actuación de los reguladores de crecimiento es esencial para el desencadenamiento y regulación de organogénesis. La elección de compuestos y concentraciones puede realizarse, en principio, apoyándose en consideraciones desarrolladas previamente. El aislamiento de un explante suprime o limita las relaciones fisiológicas, en particular las influencias que provienen de las yemas y las hojas, puede entonces ensayarse con la compensación mediante la aportación de reguladores de crecimiento conocidos y de esta forma analizar las interacciones de los factores en juego; sin embargo, el origen del explante (factores genéticos, edad fisiológica, etc.) tiene una influencia determinante, por ejemplo: los factores genéticos juegan un papel importante en una misma especie, algunos cultivares enraizan fácilmente, mientras otros lo hacen con dificultad, también la edad de la planta madre es un factor bien conocido; los cortes jóvenes tienen generalmente mejor aptitud para la formación de raíces, que los más viejos. Por lo que deduce que los factores importantes son siempre desconocidos o indeterminados.

Moncousin (1991a) menciona que el rol que juegan las auxinas en el enraizamiento adventicio es universalmente admitido; que con sólo una adición incrementa notablemente el enraizamiento adventicio, o cuando la duración de aplicación y la dosis aplicada sean las apropiadas. Como lo menciona Nemeth (1986) citado por Moncousin (1991a) cortes de tallo generalmente responden favorablemente a las adiciones externas pero en cada caso, la relación depende de la edad ontogenética del material de la planta, la auxina natural, la duración de contacto y el tiempo de aplicación.

Weaver (1996) y Margara (1988) afirman que las auxinas estimulan la división celular; por ejemplo, frecuentemente fomentan el desarrollo de callos producido por la rápida formación de células del parénquima, teniendo en cuenta que la

producción de callo esta íntimamente relacionada con la concentración y tipo de auxina, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces. Por lo tanto las auxinas son muy eficaces al iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales. Esta respuesta fue base de la primera aplicación práctica en la agricultura, de sustancias que promueven el crecimiento.

Pierik (1990) menciona que las auxinas AIA, AIB, ANA o 2,4-D, se añaden frecuentemente a los medios nutritivos y que generalmente producen: elongación celular y expansión de tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Menciona que con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se produce raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo. También indica que el AIA, que se produce de forma natural en las plantas, se añaden en concentraciones de 0.0-10.0 mg l⁻¹ y que las auxinas sintéticas, relativamente más activas (AIB, ANA, y 2,4-D), se utilizan en concentraciones más bajas de una auxina débil (AIA), comparada con una auxina fuerte (ANA).

Proceso de formación de raíces

Moncousin (1991b) menciona que la reconstitución del sistema radicular requiere de profundas modificaciones en el metabolismo de cortes, asumiendo una similar ontogénesis de crecimiento para la mayoría de los cortes sin raíces preformadas. Indica que la rizogénesis está dividida en etapas precisas: inducción, activación celular, orientación, organización y expresión de la raíz. Para cada una de estas etapas, uno puede distinguir estados precisos cito-histológicos y bioquímicos, pero variando sensiblemente por algún tratamiento externo.

La formación de las raíces adventicias ha sido descrita con más detalle por Favre (1973) citado por Moncousin (1991b) para los microcortes *in vitro* de *Vitis*, quien distingue esquemáticamente cuatro etapas. La primera está marcada por modificaciones citológicas y consiste esencialmente en una activación general en la base del corte. La segunda etapa está caracterizada por la aparición de divisiones celulares las cuales terminan con la constitución de una masa primaria de células meristemáticas, zona morfogenética de enraizamiento. La tercera etapa abarca la organización de la zona morfogenética de enraizamiento en un meristemo radicular. La última y cuarta etapa corresponde al crecimiento del meristemo radical y la emergencia de la primera raíz.

Margara (1988) explica que la neoformación de los meristemas de raíz resulta siempre de una desdiferenciación celular provocada, que conduce a la producción de células meristemáticas primarias y a la organización de un esbozo meristemático. Las raíces adventicias pueden iniciarse en la base de una yema después de la neoformación previa de un callo cicatricial. La activación de la base del esqueje resulta del aislamiento del fragmento transplantado, lo que entraña consecuencias diversas como perturbaciones locales debidas al “efecto herida”, ruptura de las correlaciones fisiológicas y modificaciones eventuales de polaridad. La reanudación de la actividad mitótica conduce a la formación de un tejido cicatricial, pero puede también conducir a una desdiferenciación más intensa, que lleva a la producción de las células meristemáticas primarias y a la formación de meristemas. Las raíces neoformadas a partir de un callo, bajo las condiciones *in vitro*, provienen de la desdiferenciación local de ciertos tejidos del explante.

Carvalho *et al.* (1989) investigaron con *Pereskia grandifolia* el tipo de tejido y el nivel en que se originan las raíces después de separar las hojas de la planta. Las células del parénquima cortical en la parte basal del pecíolo comenzaron una intensa división celular a partir del tercer día. A partir del quinto día en

adelante en la parte subbasal del tejido vascular del pecíolo, elementos traqueidales comenzaron a obstruirse mientras nuevo floema y principalmente células de xilema fueron producidas a través de una intensa actividad del cambium vascular. Todas estas divisiones aumentaron para dar origen al tejido del callo. A partir del séptimo día se empezaron a desarrollar en la parte basal del callo, filamentos cortos de elementos traqueidales, expandiéndose en diferentes direcciones entre las células del parénquima del callo y el tejido vascular del pecíolo, por lo que estos tejidos mostraron un arreglo complejo; este proceso culminó a los doce días. El callo bien desarrollado se observó 12 días después de la separación de la hoja. Cada primordio de las raíces adventicias a los 12 días formó callo en una corta distancia de la base del pecíolo, como un grupo bien definido de células meristemáticas apicales. En cortes longitudinales de los pecíolos, grupos de células de xilema y floema, localizadas entre la base del tejido vascular del pecíolo y el ápice meristemático de los primordios de las raíces, iniciaron activamente su división y formaron callo.

Antecedentes de enraizamiento *in vitro* de cactáceas.

Mauseth y Halperin (1975) en un primer experimento que se realizó con areolas de *Opuntia polyacantha* establecieron diferentes tratamientos para enraizamiento. Probaron auxinas en forma individual ANA, AIA y 2.4-D, en el tejido más cercano a la yema, la producción de raíces al agregar ANA con una concentración de 10 ppm fue del 100%, las raíces alcanzaron una longitud de 5 ó 6 cm a los 21 días; AIA y 2.4-D también indujeron a enraizamiento, pero este último originó raíces anormales. En un segundo experimento se observó la interacción hormona-hormona que consistió en un pretratamiento con un medio libre de hormonas u hormonas separadas (los mejores tiempos de exposición fueron de 2 a 4 días) y después fue expuesto a un medio que contenía la misma

o diferente hormona, los mejores resultados fueron: medio libre de citocininas-ANA con 92% enraizamiento, BAP-ANA con 80% y GA-ANA con 100% de enraizamiento. Las concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento fueron (BAP 10 ppm, ANA 10 ppm y GA 50 ppm). El tercer experimento consistió en la aplicación simultánea de hormonas (con las combinaciones: BAP 0 ppm + GA 50 ppm, BAP 10 ppm + GA 0 ppm, BAP 10 ppm + GA 50 ppm, BAP 0 ppm + GA 0 ppm; cada una mezclada con las concentraciones de 10, 1.0, 0.1, 0.01 y 0.0 ppm de ANA respectivamente) los tratamientos más eficientes fueron: GA 50 ppm + ANA 10 ppm = 100% de enraizamiento, GA 50 ppm + ANA 1 ppm = 70% de enraizamiento, ANA 10 ppm + BAP 10 ppm = 66% de enraizamiento, ANA 10 ppm + BAP 10 ppm + GA 50 ppm = 80% de enraizamiento.

Johnson y Emino (1977) micropropagaron *Mammillaria elongata* a partir de explantes de tubérculos en MS con diferentes concentraciones de 2,4-D, ANA, AIB, Kinetina, 2-IP, BAP y GA₃. ANA y AIB promovieron la iniciación de raíces, siendo ANA a una concentración de 40-60 mg/l la que resultó con una mejor uniformidad y óptima respuesta al enraizamiento. La respuesta a la propagación de *Mammillaria* a la relación auxina-citocinina fue similar a la de *Opuntia* (Mauseth y Halperin, 1975)

Johnson y Emino (1979) investigaron las diferentes respuestas en cultivo de tejidos en cactáceas de las especies: *Opuntia polyacantha*, *Mammillaria elongata*, *Hylocereus calcaratus*, *Rhipsalis teres*, *Weberocereus biolleyi*, *Erythrorhipsalis pilocarpa*, *Epiphyllum grandiflorum* y *E. phyllanthus*. Utilizaron el medio de MS con varios reguladores de crecimiento, basándose en estudios realizados por ellos en las especies, *Opuntia polyacantha* y *Mammillaria elongata*; el cultivo de callo se obtuvo en todas las especies probadas, la desdiferenciación o elongación de los brotes fue promovida en 4 especies. Comprobaron que cada especie responde a determinada concentración de auxinas para la formación de raíces y de citocininas para la formación de

brotos. En este trabajo solo las especies *Erythrorhopsis pilocarpa* y *Epiphyllum phyllanthus* no enraizaron.

Mauseth (1979) propagó varias especies de cactáceas a partir de yemas axilares, señaló que los brotes que se obtuvieron crecieron por dos fuentes de carbohidratos: la fotosíntesis y la utilización del azúcar en el medio; indicando que los explantes que no enraizaron rápidamente cuando fueron transferidos al suelo pueden ser colocados en un segundo medio de cultivo que contenga alguna auxina (ANA a 10 mg/l es mejor) por varios días, y después establecerlos en suelo. En *Epiphyllum* el crecimiento fue extremadamente rápido y las raíces adventicias se originaron espontáneamente.

Lazarte, *et al.* (1982) obtuvo brotes de *Epiphyllum chrysocardium* a partir de cortes de callo en MS al 50%, 500 mg/l de myo-inositol, 5 mg/l de tiamina.HCl, 20 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar y pH 5.7, suplementado con ANA y BA a diferentes concentraciones. Los brotes con 5 o más yemas fueron transferidos a un medio de enraizamiento similar al medio de desarrollo de brotes suplementado con 0, 0.001, 0.01, y 0.1 mg/l de AIB. Los brotes enraizaron en 2 semanas en todos los tratamientos. Se sabe que esta especie es fácil de enraizar, pero el enraizamiento se incrementa en 0.01 mg/l de AIB.

Holder y Kirkham (1984) obtuvieron plantas de *Echinopsis turbinata* L. con medio basal MS suplementado con kinetina (0 a 6.5 mg/l) y ANA (0.2 mg/l) y MS que contenía kinetina (0.2 mg/l), ANA (0 a 1.4 mg/l) y 2, 4-D (1.1 mg/l). Los brotes enraizaron con o sin 2,4-D y se desarrollaron alrededor de 4 a 5 semanas apareciendo las raíces en 6 a 9 semanas.

Vyskot y Jara (1984) trabajaron bajo la técnica basada en simulación hormonal de crecimiento y desarrollo de meristemas quiescentes *in vitro*, que consiste en cultivo estéril de fragmentos de brotes, incluyendo yemas axilares, en medio nutritivo con agar y bajas concentraciones de auxinas y citocininas (0.5-5 mg/l).

Este método fue aplicado a *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus epachianus*. Los brotes de 5-10 mm de tamaño desarrollados de axilas de mamilas o de areolas fueron individualizados y transferidos a un medio con AIA (1 mg/l) y otro libre de hormonas. En ambas condiciones se indujo al desarrollo de raíces. Finalmente, las plantas bien desarrolladas fueron transplantadas en luz y sustrato de arena en cámaras de cultivo para mantener adecuadamente la alta humedad. Los porcentajes de sobrevivencia fueron altos (80-100%)

Escobar (1985) en estudios realizados de micropropagación y almacenamiento de *Opuntia amyclaea*, el proceso de enraizamiento *in vitro* en todos los tratamientos que incluyeron auxinas, así como los controles se logró la diferenciación de raíces. Las raíces fueron visibles después de 7 días de incubación y en su desarrollo posterior mostraron diferencias morfológicas con relación a la auxina y concentración empleada. Fue evidente que el sistema radical que se indujo con AIB 5×10^{-5} M presentó mayor acumulación de peso fresco y peso seco, disminuyendo en relación directa al reducir la concentración de auxina. El número de raíces primarias fue mayor con relación al aumento de la concentración de AIB, sin embargo, cuando se compararon las 3 concentraciones de AIB con el control, éstas fueron superiores en relación con el desarrollo de raíces. Los tratamientos con ANA no mostraron resultados satisfactorios ya que produjeron una clara inhibición de las raíces y tallos.

Starling (1985) realizó multiplicación de brotes de meristemas apicales de plántulas de *Leuchtenbergia principis*. Los explantes crecieron en un medio MS sólido, sacarosa al 3%, con alta concentración de citocininas y una baja concentración de auxinas (la mejor combinación fue 10 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de ANA). Esta especie normalmente tiene una raíz tuberosa alargada, aunque se experimentó un posible enraizamiento directo, el resultado fue un sistema radicular no natural.

Ault y Blackmon (1987) trabajaron con la especie *Ferocactus acanthodes* bajo la técnica de cultivo de tejidos partiendo de plántulas germinadas *in vitro*. Para la proliferación de brotes axilares se utilizó el medio MS suplementado con 9 g/l de agar, 87.6 mM de sacarosa, 1.1 mM de NaH₂ PO₄. H₂O, 0.9 mM de inositol, 0.2 mM de adenina, 46.5 μM de kinetina, 5.4 μM de ANA, 8.1 μM de ácido nicotínico, 4.9 μM de piridoxina.HCl y 3.0 μM de tiamina.HCl. Los brotes fueron enraizados en el medio de proliferación pero sin la kinetina, ANA y adenina, usando tres concentraciones de sacarosa. El tamaño de los brotes axilares para enraizamiento fue de 5 a 15 mm de altura, aislados y subcultivados en el medio de enraizamiento. Los porcentajes de enraizamiento fueron 96.2% con 14.6 mM de sacarosa, 86.2% con 29.2 mM de sacarosa y, 85.6% con 87 mM de sacarosa. A pesar de que el porcentaje de enraizamiento estadísticamente no resultó significativo entre las tres concentraciones de sacarosa, los brotes mostraron tendencia a marchitarse o crecer más lentamente en la concentración de 87.6 mM de sacarosa. La duración óptima en el medio de enraizamiento fue de 6-12 semanas.

Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) realizaron pruebas preliminares de respuesta a la morfogénesis con *Mammillaria haageana*, basándose en estas pruebas definieron el medio de propagación masiva *in vitro* de plántulas jóvenes de *M. san-angelensis*, que fue muy satisfactorio, teniendo también una buena respuesta morfogenética. Se utilizó medio MS con diferentes concentraciones de BA y ANA. Como una consecuencia de la presencia de ANA, la formación de raíces apareció en algunos brotes cuando determinadas combinaciones de reguladores utilizados le favorecieron como las siguientes, BA 0.01 mg/l + ANA 0.01 mg/l, BA 1.0 mg/l + ANA 0.01 mg/l, BA 0.01 mg/l + ANA 0.1 mg/l, BA 1.0 mg/l + ANA 0.1 mg/l, BA 0.01 mg/l + ANA 1.0 mg/l, BA 0.1 mg/l + ANA 1.0 mg/l, BA 10.0 mg/l + ANA 1.0 mg/l.

Clayton, *et al* (1990) micropropagaron 11 especies raras de cactáceas: *Escobaria missouriensis*, *Escobaria robbinsorum*, *Mammillaria wrightii*, *Pediocactus knowltonii*, *P. winkleri*, *P. bradyi*, *P. paradinei*, *P. despainii*, *Sclerocactus mesae-verdae*, *Sclerocactus spinosior* y *Toumeyia papyracantha*. Todas las especies enraizaron espontáneamente en medio libre de hormonas; sin embargo, diferentes especies enraizaron mejor en medio que contenían auxinas. Los brotes axilares (1 a 2 cm de altura) fueron colocados en medio MS libre de hormonas y en MS suplementado con picloram (0.8 μM), AIA (11.4, 28.5 ó 57.1 μM), AIB(9.8, 24.6, ó 49.2 μM) y/o ANA (10.7, 26.9 ó 53.7 μM) para inducción de raíces. Los brotes enraizados fueron transferidos a medio MS libre de hormonas para continuar su desarrollo después de un mes de exponerlo a las auxinas. Las frecuencias de enraizamiento fueron tomadas al cabo de tres meses de incubación. Algunos brotes de cada especie enraizaron espontáneamente en un medio MS libre de hormonas; sin embargo, la mayoría de las especies mostraron un incremento de enraizamiento después de exponerlo a las auxinas (las mejores concentraciones para *Escobaria missouriensis* y *E. robbinsorum*: ANA 27 μM o AIB 25 μM con $90 \pm 3\%$, para *Mammillaria wrightii* y *Pediocactus knowltonii*: ANA 27 μM o AIB 25 μM con $64 \pm 9\%$, para *Pediocactus knowltonii*, *P. winkleri*, *P. bradyi*, *P. paradinei*: ANA 27 μM o AIB 25 μM o ANA 54 μM + AIA 57 μM con $45 \pm 4\%$ y para *P. despainii*, *Sclerocactus mesae-verdae*, *Sclerocactus spinosior* y *Toumeyia papyracantha*: AIB 25 μM o ANA 54 μM + AIA 57 μM con 7 ± 2). Las plántulas de 2 a 5 cm de altura fueron transplantadas a suelo húmedo pasteurizado conformado de arena nativa, limo nativo, y turba. El porcentaje de enraizamiento fue contabilizado después de tres meses de crecimiento en invernadero, mostrando alto porcentaje de enraizamiento en la mayoría de las especies.

Smith, *et al.* (1991) propagaron *Coryphantha macromeris* a partir de semillas, llevando las plántulas a un proceso de callo y después a la formación de brotes, en donde enraizaron solo el 19%. Para aumentar el porcentaje de

enraizamiento, los brotes fueron individualizados y cultivados en un medio de cultivo MS al 50%, 0.4 mg de tiaminaHCl, 20 g de sacarosa y 1.5 g de gelificante por litro. El experimento inicial de enraizamiento en medio sólido, se comparó con un tratamiento de vermiculita humedecida con medio de enraizamiento (sales MS, tiaminaHCl y sacarosa). Las raíces se formaron a las 4 semanas en baja frecuencia en el medio sólido (20% de brotes enraizados). Veinte semanas después, el 90% de los brotes enraizaron en ambos tratamientos. Los brotes enraizados fueron aclimatados con un 55% de sobrevivencia.

Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) evaluaron la respuesta morfogénica del cactus *Aztekium ritteri*, después de 6 – 8 meses en cultivo *in vitro*, los nuevos brotes obtenidos se utilizaron en diferentes experimentos para la producción de raíces con los siguientes reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones: 1.0 mg/l ANA; 2.0 mg/l ANA; 1.0 mg/l AIB y 2.0 mg/l AIB. Incluyendo la concentración completa y la mitad de MS como tratamientos separados. Cuando los brotes mostraron entre 7 y 10 costillas se individualizaron cuidadosamente y se subcultivaron en el medio de enraizamiento. La formación de raíces fue extremadamente pobre (2/60) cultivados en el medio con 2.0 mg/l de IBA; uno de estos brotes fue transferido a suelo esterilizado.

Rubluo *et al.* (1993) propagaron 3 especies de *Mammillaria*. Después de la propagación masiva, los cactus fueron individualizados y subcultivados hasta que los brotes alcanzaran 10 mm de altura para enraizarlos en un medio MS libre de hormonas. El 100% de los brotes de *M. haageana* y *M. san-angelensis* fueron capaces de desarrollar raíces, donde su sobrevivencia en el invernadero fue total. La especie *M. huitzilopochtli* no fue capaz de desarrollar raíces.

Enríquez (1994) trabajó sobre 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, para después sembrarlos en maceta. Este tipo de tratamiento aseguró un crecimiento uniforme de tallos y raíces a los 60 días.

Pérez, *et al* (1995) desarrollaron sistemas adecuados para la elongación y enraizamiento de los brotes producidos en 11 especies de cactáceas. Para esto se probaron medios de cultivo MS, un pH de 5.8, 3 % de sacarosa, solidificado con 8 – 12 g/l de agar y 500 mg/l de MES como estabilizador de pH; para algunas especies se utilizaron 3 – 5 g/l de polivinilpolipirrolidona para evitar la necrosis por oxidación. Este medio fue suplementado con 0.5 y 1.0 mg/l de AIA o AIB y con o sin 3-5 g/l de carbón activado. Se incubaron con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y aproximadamente a 26 °C. Después de 1-2 meses se registraron los resultados y se determinó el mejor medio para cada una de ellas. Para todas las especies, el enraizamiento *in vitro* de los brotes se obtuvo sin dificultades en los medios de cultivo adicionados con AIA y AIB. El carbón activado al parecer también mostró un efecto benéfico en esta etapa.

Al comparar el enraizamiento *in vivo* e *in vitro*, Yassen-Mohamed *et al*, (1995 a), citado por Villavicencio (1998) 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 producidas *in vivo* presentaron mayor cantidad de pelos radicales, influyendo para una mejor adaptación durante la aclimatación.

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 MAC), 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. A través de titulaciones del ácido málico encontraron que la acidez indicó el incremento de la toma de bióxido de carbono. Con estudios realizados por Malda (1996) con *Coryphantha minima*, Hastock y Nobel (1976) con *Agave desertii*, Seeni y Gnaman (1980) con *Chamaecereus sylvestrii* y, Altesor *et al* (1992), citados por Malda *et al* (1999), concluyeron que las plantas con patrón de fisiología MAC; presentan una alta plasticidad en su fisiología bajo condiciones *in vitro* o en invernadero y son capaces de cambiar de metabolismo MAC a C-3. Teniendo estos antecedentes demostraron estos principios con el activo crecimiento de las especies de *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*. Para ambas especies, se logró el enraizamiento *in vitro* en tratamientos que contenían auxinas AIB y AIA (5 mg/l), en *C. minima* 89% y 87% y, en *O. denegrii* 64% y 57% respectivamente, aunque hubo enraizamiento espontáneo en medio libre de hormonas. El enraizamiento *ex vitro* con estas especies se presentó en porcentajes más bajos que *in vitro*, 77% en *C. minima* y 54% en *O. denegrii*, los valores pueden ser considerados satisfactorios al obtener plantas totalmente enraizadas y aclimatadas a los 4 meses en ambas especies. El porcentaje de sobrevivencia fue alta para plántulas derivadas de enraizamiento espontáneo *in vitro* y *ex vitro* (el porcentaje de enraizamiento *in vitro* con AIB y AIA, espontáneamente *in vitro* y *ex vitro*, en *C. minima* fue 89, 92 y 90 y, en *O. denegrii* 73, 98 y 75 respectivamente).

Singh (1999) regeneró *Coryphantha elephantidens* (Lem.), a partir de callo obtenido de explantes de raíces de brotes enraizados *in vitro*, en medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento; las plántulas regeneradas fueron enraizadas en medio MS libre de reguladores de crecimiento, la iniciación de enraizamiento de los brotes se presentó dos semanas después de la inoculación a este medio. Las raíces formadas fueron gruesas con una longitud promedio de 2.2 cm.

Noguera (1999) con la misma especie *C. elephantidens*, utilizó el medio de cultivo con las sales inorgánicas del medio básico de MS al 100%; el cual fue modificado de acuerdo a los requerimientos de esta cactácea: suplementado con tiamina.HCl (0.5 mg/l), myo-inositol (100 mg/l), sacarosa al 3 % como fuente de carbohidratos, y varias concentraciones de ANA. Todos los tratamientos generaron raíces. Los que reportaron mayores emisiones de raíces fueron 3, 1, 0.5 y 0.3 mg/l de ANA, en cambio el tratamiento con mayor longitud de raíces correspondió al testigo; esto se debió a que el testigo presentó el menor número de raíces emitidas y utilizó sus reservas en el proceso de elongación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del lugar experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mismos que se encuentran ubicados en Buenavista, Saltillo, Coahuila, sobre la carretera Saltillo-Zacatecas, siendo sus coordenadas geográficas 25° 22' Latitud Norte y 101° 1' Longitud Oeste, con una altura promedio de 1743 msnm (CETENAL, 1977)

Sistema radical de *E. micromeris*

Debido a la falta de información bibliográfica sobre la descripción del sistema radicular de *E. micromeris*, se realizaron observaciones en plantas silvestres y propagadas en invernadero y podemos mencionar a grandes rasgos que tiene una raíz principal que se ramifica inmediatamente (fasciculada); es decir con crecimiento determinado, además se encuentra en lugares muy pedregosos y de manera superficial, contando con numerosos pelos radicales (Figura 1).

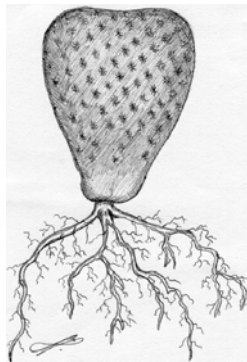


Fig. 1. Planta de *Epithelantha micromeris* donde se muestra su sistema radical.

Obtención del explante

Para contar con el número, el tamaño y la edad de los propágulos para la inducción a enraizamiento, se pasó por un proceso de hidratación, propagación y crecimiento de brotes.

Hidratación del material vegetal

Se partió de plántulas que se obtuvieron de la propagación de *E. micromeris* a partir de semillas germinadas *in vitro* que se tenían en el laboratorio. Para tener material en buenas condiciones para la propagación, a estas plántulas se les realizó un corte en la parte basal con el objetivo de retirar las partes dañadas, desechándose aquellas que estaban muy deshidratadas u oxidadas. Se subcultivaron en frascos de Gerber, con 20 ml de medio de cultivo por frasco. El medio para hidratación estuvo constituido por sales inorgánicas de MS, suplementado con 0.1 g/l de myo-inositol, 0.0005 g/l de ácido nicotínico, 0.0005 g/l de piridoxina.HCl, 0.0001 g/l de tiamina.HCl y 0.002 g/l de glicina, más 0.03 g/l de adenina, 25 g/l de sacarosa, 3 g/l de polivinilpirrolidona como antioxidante, 9 g/l de agar y, con pH de 5.7. Se esterilizó el medio en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En cada frasco se colocaron 4 explantes que se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 25°C±1 durante un mes (Figura 2).

Propagación de *E. micromeris*

Después de hidratar el material vegetal, se seleccionaron aquellas plántulas que presentaron buena apariencia: color verde intenso, tejido firme, turgente y se procedió cortar 5 mm aproximadamente del ápice para utilizarlos como

explantes, que se subcultivaron en medio nutritivo para inducir la propagación. Se colocaron 3 ápices por frasco y se mantuvieron durante dos meses en el cuarto de incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. El medio de cultivo para la propagación de *E. micromeris* se conformó por sales inorgánicas de MS, suplementado con 0.13175 g/l de NaH_2PO_4 , 0.1 g/l de myo-inositol, 0.001 g/l de ácido nicotínico, 0.001 g/l de piridoxina.HCl, 0.001 g/l de tiamina.HCl, 0.03 g/l de adenina, 1.0 mg/l de cinetina, 20 g/l de sacarosa, 9 g/l de agar y pH de 5.7. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos (Figura 2).

Crecimiento de los brotes de *E. micromeris*

Los brotes obtenidos del medio de cultivo de micropropagación fueron aislados y subcultivados a un medio de crecimiento, colocándose 4 explantes por frasco. También se realizó el subcultivo de los explantes en forma agrupada (de 5 a 15 brotes por ramillete / frasco) para crecimiento. Los explantes subcultivados de forma individual se mantuvieron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 meses, y los subcultivados en forma grupal durante 4 meses. El medio de cultivo de crecimiento constó de sales inorgánicas de MS, 0.1 g/l de myo-inositol, 0.001 g/l de ácido nicotínico, 0.001 g/l de piridoxina.HCl, 0.001 g/l de tiamina.HCl, 0.13175 g/l de NaH_2PO_4 , 20 g/l de sacarosa, 9 g/l de agar y pH de 5.7. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos (Figura 2).

Inducción a enraizamiento

Para llevar a cabo el experimento de la inducción a enraizamiento *in vitro*, se plantearon dos experimentos:

Experimento 1. Los explantes en este experimento provenían del medio de cultivo de crecimiento en forma grupal, con edad de 4 meses, con brotes de 1 cm de altura y 0.5 cm de grosor en promedio. Se eligieron los ejemplares que mostraron mejor apariencia (verde intenso, tejido firme, turgente y sin problemas de vitrificación). Al momento de pasarlos al medio de cultivo los brotes fueron individualizadas (Figura 2).

El medio de cultivo para enraizamiento contenía: sales inorgánicas MS, 0.1 g/l de myo-inositol, 0.001 g/l de ácido nicotínico, 0.001 g/l de piridoxina.HCl, 0.001 g/l de tiamina.HCl, 0.13175 g/l de NaH_2PO_4 , 20 g/l de sacarosa, 9 g/l de agar y pH de 5.7, además de diversas concentraciones de auxinas, que constituyeron los 12 tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones de auxinas en el medio de cultivo MS para enraizamiento *in vitro* de propágulos de *E. micromeris* de cuatro meses de edad.

Tratamientos	Concentración de auxina
1	ANA 0 mg/l
2	ANA 1.0 mg/l
3	ANA 3.0 mg/l
4	ANA 5.0 mg/l
5	AIB 0 mg/l
6	AIB 1.0 mg/l
7	AIB 3.0 mg/l
8	AIB 5.0 mg/l
9	AIA 0 mg/l
10	AIA 1.0 mg/l
11	AIA 3.0 mg/l
12	AIA 5.0 mg/l

Por cada tratamiento se utilizaron 4 frascos, en cada frasco se colocaron 4 explantes, cada propágulo se tomó como una repetición, siendo en total 16

repeticiones por tratamiento. Los propágulos se mantuvieron en el medio de cultivo de enraizamiento durante un mes, después fueron subcultivados en un medio de cultivo libre de hormonas por tres meses, durante este tiempo los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Experimento 2. Los explantes que se utilizaron en este segundo experimento fueron propágulos que se cultivaron de manera individual en el medio de crecimiento, con una edad de 10 meses, alcanzando un tamaño promedio de 2 cm de altura y 1 cm de grosor, se eligieron los ejemplares de mejor apariencia. Se les retiró la parte basal con la finalidad de eliminar partes viejas, callos o algunas partes oxidadas (Figura 2).

El medio de cultivo para enraizamiento contenía: sales inorgánicas MS, 0.1 g/l de myo-inositol, 0.001 g/l de ácido nicotínico, 0.001 g/l de piridoxina.HCl, 0.001 g/l de tiamina.HCl, 0.13175 g/l de NaH_2PO_4 , 20 g/l de sacarosa, para evitar la sobrehidratación o vitrificación de los tejidos de los explantes se incrementó la concentración de agar al medio de cultivo, de 9 a 9.5 g/l 9.5 g/l, y concentraciones de auxinas similares a las establecidas en el Experimento 1, formándose los 12 tratamientos (Cuadro 2). Finalmente el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7.

Cuadro 2. Concentraciones de auxinas en el medio de cultivo MS para enraizamiento *in vitro* de propágulos de *E. micromeris* de diez meses de edad.

Tratamientos	Concentración de auxina
1	ANA 0 mg/l
2	ANA 1.0 mg/l
3	ANA 3.0 mg/l
4	ANA 5.0 mg/l
5	AIB 0 mg/l
6	AIB 1.0 mg/l
7	AIB 3.0 mg/l
8	AIB 5.0 mg/l
9	AIA 0 mg/l
10	AIA 1.0 mg/l
11	AIA 3.0 mg/l
12	AIA 5.0 mg/l

Por cada tratamiento se utilizaron 4 frascos, en cada frasco se colocaron 3 explantes, cada propágulo se tomó como una repetición, siendo en total 12 repeticiones por tratamiento. Los propágulos se establecieron en el medio de cultivo de enraizamiento durante un mes, después fueron subcultivados en un medio de cultivo libre de hormonas por tres meses, durante este tiempo se mantuvieron en el cuarto de incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Metodología de evaluación

Los parámetros a evaluar en los experimentos descritos anteriormente fueron: número de raíces / propágulo, longitud de las raíces / propágulo y, peso fresco y peso seco de las raíces.

El número de raíces se tomó a los 30, 60 Y 90 días después de establecido el experimento. La longitud de raíces se registró a los 120 días, es decir al finalizar el experimento; esto para evitar la contaminación de los propágulos al momento de tomar los datos.

Para registrar el peso fresco y seco se planteó tomar una muestra de raíces de cada tratamiento al finalizar el experimento, pesarlos en una balanza analítica y por último, determinar el peso seco después de haber expuesto las raíces en una estufa a $70\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. A partir de las variables peso fresco y peso seco se determinaría el contenido relativo de materia seca (CRMS) y de agua (CRA) aplicando las fórmulas propuestas por Escobar en 1985.

$$\text{CRMS (\%)} = \text{PS/PF} \times 100$$

$$\text{CRA (\%)} = \text{PF-PS/PF} \times 100$$

Donde:

CRMS= Contenido relativo de materia seca

CRA= Contenido relativo de agua

PF= Peso fresco

PS= Peso seco

Para registrar los datos de los parámetros a evaluar, se diseñó el siguiente cuadro, para ambos experimentos:

Cuadro 3. Número de raíces, longitud de raíces, peso fresco y seco de raíces de propágulos de *E. Micromeris*.

# de Frasco⇒	# de raíces a los 30 días				# y longitud de raíces a los 60 días (cm)				Peso fresco y peso seco al final de los experimentos. (g)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
ANA 0 mg/l												
1 mg/l												
3 mg/l												
5 mg/l												
AIB 0 mg/l												
1 mg/l												
3 mg/l												
5 mg/l												
AIA 0 mg/l												
1 mg/l												
3 mg/l												
5 mg/l												

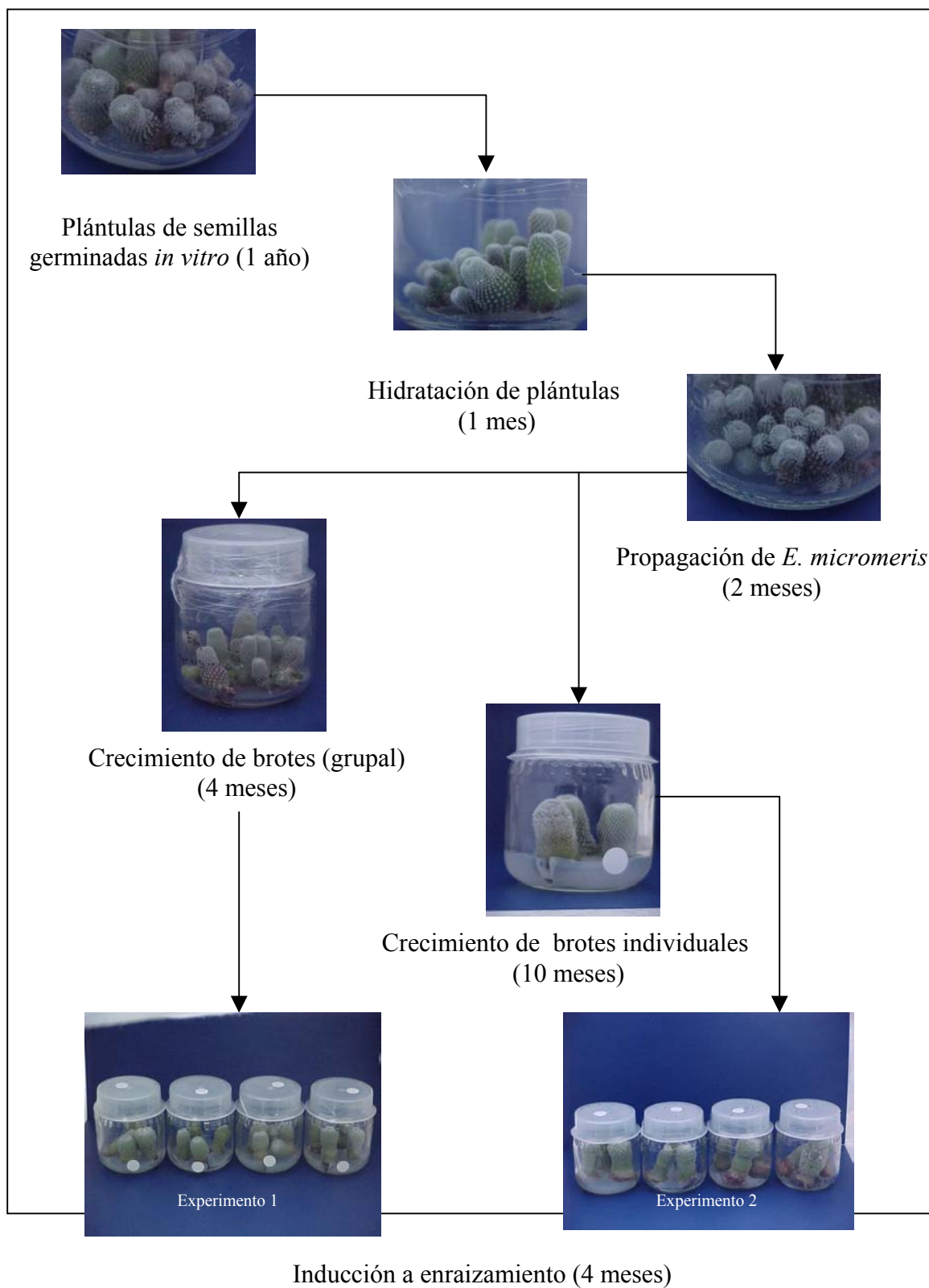


Fig. 2. Esquema general para la generación de propágulos e inducción a enraizamiento de *E. micromeris*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de pasar a los propágulos de *Epithelantha micromeris* por el proceso de hidratación, propagación y crecimiento, se llevó a cabo la inducción a enraizamiento, obteniéndose los siguientes resultados:

Resultados del Experimento 1

Los propágulos de 4 meses de edad se colocaron en medio nutritivo para la inducción a enraizamiento y al cabo de 4 meses se evaluaron. El porcentaje de enraizamiento de los propágulos resultó sumamente bajo en los 12 tratamientos; en el tratamiento 2 (ANA 1.0 mg/l) el porcentaje de enraizamiento fue de 0, en los tratamientos 3 y 7 (ANA y AIB a concentración de 3.0 mg/l) el porcentaje de enraizamiento fue de 6.2, en los tratamientos 5, 6, 9, 10, 11, y 12 (AIB 0 mg/l, AIB 1.0 mg/l y AIA a concentraciones de 0, 1.0, 3.0 y 5.0 mg/l) el porcentaje de enraizamiento fue de 12.5 y finalmente en los tratamientos 1, 4, y 8 (ANA 0 mg/l, ANA 5.0 mg/l y AIB 5.0 mg/l) Cuadro 4. Es decir no hubo diferencias en el porcentaje de enraizamiento de propágulos entre los testigos y las auxinas usadas ANA, AIB y AIA a concentraciones de 1.0 mg/l, 3.0 mg/l y 5.0 mg/l).

Cuadro 4. Porcentaje de enraizamiento de propágulos de 4 meses de edad de *E. micromeris* después de 1 mes en el medio de enraizamiento y 3 meses en medio libre de hormonas.

Tratamientos	Concentración de auxina	% de enraizamiento
1	ANA 0 mg/l	18.7
2	ANA 1.0 mg/l	0
3	ANA 3.0 mg/l	6.2
4	ANA 5.0 mg/l	18.7
5	AIB 0 mg/l	12.5
6	AIB 1.0 mg/l	12.5
7	AIB 3.0 mg/l	6.2
8	AIB 5.0 mg/l	18.7
9	AIA 0 mg/l	12.5
10	AIA 1.0 mg/l	12.5
11	AIA 3.0 mg/l	12.5
12	AIA 5.0 mg/l	12.5

*ANA= Ácido naftalenacético, AIB= Ácido indolbutírico y AIA= Ácido indolacético

Al término del experimento, los propágulos de los diferentes tratamientos manifestaron eventos importantes de mencionar. Como lo indica el Cuadro 5, el tipo de auxina intervino en la calidad de cicatrización, consistiendo ésta en la formación de callo para el taponamiento de la base del corte de los propágulos, para valorarla se realizaron observaciones visuales; tomando como 100% de cicatrización toda la base del corte de los propágulos. Donde se observó la mejor cicatrización fue en AIB con un 90%, decreciendo con AIA y ANA a 70 y 50% respectivamente, sin presentarse diferencias entre las concentraciones de cada auxina. La formación excesiva de callo, masa amorfa de células en la base de los propágulos, se presentó en los tratamientos con ANA, 3 y 5 mg/l, siendo más voluminosos en la concentración mayor (Figura 7).



Fig. 3. Propágulo sin raíz y plántula con raíz de 8 meses de edad de *E. micromeris*.



Fig. 4. Plántula de *E. micromeris* de 8 meses de edad con raíz.



Fig. 5. Completa cicatrización en la base de los propágulos de *E. micromeris* a los 8 meses de edad.



Fig. 6. Vista lateral de la cicatrización de un propágulo de *E. micromeris* a los 8 meses de edad.



Fig. 7. Formación de callo en propágulos de *E. micromeris* de 8 meses de edad con ANA a 5 mg/l.

Cuadro 5. Porcentaje de cicatrización en propágulos de *E. micromeris* jóvenes (4 meses de edad), después de 4 meses de desarrollo.

Auxina	% de cicatrización
Ácido naftalenacético	50
Ácido indolbutírico	90
Ácido indolacético	70

Resultados del Experimento 2

Los propágulos de 10 meses de edad se colocaron en medios nutritivos para la inducción a enraizamiento y al cabo de 4 meses se evaluaron. Los propágulos manifestaron un enraizamiento nulo en todos los tratamientos (ANA, AIB, y AIA a concentraciones de 0, 1.0, 3.0, y 5.0 mg/l) como lo indica el Cuadro 6.

Esta nula respuesta al enraizamiento de los propágulos, parece relacionarse principalmente a la edad del explante; entre más sea la edad de los explantes la capacidad de sintetizar auxinas se reduce (Margara, 1988; Bidwell, 1993; Moncousin, 1991 a).

Cuadro 6. Porcentaje de enraizamiento de propágulos de 10 meses de edad de *E. micromeris* después de 1 mes en el medio de enraizamiento y 3 meses en medio libre de hormonas.

Tratamientos	Concentración de auxina	% de enraizamiento
1	ANA 0 mg/l	0
2	ANA 1.0 mg/l	0
3	ANA 3.0 mg/l	0
4	ANA 5.0 mg/l	0
5	AIB 0 mg/l	0
6	AIB 1.0 mg/l	0
7	AIB 3.0 mg/l	0
8	AIB 5.0 mg/l	0
9	AIA 0 mg/l	0
10	AIA 1.0 mg/l	0
11	AIA 3.0 mg/l	0
12	AIA 5.0 mg/l	0

*ANA= Ácido naftalenacético, AIB= Ácido indolbutírico y AIA= Ácido indolacético

En lo que se refiere a la cicatrización en la base del corte de los propágulos después de 4 meses, Cuadro 7, la mejor cicatrización se logró en AIB con un 75%, reduciéndose de manera considerable con AIA y ANA a un 50%, sin presentarse diferencias entre las concentraciones de cada auxina. Se presentó la formación excesiva de callo en los tratamientos con ANA 5 y 3 mg/l, Figura 10, siendo más voluminosos en la concentración mayor.

Cuadro 7. Porcentaje de cicatrización en propágulos de *E. micromeris* de 10 meses de edad, después de 4 meses de desarrollo.

Auxina	% de cicatrización
Ácido naftalenacético	50
Ácido indolbutírico	75
Ácido indolacético	50

Al comparar los resultados de la cicatrización entre los propágulos de los dos experimentos se constató una reducción de cicatrización en los propágulos de mayor edad, Figuras 8 y 9, donde la formación de callo para el taponamiento de la base de los propágulos de 14 meses fue reducida considerablemente en comparación con los propágulos de 8 meses, Cuadros 5 y 7.

La formación de callo en los propágulos de los experimentos 1 y 2 (8 y 14 meses de edad respectivamente) se debió principalmente a la concentración y tipo de auxina aplicada al explante (Margara, 1988; Pierik, 1990; Weaver, 1996; Hurtado y Merino, 2000). *E. micromeris* presentó formación de callo con ANA; la cual es clasificada dentro de las auxinas fuertes (Pierik, 1990), por lo tanto es coherente que se incremente la formación de callo al aumentar la concentración de 3 a 5 mg/l de ANA; en *Opuntia amyclaea* se dió una respuesta similar (Escobar, 1985).

Por lo anterior se puede afirmar que el tipo de auxina junto con la edad de los propágulos intervienen en la calidad de cicatrización y en la formación excesiva de callo. Además podemos decir que la respuesta de enraizamiento de algunos propágulos del Experimento 1, Figuras 3 y 4, aparte de responder a la edad juvenil (8 meses de edad), también se benefició por una mejor cicatrización de la base de los propágulos, Figuras 5 y 6, y a la activación de la base del explante después del aislamiento del fragmento transplantado (Margara, 1988)

La mayoría de las investigaciones que se han realizado *in vitro* con especies de cactáceas, indican que existe una concentración endógena suficiente de auxinas, que permite el enraizamiento de los explantes en el mismo medio de propagación o en un medio libre de hormonas; también se ha demostrado que el adicionarles una auxina exógena adecuada eleva el nivel de eficientización de enraizamiento. Algunas cactáceas no son capaces de desarrollar raíces en estas condiciones y requieren ser subcultivadas en medios específicos para poder formar raíces. Existen otras especies que no responden al enraizamiento

in vitro aun agregándoles auxinas, como la especie *Leuchtenbergia principis* (Starling, 1985) u otras que son vulnerables al tipo o concentración de auxina y presentan inhibición clara de raíces y tallos como en *Opuntia amyclaea* (Escobar, 1985). *Epithelantha micromeris* presenta un comportamiento parecido; ya que no responde a la formación de raíces en un medio libre de hormonas, ni en medio con diferentes auxinas (ANA, AIB y AIA) a concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 mg/l.

Los explantes manejados *in vitro* cuentan con las condiciones ideales para desarrollarse sin tener la necesidad de crear un sistema radical para llevar a cabo sus funciones. Investigaciones realizadas por Malda *et al.* (1999) explican este comportamiento, indicando que existe una mejor capacidad de las cactáceas de crecimiento y desarrollo bajo condiciones *in vitro*, pues las plantas con fisiología CAM en su hábitat natural, tienen la habilidad de cambiar este patrón de metabolismo a C-3. En *E. micromeris* se observó la misma respuesta acelerando notablemente el crecimiento de la parte aérea y de una manera muy efectiva pero sin responder a la inducción a enraizamiento bajo las condiciones *in vitro*.

La mayoría de los trabajos donde se logró el enraizamiento *in vitro* reportan, para que éste se diera, desde 7 días hasta 16 semanas (Mauseth y Halperin, 1975; Mauseth, 1979; Lazarte *et al.*, 1982; Holder y Kirkham, 1984; Escobar, 1985; Ault y Blackmon, 1987; Clayton *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1995; Malda *et al.*, 1999 y Singh, 1999). Lo observado en *E. micromeris* en el proceso de enraizamiento *in vitro* (propágulos colocados en un medio de cultivo de enraizamiento durante un mes y 3 meses en un medio libre de hormonas), indica claramente que no se encontraron las condiciones óptimas para que se lograra el enraizamiento de los propágulos.

Para poder explicar los resultados anteriores debemos comprender que la manifestación del enraizamiento *in vitro* depende de la interacción de muchos

elementos, como factores biológicos: especie, tipo y tamaño de explante, edad, estado fisiológico del tejido, nivel de concentración endógena de auxina, hábitos de crecimiento y, factores ambientales: composición del medio de cultivo, número de subcultivos, tipo y concentración de auxina exógena, duración de contacto y condiciones de incubación, como lo mencionan Margara, 1988; Carvalho, *et al.* 1989; Merino y Hurtado, 2000; Moncousin, 1991a; Weaver, 1996; Aguilar y Dubrovsky, 1999; Bidwell, 1993.



Fig. 8. Irregular cicatrización de la base de propágulos de *E. micromeris* a los 18 meses de edad.



Fig. 9. Vista lateral de la cicatrización de la base de un propágulo de *E. micromeris* de 18 meses de edad.



Fig. 10. Formación de callo en propágulo de 14 meses de edad con ANA a 3 mg/l.

CONCLUSIONES

- * El efecto de las auxinas ANA, AIB y AIA a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 mg/l no fue decisiva y clara en los propágulos de *E. micromeris* de 4 meses de edad, las cuales presentaron un índice de enraizamiento muy bajo.
- * Las auxinas ANA, AIB y AIA a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 mg/l no tuvo influencia en la formación de raíces en ninguno de los propágulos de *E. micromeris* de 10 meses de edad.
- * La edad de las propágulos resultó ser el factor más importante para que se manifestara el enraizamiento, pues éste se produjo en los propágulos jóvenes de 4 meses de edad y no se manifestó el enraizamiento en los propágulos de edad más avanzada (10 meses).

RESUMEN

Epithelantha micromeris esta considerada de acuerdo a los criterios de la NOM-059-ECOL-1994 y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN) como rara y en peligro de extinción respectivamente. Se ha propagado satisfactoriamente en cultivo *in vitro*, pero a diferencia de la mayoría de las cactáceas propagadas bajo estas condiciones, no se da el enraizamiento. Esto ha sido una limitante para culminar el proceso de propagación en esta especie. Por lo que se recurrió a la inducción de enraizamiento *in vitro* con aplicación de diferentes tipos de auxina y concentraciones de las mismas.

Se establecieron 2 experimentos con propágulos de diferentes edades, en el Experimento 1 se utilizaron propágulos de 4 meses de edad y en el Experimento 2 de 10 meses. Se colocaron durante 1 mes en un medio de enraizamiento que contenía: sales inorgánicas MS, 0.1 g/l de myo-inositol, 0.001 g/l de ácido nicotínico, 0.001 g/l de piridoxina.HCl, 0.001 g/l de tiamina.HCl, 0.13175 g/l de NaH_2PO_4 , 20 g/l de sacarosa, agar (9 g/l en el Experimento 1 y 9.5 g/l en el Experimento 2) y pH de 5.7, con 3 tipos de auxina ANA, AIB y AIA a diversas concentraciones (0. 1, 3 y 5 mg/l) que constituyeron los 12 tratamientos. Después se trasvasaron al mismo medio de cultivo libre de auxinas durante 3 meses. En el Experimento 1 el enraizamiento fue bajo, mientras que en el Experimento 2 el enraizamiento fue nulo, dándose una influencia clara de la edad de los propágulos. El efecto de las tres auxinas no fue clara ni decisivo para que se manifestara el enraizamiento en los propágulos de 4 meses y para que no se manifestara en los propágulos de 10 meses de edad.

También se observó la calidad de cicatrización relacionada a la edad de los propágulos y tipo de auxina; en los propágulos de mayor edad (14 meses; 10 meses edad inicial y 4 de desarrollo) se presentó una menor cicatrización en comparación con los propágulos de 8 meses de edad (4 meses edad inicial más 4 meses de desarrollo); en lo que se refiere al tipo de auxina, el comportamiento fue similar en ambos experimentos, se presentó una mejor cicatrización en la base del corte de los propágulos en los tratamientos donde se adicionó AIB con un 90 y 75% (Experimentos 1 y 2 respectivamente), con AIA la cicatrización fue de 70 y 50% (Experimentos 1 y 2 respectivamente), con ANA el porcentaje de cicatrización fue de 50% en los dos tipos de propágulos. Asimismo se presentó la formación de callo de una manera excesiva en la base de los cortes de los propágulos de ambos experimentos en presencia de ANA en las concentraciones 3 y 5 mg/l, siendo de mayor tamaño en la concentración de 5 mg/l.

No se encontraron las condiciones para que se lograra la formación de un sistema radical capaz de asegurar la sobrevivencia de *Epithelantha micromeris* en la etapa de aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. J. M. y J. G. Dubrovsky. 1999. **Crecimiento determinado de la raíz primaria de *Stenocereus gummosus* como un programa de desarrollo.** (p: 70). In Marco Antonio Vásquez Dávila (Editor), *Cactáceas y otras Plantas Suculentas II Congreso Mexicano y I Congreso Latinoamericano y del Caribe. Memorias*, Oaxaca, México, 1999.
- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1987. In Vitro **Propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae).** HortScience 22(1): 126-127.
- Bertaud, A. G. 1998. **Propagación de *Ariocarpus kostchoubeyanus* (Lemaire) y *Epithelantha micromeris* (Engelmann) (Cactaceae; Cacteeae) a partir de plántulas germinadas *in vitro*.** Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 51 p.
- Bidwell, R. G. S. 1993. **Fisiología vegetal.** Editorial AGT, México. 784 p.
- Bravo-Hollis, H. 1978. **Las cactáceas de México.** Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. I, 743 p.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. **Las cactáceas de México.** Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. II, pp:237-257.
- Carvalho, M. A. M, W. R. Monteiro and S. M. C. Dietrich. 1989. **Histological Aspects of Root Formation in Petioles of Detached Leaves of *Pereskia grandifolia***

(Cactaceae): Natural Conditions of Effects of GA₃ and Dark. Annals of Botany 63: 505-514.

Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger, G. C. Phillips and S. Ann Butler-Nance. 1990. **Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae.** Soc. Hort. Sci. 115(2); 337-343.

Comisión de Estudios del Territorio Nacional. (CETENAL). 1977. Saltillo, Carta geológica. G-1473. Escala 1:50000. Saltillo, Coahuila, México.

Dubrovsky, J. G., L. Contreras-Burciaga and V. B. Ivanov. 1998. **Cell Cycle Duration in the Root Meristem of Sonoran Desert Cactaceae as Estimated by Cell-flow and Rate-of-cell-production Methods.** Annals of Botany 81: 619-624.

Dubrovsky, J. G. 1997. **Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance.** Planta 203: 85-92.

Dubrovsky, J. G. 1999. **Developmental adaptations of roots in desert Cactaceae.** (p: 22). In Marco Antonio Vásquez Dávila (Editor), Cactáceas y otras Plantas Suculentas. II Congreso Mexicano y I Congreso Latinoamericano y del Caribe. Memorias, Oaxaca, México, 1999.

Elizondo, E. J. L., J. Valdés y A. Rodríguez. 1990. **Cactáceas vulnerables y en peligro de extinción para Coahuila, México.** BIOTAM 2(2): 17-22.

Enríquez, L. A. 1994. **Micropropagación y aclimatación de *Neolloydia* ssp.** Tesis profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 104 p.

- Escobar, A. H. A. 1985. **Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea***. Tesis de Maestría en Ciencias Especialista en Fruticultura. Colegio de Postgraduados. 80 p.
- Glass, C. E. 1998. **Guía para la Identificación de Cactáceas Amenazadas de México**. Vol. 1. Editorial CANTE-CONABIO. México. pp: 55 y 56.
- Heras, C. M. G. 1990. **Germinación y cultivo de tejidos de especies de cactáceas**. Tesis profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 68 p.
- Holder, P. L. and M. B. Kirkham. 1984. **Tissue-culture propagation of cactus *Echinopsis turbinata* L.** Annals of Arid Zone 23(2): 95-97.
- Hurtado, M. D. V. and M. E. Merino. 2000, 5ª edición. **Cultivo de Tejidos Vegetales**. Editorial Trillas, México. 232 p.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1977. **Tissue Culture Propagation of *Mammillaria elongata* as Influenced by Plant Growth Regulators**. HortScience 12(4): 394 (Abstract)
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1979. **Tissue Culture Propagation in the Cactaceae**. Cactus and Succulent Journal (U.S.) 51: 275-277.
- Lazarte, J. E., M. S. Gaiser and O. R. Brown. 1982. ***In Vitro* Propagation of *Epiphyllum chysocardium***. HortScience 17(1): 84.
- 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.

- Margara, J. 1988. **Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro***. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. 230 p.
- Martínez-Vázquez, O. and A. Rubluo. 1989. ***In-vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada**. Journal of Horticultural Science 64(1): 99-105.
- Mauseth, J. D. and W. Halperin. 1975. **Hormonal control organogenesis in *Opuntia polyacantha* (CACTACEAE)**. Amer. J. Bot. 62 (8): 869-877.
- Mauseth, J. D. 1979. **A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds**. Cactus & Succulent Journal (U.S.) 51: 186-187.
- Moncousin, Ch. 1991a. **Rooting of microcuttings; general aspects**. Acta Hort. 289: 301-310.
- Moncousin, Ch. 1991b. **Rooting of microcuttings: fundamental aspects**. Acta. Hort. 289: 311- ?.
- Nobel, P. S. 1998. **Los incomparables Agaves y Cactus**. Editorial Trillas, México. pp: 95-114.
- Noguera, L. L. M. 1999. **Propagación *in vitro* de la cactácea *Coryphantha elephantidens***. Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. 82 p.
- Pérez, M. B. E., E. Villalobos, E. Meza y H. Lizalde. 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.

- Pierik, R. N. M. 1990. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. 326 p.
- Rodríguez-Garay, B. and A. Rubluo. 1992. **In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker)**. Cactus and Succulent Journal (U.S.), Vol. 64: 116-119.
- Rodríguez, G. L. y R. R. Apezteguía. 1980. **Cactus y otras Suculentas en Cuba**. Editorial Científico-Técnica, Ciudad de la Habana. p: 31.
- Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez and O. Martínez-Vázquez. 1993. **Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti through in-vitro culture**. Biological Conservation 63:163-169.
- Singh, B. B. 1999. **Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants**. Scientia Horticulturae 81: 337-344.
- Smith, R. H., P. J. Burdick, J. Anthony, and A. A. Reilley. 1991. **In Vitro Propagation of *Coryphantha macromeris***. HortScience 26(3): 315.
- Sociedad Mexicana de Cactología A. C. **Las cactáceas y suculentas mexicanas**. <http://cactus-mall.com/smc/scerca.html>.
- Starling, R. 1985. **In vitro Propagation of *Leuchtenbergia principis***. Cactus & Succulent Journal (U.S.) 57: 114-115.
- Villavicencio, G. E.E. 1998. **Cultivo *in vitro* de dos especies de cactáceas (*Astrophytum myriostigma* Lem. y *Astrophytum capricorne* (Diertr.) Britton y Rose) amenazadas de extinción**. Tesis de Maestría en Ciencias Especialidad de Forestal. Colegio de Postgraduados. México. 115 p.

Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. **Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro***. Journal of Horticultural Science 59(3): 449-452.

Weaver, R. J. 1996. **Reguladores de Crecimiento de las Plantas de la Agricultura**. Editorial Trillas, México. 622 p.