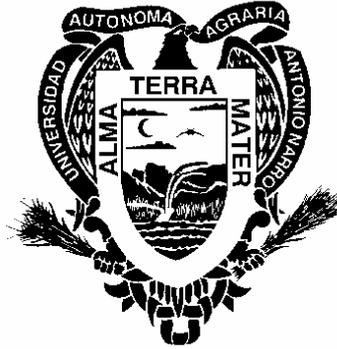


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA - DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Germinación *in vitro* de dos especies de cactáceas de los generos *Mammillaria* y *Turbinicarpus*, en estatus de riesgo

POR:

ELIZABET RAMIREZ CANO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA - DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Germinación *In vitro* de dos especies de cactáceas del género *Mammillaria* y *Turbinicarpus* en estatus de riesgo

TESIS

POR:

ELIZABET RAMIREZ CANO

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

ING. EN AGROBIOLOGÍA

APROBADA

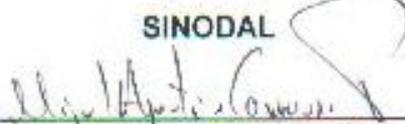
PRESIDENTE DEL JURADO


M. C. Sofia Comparán Sánchez

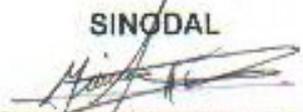
**ASESOR PRINCIPAL EXTERNO
(INEAP)**


M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

SINODAL


Biol. Miguel A. Carranza Pérez

SINODAL


M. C. Guillermo Ramírez Esquivel

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

**División de Agronomía
Coordinación.**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2008.

Agradecimientos.

A **Dios** por permitirme estar aquí y ahora, y por no dejarme nunca de su mano.

A la **Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"** por ser una institución humanitaria y maternal, por hacernos sentir sus hijos en nuestro paso por sus instalaciones. Por permitirme realizar mis estudios y ser una mejor mexicana. Por seguir siendo "El Alma Terra Mater" de todos aquellos que quieren superarse.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP** por aceptarme en su institución para realizar mis practicas profesionales y mi tesis de licenciatura en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, brindándome confianza y conocimientos que llevare siempre conmigo. Por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis, dentro de sus proyectos e instalaciones

Al **SNICS-SINAREFI** por su importante aportación para realización de este trabajo.

A la **Biol. Sofía Comparán Sánchez**, por brindarme su apoyo, disposición y asesoría en este trabajo. Por su paciencia, tiempo, comprensión y conocimientos brindados durante toda mi formación profesional.

A la **M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez**, por confiar en mí al realizar mis prácticas profesionales, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo en mi estancia en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. Por su amistad y comprensión. Por sus conocimientos, tiempo y paciencia en su atenta labor como asesora en la realización de este trabajo.

Al **Biol. Miguel Agustín Carranza Pérez** por su valiosa participación como asesor de mi trabajo de tesis. Por su confianza, conocimientos y aliento durante mi formación profesional.

Al **M.C. Guillermo Ramírez Esquivel** por su valiosa participación como asesor de mi trabajo de tesis. Por su valioso tiempo y paciencia.

A **todos mis maestros** que de una y mil maneras sembraron en mi sus conocimientos, se los agradeceré por siempre, buscare transmitirlos a los demás para que permanezcan y se sirvan de ellos como lo hice yo.

Dedicatoria.

Dedicada a mis padres **Gerardo Ramírez Hernández y Minerva Cano Cantú** por confiar en mí y brindarme lo mejor de ellos durante toda mi vida, por permanecer junto a mí en mis triunfos y fracasos, por ser ellos mis padres.

A mis hermanos **Eliezer, Elizama y Eliseo Ramírez Cano** por ser pilares en mi vida, por su ayuda emocional, económica y de cualquier índole durante todo este tiempo.

A mi familia, mi esposo **Melchor Padilla Meza** y a mi hija **Meliza Y. Padilla Ramírez** por ser el motivo por el cual luchar cada día. Porque son el motor de mi vida, los que me impulsan a ser mejor, por que me brindan paz y la felicidad en este mundo donde todo es una competencia.

A mis amigos **Francisco A. Esquivel Sánchez, Olivia Olivar Villaldama, Olga A. García Ramos, Andrea Esquivel Betancourt y Gladis R. Gonzales Salas** por llenarme de gratos momentos al brindarme su apoyo, confianza y conocimientos, durante toda mi formación profesional y porque seguirán formando parte de mi vida por siempre. A todos aquellos que en parte me regalaron su amistad y apoyo, los llevo en mi mente y corazón.

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

ÍNDICE GENERAL

Página

| | |
|---|------|
| ÍNDICE DE CUADROS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| Resumen..... | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Objetivo general..... | 4 |
| 1.2. Objetivos específicos..... | 4 |
| 1.2. Hipótesis..... | 4 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| 2.1. Etimología de la palabra cactus..... | 5 |
| 2.1.2. Distribución y hábitat..... | 5 |
| 2.1.3. Descripción botánica de la familia Cactáceae..... | 6 |
| 2.1.4. Características fisiológicas..... | 6 |
| 2.1.5. Importancia económica y ecológica..... | 7 |
| 2.1.6. Principales amenazas..... | 8 |
| 2.2. Características del género <i>Mammillaria</i> Haworth..... | 9 |
| 2.2. 1. Clasificación Taxonómica..... | 10 |
| 2.2.2. <i>Mammillaria backebergiana</i> , Buchenau..... | 10 |
| 2.2.2.1. Distribución..... | 11 |
| 2.2.2.2. Estatus..... | 11 |
| 2.2.3. <i>Mammillaria pringlei</i> J. Coulter..... | 12 |
| 2.2.3.1. Distribución..... | 13 |
| 2.2.3.2. Estatus..... | 13 |
| 2.3. Características del género <i>Turbincarpus</i> Buxbaum et Backeberg..... | 13 |
| 2.3.1. Clasificación Taxonómica..... | 14 |
| 2.3.2. <i>Turbincarpus alonsoi</i> Glass & S. Arias..... | 14 |
| 2.3.2.1. Distribución..... | 15 |
| 2.3.2.1. Estatus..... | 15 |
| 2.3.3. <i>Turbincarpus polaskii</i> (Backeberg) Glass y Foster..... | 15 |
| 2.3.3.1. Distribución..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.3.2. Estatus..... | 16 |
| 2.4. Características generales de la Biotecnología..... | 16 |
| 2.4.1. Cultivo <i>in vitro</i> | 17 |
| 2.4.2. Aspectos generales de la propagación asexual..... | 17 |
| 2.5. La Micropropagación..... | 17 |
| 2.5.1. Etapas comerciales de la micropropagación..... | 18 |
| 2.5.1.1. Etapa 0: Preparativa..... | 19 |
| 2.5.1.2. Etapa I: Establecimiento o iniciación del cultivo..... | 19 |
| 2.5.1.3. Etapa II: Multiplicación..... | 19 |
| 2.5.1.4. Etapa III: Enraizamiento..... | 20 |
| 2.5.1.5. Etapa IV: Aclimatización..... | 21 |
| 2.5.2. Manejo de las vitroplantas..... | 22 |
| 2.6. Ventajas la Micropropagación..... | 23 |
| 2.7. Desventajas de la Micropropagación..... | 24 |
| 2.8. La Semilla..... | 24 |
| 2.8.1. Estructura de la Semilla..... | 24 |
| 2.8.2. La germinación..... | 25 |
| 2.8.3. La latencia..... | 28 |
| 2.9. Medios de cultivo..... | 29 |
| 2.10. Los Fitoreguladores..... | 29 |
| 2.10.1. Giberelinas..... | 30 |
| 2.11. Micropropagación de Cactáceas..... | 31 |
| 2.11.1. Plantas donadoras..... | 32 |
| ...2.11.2. Germinación <i>in vitro</i> | 32 |
| 2.12. Antecedentes de la Germinación <i>in vitro</i> | 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1. Localización del experimento..... | 35 |
| 3.1.1. Características y áreas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 35 |
| 3.2. Procedimiento Experimental..... | 36 |
| 3.2.1. Desinfección de la semilla..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2. Preparación de los medios nutritivos..... | 37 |
| 3.2.3. Siembra de las semillas..... | 37 |
| 3.2.4. Incubación..... | 37 |
| 3.3. Diseño experimental y Análisis Estadístico..... | 37 |
| 3.4. Parámetros evaluados..... | 38 |
| 3.4.1. Evaluación del porcentaje de germinación..... | 38 |
| 3.4.2. Evaluación de la velocidad de germinación..... | 38 |
| 3.4.3. Evaluación de altura de plántula..... | 38 |
| 3.4.3. Evaluación de longitud de radícula..... | 38 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 40 |
| 4.1. Velocidad de germinación..... | 40 |
| 4.2. Porcentaje de germinación..... | 44 |
| 4.3. Altura de plántula y Longitud de radícula..... | 45 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 50 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 51 |
| 7. ANEXOS..... | 59 |

ÍNDICE DE CUADROS

Página

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación <i>in vitro</i> de <i>M. backebergiana</i> en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP..... | 46 |
| Cuadro 2. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación <i>in vitro</i> de <i>M. pringlei</i> en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP..... | 47 |
| Cuadro 3. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación <i>in vitro</i> de <i>T. polaskii</i> en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP..... | 48 |
| Cuadro 4. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación <i>in vitro</i> de <i>T. alonsoi</i> en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP..... | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

| | |
|---|----|
| Figura 1. Velocidad de germinación <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo para <i>M. backebergiana</i> , en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG ₃ , T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG ₃ | 41 |
| Figura 2. Velocidad de germinación <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo para <i>M. pringlei</i> , en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG ₃ , T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG ₃ | 42 |
| Figura 3. Velocidad de germinación <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo para <i>T. polaskii</i> , en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG ₃ , T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG ₃ | 43 |
| Figura 4. Velocidad de germinación <i>in vitro</i> en diferentes medios de cultivo para <i>T. alonsoi</i> , en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG ₃ , T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG ₃ | 43 |
| Imagen 1. Esquema en el que se montó el experimento para las cuatro especies de cactáceas..... | 59 |
| Imagen 2. Explantes de la especie <i>M. pringlei</i> , se observa calidad de plántula..... | 59 |
| Imagen 3. Medición de plántulas al finalizar el experimento, con la ayuda de papel milimétrico..... | 59 |

Resumen

México por sus características fisiográficas topográficas y climáticas es uno de los países megadiversos, pero como todos los países presenta uno de los más graves problemas, que es la extinción de especies. Cerca del 70% de las especies de la familia cactáceae se localizan en nuestro país, muchas de ellas son endémicas. El tipo de metabolismo que presentan, conocido como CAM es su característica primordial, pues se adaptan muy bien a las condiciones de aridez, es aquí donde radica su importancia pues el ecosistema desértico y semidesierto es el de mayor extensión en nuestro país. La fascinación que existe por los cactus como plantas de ornato aunado a la destrucción de sus hábitats, sobrepastoreo, sobreexplotación y el saqueo ilegal, son las razones por las que en la actualidad se les considera uno de los grupos mas amenazados de la flora mexicana. Hoy en día existen una gran cantidad de especies de esta familia en la lista de la NOM-059-ECOL-2001(SEMARNAT, 2001) como amenazadas o en peligro de extinción. Una alternativa para eficientar la micropropagación *in vitro* de esta familia, es la germinación *in vitro* de sus semillas, pues ofrece un mejor manejo de los explantes y mayor asepsia en este proceso y por consecuencia el rescate de estas especies. Los medios nutritivos (Tratamientos) utilizados en la germinación *in vitro* en esta investigación, favorecieron para *Mammillaria backebergiana* con 79% de germinación con el T1 (MS) siendo este el mejor, pues produjo mejores características en altura de plántula y longitud de raíz. Para *Mammillaria pringlei* con 85% de germinación fue el mejor el T2 (MS + AG3), pues presento las mejores características en las plántulas. Para *Turbincarpus alonsoi* los tratamientos no parecen haber mejorado la respuesta de germinación, pues los resultados no fueron significativos. Para *Turbincarpus polaskii* el T2 (MS + AG3) con 96% de germinación presento las mejores características de altura de plántula y longitud de raíz. Siendo este tratamiento y especie los mejores resultados obtenidos en esta investigación.

Palabras clave: cactáceae, extinción, germinación *in vitro*, *Mammillaria backebergiana*, *Mammillaria. Pringlei*, *Turbincarpus alonsoi*, *Turbincarpus polaskii*, tratamientos.

1. INTRODUCCIÓN

México como todos los países del mundo enfrenta el grave problema de la extinción de especies vegetales y animales. La República Mexicana cuenta con una gran diversidad de condiciones fisiográficas, topográficas y climáticas, por lo que es considerada como una de las zonas florísticamente más ricas del mundo (Rzedowski, 1978), además de su riqueza en especies, cuenta con un gran número de organismos endémicos (Bravo, 1978). Según Glass (1998), son cerca del 70% de las especies de esta familia las que se localizan en nuestro país.

La mayor concentración de especies nativas de cactus se encuentra en el tercio meridional de América del Norte, que incluye a América Central, las islas del Caribe y en la mitad septentrional de América del Sur. Su abundancia disminuye hacia el norte y hacia el sur; sin embargo, la distribución de algunos cactus se extiende al norte de Canadá y hasta las porciones meridionales de Argentina y Chile del Sur (Nobel, 1998).

Hoy en día siguen siendo las plantas más representativas del paisaje mexicano, especialmente de las zonas áridas y semiáridas. Además de la extraordinaria diversidad, la gran variedad de formas, así como las diversas estrategias que en su proceso evolutivo han desarrollado para hacer frente a la escasez de agua y altas temperaturas, hacen de las cactáceas un grupo biológico y ecológicamente muy interesante.

Las raíces, tallos, flores, frutos y semillas presentan una gran variedad de estructuras, uno de los rasgos fisiológicos más sobresalientes radica en que las hojas se han convertido en espinas, por lo cual, además de prevenir la evaporación del agua por transpiración mejor que las hojas normales, le sirven de defensa a la planta contra el ataque de sus depredadores (Heinemann, 1980).

El uso y aprovechamiento de las cactáceas ha sido amplio. Desde la época prehispánica hasta nuestros días, numerosas especies han sido fuente medicinal, alimenticia, como elemento constructivo, en rituales mágicos y con fines ornamentales (Trinidad, 2005). Es importante considerar el rol ecológico que desempeña esta familia, en lugares áridos y ventosos, las cactáceas sirven como fijadores del suelo y previenen

la erosión que normalmente se produce con las lluvias torrenciales que ocurren en algunas épocas del año.

Precisamente la fascinación que existe por las cactáceas como plantas de ornato, es una de las razones por las que en la actualidad se les considera uno de los grupos más amenazados de la flora mexicana. Desde el siglo pasado, millones de especímenes de cactáceas han sido extraídos de su hábitat (Christopher, 2003).

El contrabando de cactus es provocado por la demanda de suculentas, por requerir poco mantenimiento y poca agua, para usarlos en paisajismo y por los coleccionistas, conocidos como cactófilos. Lo anterior, más la colecta legal e ilegal en toda la región, provocan una marcada disminución de las poblaciones naturales (Tierramérica, 2002).

Estas poblaciones también se encuentran deterioradas 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 (Villavicencio *et. al.* 2005).

La desaparición o amenaza de especies vegetales, entre ellas las cactáceas, también se debe a su reducida capacidad de recuperación en condiciones naturales, su lento crecimiento, la dificultad para su reproducción y la alta mortandad de las plántulas causada por factores ambientales o depredación. En la NOM-059-ECOL-2001(SEMARNAT, 2001), se encuentran muchas especies de cactáceas clasificadas como amenazadas o en peligro de extinción, un gran número de ellas endémicas, lo que atrae más la atención de los coleccionistas propiciando el saqueo ilegal haciéndolas aún más vulnerables (Tierramérica, 2002).

Los programas que se han implementado por parte de los gobiernos e instituciones federales y estatales han contribuido a la protección de las cactáceas; sin embargo, es necesario desarrollar nuevas tecnologías con el fin de alcanzar su pronta

recuperación. Una nueva alternativa es la micropropagación con la cual se podría obtener un mayor número de plántulas partiendo de fragmentos mínimos de tejido vegetal, cultivados en medios artificiales, bajo condiciones controladas y estériles. Esta herramienta biotecnológica además de ser más productiva en cuanto a número, genera plántulas más grandes en menor tiempo y espacio. Estas vitroplántas se pueden producir a partir fragmentos obtenidos de plantas germinadas *in vitro*. Con los medios de cultivo adecuados se puede para promover la germinación regular la latencia y evitar el aborto embrionario.

Hoy en día se realizan diferentes pruebas en semillas con problemas de germinación, pues algunas especies requieren factores muy específicos para tener éxito en su reproducción, el presente trabajo contribuye a aportar nuevos conocimientos en esta ardua tarea. En el presente trabajo se probaron diferentes medios nutritivos artificiales para determinar el efecto que tienen en la germinación *in vitro* de algunas especies de cactáceas. De la evaluación se pretende seleccionar el que mayor porcentaje de germinación se obtenga y el que genere vitroplántas completas, sanas y fuertes que tendrán la tarea de continuar con el proceso de micropropagación.

1.1. Objetivo general

Determinar el medio nutritivo adecuado para la germinación *in vitro* de *Mammillaria backebergiana*, *M. Pringlei*, *Turbinicarpus alonsoi* y *T. Polaskii*.

1.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto que tienen diferentes medios nutritivos en la germinación *in vitro*.
2. Determinar el medio nutritivo que promueve el porcentaje y velocidad de germinación así como calidad de vitroplántas.

1.3 Hipótesis

En la etapa de establecimiento se requieren medios de cultivo específicos para promover la germinación *in vitro* de los géneros de *Mammillaria* y *Turbinicarpus*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Etimología de la palabra cactus

La palabra cactus deriva del griego Κάκτος káktos, este termino fue utilizado por primera vez por el filósofo Teofrasto para nombrar una especie de cardo espinoso que crecía en la isla de Sicilia, posiblemente el cardo *Cynara cardunculus*.

En la Historia Plantarum de Teofrasto la palabra griega Κάκτους, tiene también dos referencias poéticas, así el poeta Teócrito de Siracusa escribió en sus Idilios: 'A ti te dejen como una oveja del rebaño, cuya pata se haya picado por un cactus'. Asimismo, Filetas, poeta proveniente de la isla de Cos, escribió sobre ella: 'Debe lamentarse quien haya perdido el afecto de una mula, por el temor a las heridas del cactus espinoso', la palabra pasó al latín como cactus a través de Plinio el Viejo, quien en su Naturalis Historia retomó aquello que Teofrasto escribió sobre esta planta que crecía en Sicilia. De cactus derivó la palabra latina carduus, que finalmente dio lugar a la española cardo.

En la Edad Media la palabra cactus se usaba comúnmente para nombrar a la alcachofa comestible. Más tarde, fue usada como nombre genérico por Carlos Linneo en 1753 como Cactus, dentro del cual agrupaba 22 plantas que hoy se consideran dentro de géneros diversos de la familia Cactáceae (Heinemann, 1980).

2.1.2. Distribución y hábitat

Las cactáceas son originarias del continente americano, en donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas, esta familia incluye de entre 120 a 150 géneros, con unas 2000 especies nativas de este continente (Villarreal, 1993).

En México, es donde se encuentra el mayor número de especies debido a las condiciones de ubicación geográfica, climática y topográfica (Nessman, 1994). Según Glass (1998), son cerca del 70% de las especies de esta familia las que se localizan en nuestro país.

Con base en el tiempo y en el sitio de origen evolutivo, podría esperarse que los cactus y los agaves 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 encuentran 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, sin embargo la distribución de algunos cactus se extiende al norte de Canadá y hasta las porciones meridionales de Argentina y Chile del Sur (Nobel, 1998).

2.1.3. Descripción botánica de la familia Cactáceae

Las cactáceas son un grupo que se pueden definir como plantas herbáceas, leñosas, suculentas, espinosas, o pueden poseer pelos, carecen de hojas por lo menos en las formas adultas y estas son simples y alternas. Sus formas son características, siendo las más comunes las cilíndrica, columnar, esférica y candelabroforme. Los tallos generalmente son globosos, cilíndricos o aplanados simples o ramificados. Sus flores actinomorfas, hermafroditas, con el cáliz y la corola formados de múltiples piezas dispuestas en espiral, coherentes en la base formando un tubo pequeño corto o largo, no hay una clara diferencia entre los sépalos y los pétalos, la transición de unas a otras es paulatina o son iguales unas y otras, con estambres numerosos, multiseriados libres o unidos en la base de los pétalos, de dehiscencia longitudinal, el gineceo infero, formado por varios carpelos, unilocular con numerosos óvulos sobre varias placentas parientales, estilo grueso, columnar, con el estigma coloreado y lobulado. El fruto es una baya, generalmente ovoidea esférica o claviforme (Sánchez, 1987). Son plantas de lento crecimiento, con ciclos de vida larga (Hernández y Godínez, 1994).

2.1.4. Características fisiológicas

El tipo de metabolismo que presentan, conocido como CAM es la característica primordial de las cactáceas. Asimismo, la presencia de areolas, es determinante a la hora de diagnosticar si una planta pertenece o no a la familia de las Cactáceas.

Los miembros de la familia Cactáceae al igual que con el resto de las plantas suculentas, están bien adaptados a vivir en condiciones de aridez. Las hojas se han convertido en espinas, por lo cual, además de prevenir la evaporación del agua por transpiración mejor que las hojas normales, sirven de defensa a la planta contra el ataque de sus depredadores.

La fotosíntesis se realiza en los tallos engrosados que almacenan agua. A diferencia de otras muchas suculentas, el tallo es la única parte de un cactus donde este proceso tiene lugar realmente pues muy pocos miembros de la familia poseen hojas, y en los que las tienen, éstas son normalmente rudimentarias y de corta vida; típicamente tienen forma de lezna, de 1 a 3 mm de largo. Muchas de las especies de esta familia tienen floración nocturna, ya que son polinizadas por animales nocturnos como las polillas y los murciélagos (Heinemann, 1980).

2.1.5. Importancia económica y ecológica

Hasta hoy en día las cactáceas son, las plantas más representativas del paisaje mexicano, especialmente de las zonas áridas y semiáridas. Además de la extraordinaria diversidad, la gran variedad de formas de vida, así como las diversas estrategias que en tiempos evolutivos han desarrollado para hacer frente a la escasez de agua, hacen de las cactáceas un grupo biológico y ecológicamente muy interesante (Sandoval, *et al* 2005).

El uso y aprovechamiento de las cactáceas ha sido amplio. Desde la época prehispánica hasta nuestros días, numerosas especies han sido fuente medicinal y alimenticia, además de que se han utilizado como elemento constructivo, en rituales mágicos y con fines ornamentales (Trinidad, 2005).

Aparte de la importancia comercial que puedan tener, tanto para el desarrollo económico de las regiones donde abundan, es importante considerar el rol ecológico que desempeñan. Pues esta familia en lugares áridos y ventosos sirven como fijadores del suelo y previenen la erosión que normalmente se producen con las lluvias torrenciales que ocurren en algunas épocas del año (Martínez, *et al.* 1992).

2.1.6. Principales amenazas

Precisamente la fascinación que existe por las cactáceas como plantas de ornato es una de las razones por las que en la actualidad se les considera uno de los grupos mas amenazados de la flora mexicana. Desde el siglo pasado, millones de especímenes de cactáceas han sido extraídos de su hábitat. Este saqueo ha sido la causa principal, por lo que su comercio internacional esta controlado y monitoreado bajo licencia (Christopher, 2003).

El contrabando de cactus es un comercio a gran escala en el suroeste de los Estados Unidos, este es provocado por la demanda de suculentas, que al requerir poco mantenimiento y poca agua son usadas en paisajismo, y por los coleccionistas de cactus, conocidos como cactófilos, estos dos grupos estimulan el robo de especies raras y difíciles de hallar. Lo anterior es aparte de la cosecha perfectamente legal pero mal reglamentado de plantas silvestres en propiedades públicas y privadas en toda la región. Pero esto conduce al agotamiento de algunas especies de cactus en el Desierto Chihuahuense, lo cual amenaza a ciertas poblaciones (Tierramérica, 2002). Debido a esto en la NOM-059-ECOL-2001(SEMARNAT, 2001), se encuentran muchas especies de cactáceas clasificadas como amenazadas o en peligro de extinción.

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, 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 (López, 2003; Villavicencio *et al.* 2006b; López y García 2004).

2.2. Características del género *Mammillaria* Haworth

El nombre del género, fue propuesto por Haworth en 1812, proviene del latín *mammilla*, (mama), debido a que las aréolas se disponen en tubérculos cónicos en vez de estar organizadas en costillas como en muchos otros cactus. Otra diferencia significativa es que las flores no provienen de la aréola, sino de la axila de los tubérculos. Sus requerimientos de cultivo son muy variados, como sucede en todas las especies. Algunas especies son de rápido crecimiento y fácil cultivo, llegando a florecer mientras la planta es joven. Algunas son muy resistentes, mientras otras son propensas a la putrefacción de raíz si se encuentra en lugares muy fríos, o con suelo demasiado húmedo. Todas las especies requieren suelos bien drenados. Por lo general, las plantas de este género florecen fácilmente, especialmente si son sometidas al reposo invernal.

Existen unas 300 especies de *Mammillaria*, la mayoría se encuentra en México aunque algunas son nativas del sudeste de Estados Unidos, el Caribe, América Central y de la parte norte de América del Sur. Se encuentran *Mammillarias* desde el nivel del mar hasta grandes elevaciones. También varían en tamaño, desde miniaturas de 2.5 cm de diámetro, hasta especímenes tipo columnares de hasta 30 cm (Planetacactus, 2005).

2.2. 1. Clasificación Taxonómica

REINO.....Vegetal

DIVISIÓN.....Magnoliophyta

CLASE.....Magnoliopsida

SUBCLASE.....Caryophyllidae

ORDEN.....Caryophyllales

FAMILIA.....Cactaceae

GÉNERO.....*Mammillaria*

ESPECIE.....*backebergiana*

ESPECIE.....*pringlei*

2.2.2. *Mammillaria backebergiana*, Buchenau

Especie de tallo normalmente simple, cilíndrico, hasta de 30 cm de altura y 5 a 6 cm de diámetro; ápice algo hundido oculto por las espinas. Tubérculos dispuestos en 8 y 7 series, pero frecuentemente en series anómalas tales como 9 y 15 o 10 y 16, conico-piramidales con la base romboide, cortos de alrededor de 5 mm de altura y de 11 a 12 mm de espesor en la base, de color verde



amarillento, finalmente punteados de blanco con jugo lechoso. Axilas normalmente desnudas ocasionalmente con lana blanca y raras veces cetosas; cerdas 0 a 3 de 4 a 8 mm de longitud, flexuosas, traslucidas. Areolas ovales de 2 mm de diámetro mayor y como diámetro menor 1 mm, las del ápice provistas de lana rizada, blanca que con el tiempo se torna grisácea. Espinas radiales 8 a 12; generalmente 10, aciculadas, de 8 a 10 mm de longitud divaricadas, con base dilatada, lisas y rígidas, agudas de color amarillo castaño hasta castañas, con la base más oscura. Flores campanudas, de 18 a 20 mm de longitud, de color verde claro: tubo receptacular de 6 a 8 mm de longitud, ligeramente angostado hacia la mitad del nectario, de color verde, segmentos exteriores del perianto lanceolados, de 2 mm de anchura, con el margen ciliado y el ápice agudo, de color rojo purpureo castaño en el envés, con el borde rosado en el haz; segmentos

del perianto líneas lanceolados, de 8 a 9 mm de longitud y de unos 2.5 mm de ancho, enteros; con el ápice redondeado y obtuso, rojo abajo, purpureo arriba; filamentos purpúreos; anteras amarillas; estilo de 13 mm de longitud, de color rosa; lóbulos del estigma 4 a 6 de 2 mm de longitud de color castaño; floreciendo desde octubre hasta febrero. Fruto claviforme de 20 mm de longitud y de 6 mm de diámetro blanquecino abajo, verdoso arriba persistiendo adheridos los restos secos del perianto; fructificando desde mayo hasta agosto. Semillas piriformes, a veces algo recurvadas, de 1.2 mm de longitud y 0.7 a 0.8 mm de ancho; hasta finalmente fovelada, de color canelo; hilo subbasal un poco alargado, delgado amarillento (Bravo y Sánchez, 1991b).

2.2.2.1. Distribución

Se encuentran distribuidos principalmente en Guerrero, Michoacán y en el Estado de México, en altitudes de 1.400 - 1.600 msnm (Michel *et al.* 2003a).

2.2.2.2. Estatus

Especie endémica de México, catalogada como Pr. (Sujeta a protección especial) según la NOM-059-ECOL-2001.

2.2.3. *Mammillaria pringlei* J. Coulter

Cactácea de tallo simple, globoso hasta cortamente cilíndrico, de 16 cm de altura y 7 cm de espesor. Tubérculos dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, de consistencia firme, cónicos, con el ápice obtuso, de 6 a 10 mm de longitud y 8 mm de diámetro en la base, de color verde grisáceo, con jugo acuoso. Axilas con lana blanca y



en ocasiones con cerdas blancas. Areolas ovales, de 2 mm de diámetro, con lana amarillenta cuando jóvenes. Las espinas son radiales 15 a 20, de 5 a 8 mm de longitud, aciculares, delgadas, rectas o ligeramente, amarillas, casi horizontales. Espinas centrales 6, a veces 5 o 7, de 18 a 20 mm de longitud gruesamente aciculares, encorvadas, amarillas, extendidas hasta porrectas, cubriendo el ápice. Flores infundibuliformes, de 8 a 10 mm de longitud; segmentos exteriores del perianto lineares, agudos, con el margen aserrado, de color café rojizo u el borde mas claro; segmentos interiores del perianto linear- lanceolados, agudos con el margen casi entero, rojos; filamentos de un intenso color rosado; anteras amarillas; estilo blanco abajo y rosado hacia arriba; lóbulos del estigma 3 de 1 mm de longitud de color castaño amarillento; fruto claviforme, alargado, de 12 a 15 mm de longitud, rojizo persistiendo los restos secos del perianto; semillas encorvado-piriformes de 1 mm de longitud por 0.7 mm de espesor, con hilo lateral cercano a la base, con testa de color castaño. La especie *Mammillaria pringlei* fue colectada en el estado de San Luis Potosí por Pringle, pero no se sabe la localidad exacta. (Bravo y Sánchez, 1991b).

2.2.3.1. Distribución

Se encuentran distribuidos principalmente en San Luis Potosí, México, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México. En altitudes de 1.200 - 2.300 msnm (Michel *et al.* 2003b).

2.2.3.2. Estatus

Especie endémica de México, catalogada como Pr. (Sujeta a protección especial) según la NOM-059-ECOL-2001.

2.3. Características del género *Turbinicarpus* Buxbaum et Backeberg

Estas plantas suculentas crecen principalmente en suelos de piedra caliza, en altitudes entre 300 y 3300 msnm. Este género suele limitarse a hábitats específicos, generalmente hostiles para la mayoría de las plantas, en su mayoría suelos bien drenados de zonas rocosas, (neutro o alcalino). *Turbinicarpus* se adaptan a nichos extremos: más del 80% de estas especies crecen en las grietas de rocas o entre los guijarros debajo de ellos, donde el polvo acumulado es suficiente para permitir el desarrollo de la raíz, estas son muy gruesas, cumpliendo el papel de ancla para adherirse a las laderas, y como almacenamiento de agua para los períodos de sequía, las espinas se tornan a menudo en estructura parecidas al papel, capaces de absorber una buena cantidad de agua. Su aspecto general es muy mimético, gracias a la epidermis de color grisáceo y sus espinas entrelazadas, esto les permiten pasar desapercibidas a sus eventuales depredadores.

La historia taxonómica del género *Turbinicarpus* es bastante compleja y a menudo mezclada con la de otros géneros como *Echinocactus*, *Echinomastus*, *Gymnocactus*, *Mammillaria*, *Neolloydia*, *Normanbokea*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Strombocactus*, *Thelocactus* y *Toumeyia*, los resultados de casi dos siglos de constante evolución en la comprensión de la relación de afinidades y dentro de la familia Cactáceae. Muchos puntos de vista acerca de la clasificación de *Turbinicarpus* están disponibles actualmente, pero la más convincente parece el género de revisión por Davide Donati, 2003 y 2004, con Carlo Zanovello, gracias a su minuciosidad (Anderson, 2001).

Este taxón se encuentra únicamente en México, se distribuyen a lo largo de la vertiente oeste de la sierra madre oriental y sus planicies adyacentes en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas, Querétaro e Hidalgo entre los 1700-3500 msnm (Nelo, 2005a).

2.3.1. Clasificación Taxonómica

REINO.....Vegetal

DIVISIÓN.....Magnoliophyta

CLASE.....Magnoliopsida

SUBCLASE.....Caryophyllidae

ORDEN.....Caryophyllales

FAMILIA.....Cactaceae

GÉNERO.....*Turbinicarpus*

ESPECIE.....*alonsoi*

ESPECIE.....*polaskii*

2.3.2. *Turbinicarpus alonsoi* Glass & S. Arias

Cactácea en forma de roseta, grisácea, con tubérculos elongados con ángulo y quilla característicos, de consistencia rígida, espinas no pungentes, más bien blandas, curvadas y torcidas, deciduas. Las plántulas son bastante diferentes, verde oscuro, con tubérculos redondeados y con espinas radiales pequeñas, blancas, recurvadas. Su tallo es simple, aplanado, 6-9 cm de diámetro, dividido en tubérculos. Las raíces



comienzan en la base del tallo, aunadas a las raíces forman una unidad nabiforme; tubérculos son angulares, 15 mm de largo, 13 mm de ancho en la base, con una quilla tenue en ambas superficies, glaucos a color verde grisáceo, tornándose suberosos de las puntas hacia la base cuando envejecen. Aréolas apicales, grandes, con lana pardo rojiza, tornándose grisácea con la edad, después desnudas (sin espinas). Las espinas

de 3-5, hasta 20 mm de largo, aplanadas, parecidas al cartón, grises con la punta más oscura, no pungentes, irregularmente curvadas hacia adentro, caducas; flores, de 25-38 mm de largo, 20-30 mm de diámetro, de color cereza ha rosado magenta, a partir del centro del ápice del tallo; frutos de hasta 10 mm de largo, 5 mm de diámetro, lisos, púrpura rojizos, abriéndose en 1 ó 2 hendiduras longitudinales; semillas de 1 mm de largo, 0.75 mm de ancho, testa negra, tuberculada. Los especímenes juveniles son globosos, verde oscuros, brillosos, tubérculos redondeados, no elongados, espinas cortas, blancas, adpresas y recurvadas.

Esta especie fue accidentalmente descubierta en 1994 por Alonso García Luna, un joven horticultor mexicano (por el cual fue nombrada así), durante un viaje de campo a la región de Xichú en el noreste de Guanajuato (Kaktalina, 2006).

2.3.2.1. Distribución

Es endémica del estado de Guanajuato, México (Fitz & Maurice, 2002).

2.3.2.1. Estatus

Especie endémica del estado de Guanajuato México, catalogada como A. (Amenazada) según la NOM-059-ECOL-2001.

2.3.3. *Turbinicarpus polaskii* (Backeberg) Glass y Foster

Cactácea simple, de tallo pequeño semigloboso, globoso aplanado o hasta turbinado, de 1 a 3 cm de altura y 25 a 40 mm de diámetro, de color verde azulado, verde grisáceo claro o verde con tonos castaños; tubérculos dispuestos en 5 y 8 series espiraladas, anchos subaplanados, desde casi cuadrangulares hasta redondeados. Aréolas



desde circulares hasta ovales 1 o 2, rara vez 3, caducas con la edad, de 12 a 45 mm de longitud, siendo la inferior la más larga, gruesas amarillentas, castaño amarillentas o de color cuerno; flores de 1 a 4 cm de longitud y diámetro, rotado-campanuladas, segmentos exteriores del perianto lanceolados, con el margen entero o dentado,

apiculados, de color rojizo verdoso, con el borde mas o menos blanquecino; segmentos interiores linear-lanceolados, cerca de 3 cm de longitud y 3 a 7 mm de anchura, con el ápice más o menos agudo o redondeado y aun hendido, a veces ligeramente mucronado, desde blancos hasta color violeta con la línea media verdosa, rojiza o purpúrea ; filamentos blanquecinos o rosados hacia a la base y más o menos purpúreos hacia el ápice, anteras ovadas hasta lineares, amarillentas o con tinte purpúreo, a lo menos parcialmente; lóbulos del estigma 5 o 6, blanquecinos hasta rosados; semillas de 0.75 mm de longitud; testa negra tuberculada. Algunos autores consideran a *Turbincarpus polaskii* Backeberg (nombre ilegítimo por no haberse designado un tipo) para la autora de acuerdo con la revisión del género hecha por Glass y Foster en 1997, considera a *T. polaskii* dentro de la sinonimia de *T. schwarzii* (Shurly) (Bravo y Sánchez, 1991a).

2.3.3.1. Distribución

Se encuentran en cañones profundos, sobre pendientes escarpadas, con grava y vegetación escasa. Es endémica de Coahuila de Zaragoza, Tamaulipas y San Luis Potosí en México. Su hábitat natural son los áridos desiertos. Es una especie común en áreas localizadas (Nelo, 2005b).

2.3.3.2. Estatus

Especie endémica de México, catalogada como A. (Amenazada) según la NOM-059-ECOL-2001.

2.4. Características generales de la Biotecnología

La palabra biotecnología proviene de tres vocablos griegos: Bio (vida), tecno (arte), logo (tratado). Esta ciencia moderna es una ciencia aplicada, orientada al aprovechamiento de las capacidades biológicas de microbios, plantas, células animales, enfocadas al beneficio del hombre.

Actualmente conjuga los fundamentos científicos de la microbiología, la biología molecular, la biología celular, la bioquímica, la química y la ingeniería genética, con los objetivos académicos y comerciales para desarrollar y mejorar productos y procesos a

partir de los sistemas vivos. Se emplea principalmente en los campos de la salud, la agricultura y en la protección al ambiente (Ondarza, 2002).

2.4.1. Cultivo *in vitro*

Cuando se habla de cultivo de plantas, generalmente se refiere a cultivares en macetas o cultivares en el campo. En 1904 Hanning desarrolló un nuevo método de cultivo de plantas al que llamo cultivo de embriones. Aisló *in vitro* embriones inmaduros de algunos miembros de la familia de las Crucíferas, obteniendo plantas viables. El nombre de cultivo *in vitro* lo recibe porque al menos inicialmente se usaron recipientes de vidrio para llevar acabo este tipo de cultivo. Por lo tanto el cultivo *in vitro*, puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo (en condiciones totalmente estériles) de órganos tejidos y células empleando medios nutritivos artificiales ricos en sales minerales, vitaminas y hormonas. De forma general, el cultivo *in vitro* se realiza en frascos de cristal y las plantas que se obtienen se llaman vitroplantas, las cuales pueden multiplicarse de forma acelerada; proceso conocido como micropropagación (IMGEMA, 2008).

2.4.2. Aspectos generales de la propagación asexual

La propagación asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas, es posible porque en muchas de estas los órganos vegetativos tienen la capacidad de regeneración. Las porciones de tallo tienen la capacidad de formar nuevas raíces y las porciones de raíz pueden regenerar nuevos tallos (Hudson y Kester, 1982).

2.5. La Micropropagación

La palabra microprogramación fue empleada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro* (Hartmann y Kester, 1995).

La micropropagación es todo procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la

propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. Este procedimiento implica que cada una de las plántulas nuevas que se produzcan pueda crecer y ser fenotípicas y genotípicamente idéntica a la planta original de que se deriva.

Con la micropropagación se obtiene un gran número de plántulas a partir de una planta, se cultiva primero en tubos de ensayos y luego en frascos o cajas de poliuretano, los explantes pueden ser fragmentos de capítulos muy jóvenes o meristemas. Se obtienen nuevas plantas a los tres o cuatro meses y su estado sanitario es excelente ya que están exentas de microorganismos patógenos (Vidalic, 1992).

2.5.1. Etapas comerciales de la micropropagación

Según la experiencia, para la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas definidas con su objetivo específico:

2.5.1.1. Etapa 0: Preparativa. En esta etapa se seleccionan las plantas donadoras y una serie de pre-tratamiento en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.

2.5.1.2. Etapa I. Establecimiento o iniciación del cultivo. El objetivo de esta etapa es establecer cultivos asépticos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación.

2.5.1.3. Etapa II. Multiplicación. Es considerada la etapa más importante del proceso de micropropagación pues es ahí donde se garantiza una buena propagación de los brotes y la estabilidad genética de las vitroplantas producidas.

2.5.1.4. Etapa III. Enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su restablecimiento en condiciones de suelo.

2.5.1.5. Etapa IV. Aclimatización. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos de producción o invernaderos (Jiménez, 1995).

2.5.1.1. Etapa 0. Preparativa

Esta etapa fue inicialmente propuesta para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la etapa I, sin embargo en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de microprogramación eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético (Guiñazú *et al.* 2005).

2.5.1.2. Etapa I. Establecimiento o Iniciación de los cultivos

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivo asépticos y fisiológicamente vigoroso con los cuales iniciar el proceso de multiplicación. El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (Hernández, 1997). Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos que se toman de plantas adultas o yemas en reposo. A medida de que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*. A medida que el explante es más fácil la regeneración, pues el tamaño del explante es un factor importante que influye en la regeneración de las plantas (Villalobos, 1982).

2.5.1.3. Etapa II. Multiplicación

Esta etapa tiene como objetivo la producción del mayor número de propágulos a partir de los explantes utilizados, ya establecidos *in vitro*.

Esta es la etapa más importante de la micropropagación ya que en ella se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose tanto el número de plantas o propágulos a obtener por su calidad genética (Orellana, 1998).

Para llevar a cabo la multiplicación se induce la proliferación de brotes, los cuales se separan en condiciones estériles y son subcultivados nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, esta operación se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas. El método de propagación a emplear puede ser por yemas axilares o yemas adventicias, esto depende de la frecuencia de variantes y de la especie en cuestión (Wang y Charles, 1991).

La eficiencia tecnológica de esta etapa es decisiva para alcanzar los resultados finales de la producción, pues es la responsable de las cantidades de plantas que se establezcan. Esta eficiencia está condicionada por el comportamiento de tres variables esenciales como lo son el coeficiente de multiplicación o ahijamiento, mortalidad de los explantes y las pérdidas del proceso por la presencia de contaminantes, incidiendo en gran forma el manejo de la asepsia, esto por los operadores o fuerza de trabajo.

Zimmerman *et al.* (1991) afirma que con un 10% de aumento del coeficiente de multiplicación se reducen los costos totales de un 3.0 a 5.0 %. El coeficiente de multiplicación por su parte depende de la calidad del medio de cultivo y de la manipulación que tengan los operadores en la campana de flujo laminar con el material *in vitro* (Machado, 2002).

2.5.1.4. Etapa III. Enraizamiento

Este proceso se ve afectado por la especie, tipo y tamaño de explante, interviene el estado fisiológico del tejido, número de subcultivos, composición del medio de cultivo y condiciones de incubación (Starling, 1985; Roberts y Matthews, 1995). El enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia pues el objetivo es producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas para que estas puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante a suelo. La formación del sistema radicular y su desarrollo son fundamentales para lograr la transferencia de las vitoplasmas a condiciones de invernadero. (Villavicencio *et al.* 2006a). Este proceso de enraizamiento requiere cambiar el balance hormonal, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas (Villalobos y Torpe, 1993), pues entre los compuestos auxínicos en las plantas, se encuentra la formación de raíces según Barba (1991).

El objetivo es que los brotes crezcan hasta formar plantas completas y desarrollen un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato en condiciones de vivero o invernadero. Esta etapa es la más voluminosa de todo el proceso, en ella cada brote, esqueje o yema se cultiva y manipula *in vitro* para que además de crecer y desarrollar un seudotallo o tallos con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes, posteriormente se transporta sobre un sustrato enriquecido y se convierte en una planta *in vitro* o vitroplanta aclimatizada, lista para llevarse a campo.

Deben manejarse adecuadamente todos los factores como lo son: Medios de cultivos, uso de componentes del medio con sustancias químicas de calidad, técnica, luz solar como fuente de iluminación, frascos de cultivos con dimensión adecuada para la especie que se produzca, disminución de los riesgos de contaminación, entre otros esto con el fin de lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, durante todo el proceso *in vitro*. Por ser esta la etapa donde se concentra la mayor cantidad de explantes, tiene una influencia directa en los costos de producción por lo tanto su eficiencia se encuentra en la disminución de las pérdidas del material *in vitro* del proceso productivo (Pierik, 1990).

2.5.1.5. Etapa IV. Aclimatación

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta fase se garantiza un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales. Las técnicas más eficaces en la aclimatización son las que van encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico. (Pérez, *et al.* 1998).

La eficiencia de la aclimatización es trascendental para la propagación comercial, la eficiencia total del proceso, la calidad y la tecnología son los responsables de los resultados de esta. Que significaran en el grado de supervivencia de las plantas durante este tiempo. Sin embargo, durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir

de minerales, agua, CO₂, y luz. Este cambio para las plantas así como la morfología de las mismas determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales de este proceso (Villavicencio, *et. al.* 2006b).

Adicionalmente el ambiente *in vitro* (alta humedad, baja intensidad luminosa, temperatura constante, bajo o nulo intercambio gaseoso en el frasco), condiciona cambios en la morfología de las plantas que influyen en la capacidad de supervivencia y crecimiento, hojas con anatomía interna mal estructurada, estomas que no cierran normalmente y desarrollo deficiente de la cutícula. Esto hace que las plantas sean más susceptibles al stress por pérdida de agua y por lo tanto pueden desarrollar nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones. En el tallo se presenta un menor contenido de tejido de soporte (colénquima y esclerénquima). La raíz es poco funcional, y presenta ausencia de raíces secundarias. En ocasiones existe una conexión vascular incompleta entre tallo y raíces que impide el transporte eficiente de agua y nutrientes. Como resultado de esto prácticamente las plantas deben desarrollar todo el sistema radicular nuevo durante la etapa de aclimatización. En un inicio las vitroplantas deben cultivarse en condiciones que se acerquen al ambiente *in vitro*, alta humedad relativa y baja intensidad luminosa, se reduce gradualmente la humedad relativa y se aumenta la intensidad luminosa para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido al de campo o invernadero, con hojas, tallos y raíces adaptados a estas condiciones y completamente funcionales (Izasa, 2004).

2.5.2. Manejo de las vitroplantas

Para el manejo de las nuevas vitroplantas se recomienda que las plantas se laven cuidadosamente para eliminar restos de agar de los brotes y raíces. Si es posible se clasifican las plantas por tamaño de ser posible individualizar brotes múltiples. Se sumergen en una solución fungicida (Benomyl) con el fin de proveerlas de defensas contra los microorganismos patógenos comunes del suelo al que serán plantadas. Se recomienda mantener la humedad relativa alta (80 - 90 %) durante la primera o segunda semana, a partir de la segunda semana se incrementa progresivamente la luz y se espacian los riegos, reduciendo así la humedad relativa. Se inicia la fertilización tan pronto como se haya establecido el sistema radicular, esto normalmente ocurre a las dos o tres semanas (Jiménez, 1998).

2.6. Ventajas la Micropropagación

Esta técnica constituye, dentro de las biotecnologías vegetales, una de las técnicas que mayor aporte ha brindado. (Escobar 1985; Villalobos y Thorpe, 1993 y Hu y Wang 1983), 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. Las ventajas son:

1. Se pueden obtener, en tiempo record, gran cantidad de plantas idénticas entre si con alto vigor y libres de plagas y enfermedades.
2. Solamente con variar el medio de cultivo del frasco se pueden conservar, durante varios años, miles de especies vegetales en un espacio de pocos metros sin perder sus características genéticas y regenerarlas cuando se desee.
3. En solo seis meses se pueden obtener nuevas especies o variedades a partir de un patrón que se desee mejorar.
4. Sólo con realizar correctamente un cultivo *in vitro* se pueden liberar las vitroplantas de enfermedades producidas por bacterias, virus y hongos y rejuvenecer el material de partida.
5. Se puede mantener la producción durante todo el año con facilidades de transportación y embarque.

2.7. 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.

2.8. La Semilla

Las semillas de las cactáceas presentan diversas formas, tanto en su tamaño, estructura y color de testa, en las características del embrión y en los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas (Bravo, 1978). Las semillas presentan formas desde esféricas, ovoides, alargadas, arriñonadas, acorazonadas, y hasta de gorra o sombrero. Su testa puede ser desde clara, parda en varios tonos y negra, y ser opaca a muy brillante. En el interior de las semillas, se encuentran los elementos que posibilitan su germinación, como también las reservas nutritivas para los primeros días de vida de la nueva planta. Para la dispersión de las semillas, en algunas especies el fruto se seca y se agrieta, liberando así sus semillas, en otras, el fruto es húmedo y carnoso siendo atractivos para pájaros y otros animales que se alimentan de ellos para después dispersarlas mediante sus excretas fecales (Rodríguez y Apezteguía, 1985). Los cactus pueden propagarse mediante semillas, esquejes de hojas o tallos, por división e injertos. La división y los esquejes son los sistemas más sencillos. Pero el cultivo a partir de semilla es más lento y difícil, en su forma convencional pero proporciona la oportunidad de obtener variantes seleccionadas de las especies y cultivar híbridos nuevos por polinización manual (León, 2006).

2.8.1. Estructura de la Semilla

En las semillas de la familia de las cactáceas se distinguen diferentes partes, como lo son el embrión, el perisperma, la testa, el micrópilo, el hilo, así como la

carúncula y el estrofiolo. El tegumento interno es el que deja una pequeña abertura que es el micrópilo por donde saldrá la radícula del embrión durante la germinación. El embrión es el primordio de la planta y en él están la radícula, los cotiledones, el epicótilo y el hipocótilo. El endospermo es un tejido de almacenamiento formado en el saco embrionario al ocurrir la fecundación, este es digerido por el embrión durante su desarrollo al igual que el perisperma, tejido de almacenamiento formado a expensas de la nucela también digerida durante el desarrollo del embrión. El hilo es la cicatriz que deja el funículo en la semilla al desprenderse, cuando madura, su forma, tamaño y posición son variables. En algunas especies el funículo al desprenderse, deja en la semilla residuos que constituyen una estructura esponjosa llamada estrofiolo (Bravo, 1978 y Bravo y Scheinvar, 1995).

2.8.2. La germinación

La germinación es el crecimiento del embrión, que ha permanecido paralizado durante las fases finales de la maduración. Los procesos fisiológicos de este proceso exigen actividades metabólicas aceleradas, la fase inicial de la germinación consiste primariamente en la activación de los procesos por aumentos en humedad y actividad respiratoria de la semilla. El embrión envuelto por la cubierta protectora constituida por varias capas de tejidos vivos y muertos contiene reservas alimenticias suficientes para abastecer el aumento en la actividad metabólica. Desde el punto de vista puramente fisiológico la germinación comprende cuatro fases: la primera de ellas es la Imbibición de agua, posteriormente viene la elongación celular después la división celular y por último la diferenciación de células y tejidos. Y desde el punto de vista fisio-bioquímico se consideran las siguientes fases del proceso germinativo: Rehidratación, aumento de respiración, formación de enzimas, digestión enzimática de reservas, movilización y transporte de reservas, asimilación metabólica, crecimiento y diferenciación de tejidos (Jacobsen, 1984).

La germinación de una semilla es definida como la emergencia y desarrollo de las estructuras esenciales que provienen del embrión y manifestando la habilidad de una semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables (Moreno *et al.* 1992). La ISTA (1996), define a la germinación como la emergencia y desarrollo de la

plántula a un estado donde sus estructuras esenciales indican si son o no capaces de desarrollarse en una planta satisfactoria y productiva, proporcionando las condiciones favorables de suelo y clima.

Lo cierto es que para que la germinación ocurra, se deben satisfacer determinadas condiciones como que la semilla debe ser viable, las condiciones ambientales para la semilla deben ser favorables: (agua, temperatura, oxígeno y luz). Esta debe estar libre de patógenos (Hartmann y Kester, 1995).

El Proceso de Germinación requiere de la absorción de agua, esta suele efectuarse en tres fases; la fase inicial de rápida absorción, una fase intermedia en la cual el contenido de agua de la semilla permanece casi constante y una fase final de intensa absorción que esta relacionada con el alargamiento de las células y la aparición de la radícula (Besnier, 1989). El agua del medio entra en la semilla por una diferencia entre el potencial hídrico del medio y el potencial hídrico de la semilla, las células del embrión como del endospermo se hidratan y entran en actividad, por lo que la semilla se hincha. Después, viene la activación de enzimas formadas durante la maduración de la semilla o las sintetizadas recientemente, las cuales son; las que requieren de hidratación para activarse y las que requieren de una hormona o enzima para activarse.

El embrión empieza a producir ácido giberélico y este juega un papel de suma importancia después de la hidratación de la semilla a través de su efecto de permeabilidad de la membrana y su influencia en la síntesis inicial de ATP (Cardwell, 1984). El catabolismo del almidón a glucosa, sacarosa y rafinosa, se lleva a cabo a través de hidrólisis enzimática, estos azúcares son utilizados por el embrión como fuente de carbono (Copeland, 1985).

Por otra parte, las proteínas son hidrolizadas por peptidasas y degradadas a aminoácidos, los cuales son transportados al embrión y reincorporados en nuevos polipéptidos (Carwell, 1984 y Copeland, 1985). Los lípidos son también utilizados para lo cual son degradados a ácidos grasos y glicerol por la actividad de enzimas como la lipasa. Los ácidos grasos, pasan posteriormente por procesos de α y β oxidación. En la α

oxidación, los ácidos grasos pierden un átomo de carbono y CO_2 , mientras que en la β oxidación, se forma Acetyl-CoA y energía en forma de ATP. El Acetyl-CoA entra posteriormente al ciclo de Krebs; Las citocininas junto con el ácido giberélico, inducen la síntesis de otras enzimas que degradan a las proteínas y lípidos en compuestos mas simples; El ABA por otra parte, en semillas con latencia de tipo fisiológico, es un inhibidor de la germinación que bloquea la síntesis de ADN y la transcripción de ARNm. Durante la germinación, el tejido de almacén (carbohidratos, lípidos y proteínas) es hidrolizado y degradado en compuestos más simples (por las enzimas recién activadas) y de mayor movilidad que posteriormente serán translocados a los puntos de crecimiento del embrión. El proceso de germinación finaliza cuando las células del embrión se dividen activamente; para que emerja la radícula de la testa de la semilla. Posteriormente, las células del endospermo y las del embrión, sintetizan auxinas las cuales primero inducen el alargamiento de los meristemos de la radícula y luego el alargamiento del tallo. Mediante la acción de las auxinas y las citocininas se induce el proceso de la diferenciación de los tejidos, así como el crecimiento direccional del tallo hacia arriba y el de la raíz hacia abajo (Copeland, 1985).

En células de almacenamiento de todo tipo de semillas, las proteínas de reserva se depositan en estructuras delimitadas por membranas, a las que se conoce como cuerpos proteínicos. Los cuerpos proteínicos no son proteína pura, sino que también contienen gran parte de reservas de fosfato, magnesio y calcio. El fosfato se esterifica a cada uno de los seis grupos hidroxilo de una azúcar alcohólico hexacarbonado conocido como mioinositol. El producto de esta esterificación se denomina ácido fitico, mientras que la liberación de iones H^+ de los grupos fosfato permite a los iones Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y probablemente K^+ formar sales a las que en conjunto se conoce como fitina o, en ocasiones fitatos. La fitina casi siempre se une a proteínas en los cuerpos proteínicos. La imbibición de agua en una semilla seca desencadena una variedad de reacciones químicas que conducen a la germinación (protrusión de la radícula a través del tegumento seminal) y el subsecuente desarrollo de la plántula. Las proteínas de los cuerpos proteínicos se hidrolizan mediante proteinazas (proteasas) y peptidasas a aminoácidos y amidas. Las membranas que rodean a los cuerpos proteínicos en desintegración no se destruyen, en cambio, se fusionan para formar el tonoplasto

alrededor de la vacuola central en crecimiento. Parte de los aminoácidos y amidas que se liberan durante la hidrólisis de proteínas en semillas se utiliza para formar nuevas proteínas especiales, ácidos nucleicos, etc. En las células en donde se efectúa la hidrólisis, aunque la mayor parte se transloca a través del floema hacia las células en crecimiento de raíz y partes aéreas. La liberación de fosfato y cationes procedentes de la fitina en cuerpos proteicos también ocurre durante la germinación (Salisbury y Ross, 1994).

2.8.3. La latencia

Las mayoría de las semillas de casi todas las especies germinan tan pronto las condiciones son favorables; pero si las semillas no germinan se dice que son dormantes o se encuentran en latencia. Aparentemente la latencia evolucionó como un mecanismo de supervivencia de las especies a las condiciones climáticas, pues en las regiones de clima templado, el frío invierno amenaza su supervivencia. La latencia tiene algunas desventajas ya que son necesarios períodos largos para que las semillas de una determinada especie la supere, la germinación se distribuye en el tiempo, contribuyendo a la longevidad de las plantas invasoras, interfiere con programas de siembra, presenta problemas para evaluar la calidad de las semillas (Gouvêa, 1983).

Algunas causas de la latencia son según el origen de la latencia las semillas que pueden deberse a que el embrión inmaduro o rudimentario no está completamente desarrollado cuando la semilla se desprende de la planta. Si estas semillas se colocan a germinar bajo condiciones favorables, la germinación se retarda hasta que el embrión sufre las modificaciones anatómicas y fisiológicas que le permiten completar su diferenciación y crecimiento. Otra circunstancia es dada por la impermeabilidad al agua donde las semillas pueden poseer un tegumento que impide la absorción de agua y la ruptura de la testa, e iniciar la germinación, otra podría ser la impermeabilidad al oxígeno que se da cuando las estructuras como el pericarpio o tegumento también impiden el intercambio gaseoso. Este tipo de latencia es común en gramíneas. Se da también cuando las restricciones mecánicas el tegumento o cubierta protectora puede presentar resistencia mecánica capaz de impedir el crecimiento del embrión a este tipo de latencia se le puede superar removiendo o perforando la cubierta protectora de la semilla. Otro

caso es cuando el embrión es dormante, o sea que se le caracteriza así porque la causa de la latencia está en el embrión, estas semillas presentan exigencias especiales de luz o temperatura. Y por ultimo puede existir una combinación de causas pues la presencia de una causa de latencia no elimina la posibilidad de que otras causas estén presentes (Peretti, 1994).

2.9. Medios de cultivo

Los tipos de medios más usados para diversas especies de tejidos vegetales son los siguientes:

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).

El medio de Murashige y Skoog (MS) es el más usado para diversas especies de plantas, es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. Se le denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias, para adecuarlas al cultivo de diferentes especies tal como lo han hecho muchos investigadores (Pelacho *et al.* 2008).

2.10. Los Fitoreguladores

Los fitoreguladores son sustancias reguladoras del crecimiento en los vegetales, estas son sintetizadas en el interior de la planta y en bajas concentraciones pueden activar, inhibir o modificar cualitativamente el crecimiento, ejerciendo normalmente esta acción en un lugar distinto al origen (Hill, 1997). El crecimiento y el desarrollo en vegetales son controlados por la acción de cinco grupos de hormonas, las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscisico y etileno (Polina, 1989). Estas hormonas ejercen un efecto poderoso en algún aspecto de crecimiento y desarrollo de las plantas (Salisbury y Ross, 1994 y Black and Bucovac, 1996). Así, las auxinas controlan la

formación y el crecimiento de la raíz; las giberelinas regulan la síntesis de proteínas y alargamiento del tallo; las citocininas, la diferenciación de órganos; el etileno la maduración de los frutos y el ácido abscísico el bloqueo de la germinación (UPV, 2003).

2.10.1. Giberelinas

La giberelina es una fitohormona que se produce naturalmente en la zona apical, frutos y semillas, de las plantas. Los efectos fisiológicos naturales de esta fitohormona son promover el crecimiento del tallo de las plantas mediante la estimulación de la división y elongación celular, regulan la transición de la fase juvenil a la fase adulta. También influyen en la iniciación de la floración, para algunas especies la formación de flores unisexuales; promueven el establecimiento y crecimiento del fruto, en casos donde las auxinas no aumentan el crecimiento, promueven la germinación de las semillas (ruptura de la dormición) y la producción de enzimas hidrolíticas durante la germinación (Soberón, *et al.* 2005).

Son muchas sustancias químicas relacionadas en la familia de las hormonas vegetales, llamadas giberelinas. Pues muchas giberelinas diferentes están presentes en los vegetales, pero solo una giberelina posee la actividad biológica significativa en relación a la germinación de las semillas el (AG_3).

A partir de su estructura y función se clasifica la naturaleza de las giberelinas. Todas las giberelinas se derivan del esqueleto gibane y de compuestos ácidos, por lo que se denominan ácidos giberélicos (AG), con un subíndice diferente para distinguirlas entre ellas. El AG_3 se ha llamado ácido giberélico históricamente, pero el término también se usa a menudo para describir todas las giberelinas. El AG se encuentra extendido tanto en las plantas sin flores (gimnospermas) como en las que tienen flores (angiospermas), de igual manera en los helechos. Se han aislado giberelinas en plantas inferiores como los musgos y algas, en dos especies de hongos, y más recientemente en dos especies bacterianas. Se han identificado más de 90 AG's, no todas probablemente importantes en la planta (Mauseth, 1991; Salisbury y Ross, 1994).

En el caso especial de la germinación las giberelinas actúan como un sustituto de bajas temperaturas, días largos o luz roja. Uno de los efectos de las giberelinas en la semilla es estimular la elongación celular de manera que la radícula pueda empujar a través del endospermo, la cubierta seminal o la cubierta del fruto que restringe su crecimiento (Salisbury y Ross, 1994). Por otro lado estimulan la producción de la enzima α -amilasa para la movilización de reservas de la semilla en la germinación de granos de cereales.

Las giberelinas parecen transportarse fácilmente en el embrión hidratado por ser hidrosolubles y atravesar fácilmente las membranas celulares; inducen la acción de las enzimas hidrolíticas existentes en la semilla y su nueva síntesis. Intervienen en el metabolismo de la glucosa, en la respiración y en la síntesis de nuevas proteínas, incluyendo las proteínas enzimáticas (Besnier, 1989).

2.11. Micropropagación de Cactáceas

Para la propagación *in vitro* de cactáceas, este proceso puede iniciarse mediante; plantas donadoras y mediante germinación *in vitro*. La razón es debido a que las especies de esta familia son de crecimiento lento como para establecer un cultivo previo con el fin de tener plantas donantes, por lo se opta por realizarse la germinación directamente *in vitro*.

- a) **Plantas donadoras.** Este método consiste en a la colecta manual de la especie, en su forma adulta o joven principalmente, sustrayéndola de su hábitat o jardín. De esta colecta la planta recibe un proceso de desinfección y cortes que posteriormente se colocaran en medios de cultivo.

- b) **Germinación *in vitro*.** Se refiere a la colecta de semillas de una especie de interés, requiere que la madurez fisiológica del fruto sea la adecuada para que la semilla sea viable. La semilla se somete a un proceso de desinfección y posteriormente se coloca en un medio nutritivo para promover su germinación.

2.11.1. Plantas donadoras

Para establecer un cultivo *in vitro* de cactáceas mediante plantas donadoras colectadas, era en un principio la mejor forma de reproducir especies en peligro o riesgo de extinción, esto como todo tiene sus ventajas y desventajas. El procedimiento en palabras sencillas se logra mediante la selección de fragmentos de plantas jóvenes, se cortan las raíces y se deja la fracción suculenta, se revisan minuciosamente que estas sean plantas sanas y fisiológicamente vigorosas, esto para asegurar el éxito el establecimiento del cultivo. Una de las desventajas es que para este procedimiento las plantas son sustraídas de su hábitat, perjudicando así la población de la especie en cuestión, otra de las desventajas es que las plantas tienen contaminantes de su medio ambiente y por su morfología dificultan una buena desinfección, a nivel vascular no sabremos si tiene alguna plaga, como un virus u otra enfermedad hasta una vez subcultivado (Cuellar *et al.* 2006). La ventaja a comparación con la germinación *in vitro*, sería que no se tiene que esperar a que la especie florezca y madure el fruto para extraer sus semillas.

2.11.2. Germinación *in vitro*

En México, en los últimos años, el cultivo de tejidos vegetales es una de las alternativas más exitosas para recuperar las especies en riesgo o peligro de extinción. Uno de los problemas que frecuentemente se enfrenta al implementar esta técnica es la obtención y desinfección de los explantes, pues en ocasiones no se dispone del material vegetativo, o bien este puede tener un alto grado de contaminación en el medio natural de donde se colecta, y aunado a la morfología que presentan las cactáceas, es difícil eliminar los contaminantes, por lo que las semillas son una muy buena alternativa para obtener explantes en condiciones asépticas, al inducir su germinación *in vitro*, de este modo, de las pequeñas plántulas obtenidas se utilizan sus tejidos como explantes para la formación de callo, brotes o plántulas (Comparan y Luna, 1994).

La germinación *in vitro* tiene ventajas a la germinación en condiciones naturales: pues puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, permitir la germinación de semillas con intermediario obligado, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto embrionario, reducir el tiempo necesario y sincronizar la germinación (Cuellar *et al.* 2006).

2.12. Antecedentes de la Germinación *in vitro*

Una de las ventajas de utilizar la técnica *in vitro* es obtener material libre de patógenos (Heras, 1990). La germinación de cactus puede llevarse a cabo *in vitro* en medios suplementados con sales inorgánicas, compuestos orgánicos, vitaminas, reguladores de crecimiento y agentes gelificantes.

Con la germinación *in vitro* se obtienen plántulas asépticas, consideradas como la fuente de explantes más adecuadas para la micropropagación, debido a que las plántulas obtenidas no presentan problemas de contaminación posterior (Comparan y Luna, 1994; Izquierdo y Palomino 1996).

Ibáñez *et al.* (1998), trabajaron con las especies *Stenocereus queretaroensis* (pitayo) y *Acanthocereus occidentalis* y observaron el crecimiento y la respuesta morfogénica *in vitro* a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Se trabajó con semillas las cuales se desinfectaron y sembraron en medio MS. Obteniendo un alto porcentaje de germinación entre los 40 y 60 días. Posteriormente se subcultivaron utilizando un medio MS adicionado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para brotación, BAP (bencilamino purina) y K (cinetina), siendo los tratamientos: T1= BAP 1mg/L y K 0 mg/L, T2= BAP 2 mg/L y K 1 mg/L, y T3= BAP 3 mg/L y K 2 mg/L para *S. queretaroensis*, y BAP 2 mg/L y K 1 mg/L para *A. Occidentalis*. Se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controlada. Los resultados indicaron que *S. queretaroensis* y *A. occidentalis* son susceptible de cultivarse *in vitro* para su germinación en el medio MS (1962) adicionado con BAP 2 mg/L y K 1 mg/L, mientras que para la formación de brotes y crecimiento de los mismos el mejor tratamiento resultó ser el de BAP 3.0 y K 2 mg/L para *S. queretaroensis* y BAP 2.0 y K 1 mg/L para *A. occidentalis*.

Heras (1990), llevó a cabo un estudio estadístico de la germinación de diversas especies de cactáceas (*Epithelantha micromeris*, *Neolloydia lophophoroides* y *Aztekium nitter*) en medio MS, variando la concentración de los macroelementos a 1/4X, 1/2X y 1X, encontrando que las semillas de estas especies pueden ser germinadas *in vitro*, cuando se utiliza una menor concentración (1/4X y 1/2X) de los MS-macroelementos obteniendo una germinación hasta de un 100 %.

Infante (1992), desarrolló brotación y callos embriogénicos de pitahaya amarilla (*Melocactus coccineus*) a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas en medio MS con sales minerales, para la brotación utilizó BA (Benciladenina) y NAA (Ácido Naftalenacético) y para la inducción de callo NAA.

Padilla, *et. al.* (1995), utilizaron plántulas germinadas *in vitro* como explantes para micropropagar *Echinocereus pectinatus*, en medio MS adicionado con NAA y BAP por separado, el mejor resultado se obtuvo con BAP a concentraciones de 0,03 y 0,08 mg/L.

Morales (2000), desinfectó semillas de *H. undatus* siguiendo la siguiente técnica: lavado en agua corriente, inmersión en etanol absoluto por 5 seg., inmersión en una solución de Hipoclorito de sodio comercial a 10 % v/v, con Tween 20 por 10 min., se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se sembraron en agar (7g/L), obteniendo un alto porcentaje de germinación y al subcultivar las plántulas a medio MS con BAP (Bencilaminopurina) (2mg/L) y K(Cinetina) (1 mg/L) se desarrolló una intensa brotación.

Villavicencio *et al.* (2000), evaluaron seis tratamientos 1) MS al 100 % y 50 %, y el medio MAAS (con agua, 0.6% agar y 3% de sacarosa), todos con dos niveles de ácido giberélico (0 y 20 mg/L) para promover la germinación *in vitro* en semillas de *Astrophytum myriostigma*. Aun cuando no hubo diferencias estadísticas entre ellos, se logró determinar que a los 42 días de incubación que el mejor medio para la germinación es con 1/2X de concentración de MS-macroelementos del cual se obtuvo un 67 % de germinación en plántulas de mayor altura y calidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo (CESAL)-CIRNE-INIFAP, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicado en la carretera 57 Saltillo-México en la ciudad de Saltillo, Coahuila.

3.1.1. Características y áreas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP está diseñado y adecuado para la micropropagación de especies vegetales de interés alimenticio y ecológico del norte de México, está conformado por 4 áreas:

Área de lavado. Es el área donde se lava y esteriliza todo el material utilizado en los procedimientos de cada una de las áreas, cuenta con el siguiente equipo: autoclave, destilador y deionizador de agua entre otros.

Área de preparación de medios. En ésta se preparan los distintos medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio; cuenta en bodega con reactivos y sustancias para su realización así como, el equipo necesario para llevar a cabo los procedimientos: Balanza analítica, Potenciómetro, Agitadores magnéticos, Microondas y Refrigerador entre otros.

Área de siembra. En esta área se realiza bajo la campana de flujo laminar el establecimiento *in vitro* y subcultivo de diferente material vegetativo, pues permite y conserva condiciones de asepsia.

Área de incubación. El área de incubación es un cuarto equipado con estantes donde se coloca el material vegetal. El ambiente es controlado, aquí crecen los diferentes explantes establecidos en tubos, frascos y envases de capacidad variable. El fotoperiodo es simulado por lámparas de luz artificial que puede ser regulado a las necesidades, al igual que la temperatura.

3.2. Procedimiento Experimental

Se utilizaron semillas obtenidas de frutos completamente maduros, colectadas de los distintos hábitats de las especies; *Mammillaria pringlei*, *Mammillaria backebergiana*, *Turbincarpus alonsoi*, *Turbincarpus polaskii*. Las semillas se retiraron del fruto lavándose en agua corriente varias veces, procurando eliminar restos de la pulpa para evitar la proliferación de hongos. Una vez limpias, se guardaron en un sobre de papel con fecha y nombre de la especie en un lugar seco y fresco hasta el momento de la siembra. Como unidad experimental se utilizó un tubo de ensayo de vidrio con tapón. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para evaluar la germinación de las semillas de estas cuatro especies de cactáceas, sometidas a cuatro tratamientos (Medios de cultivo): T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃, considerando tres repeticiones por tratamiento.

3.2.1. Desinfección de la semilla

La desinfección de las semillas de cada una de las especies se llevó acabo colocándolas en una tela de poros grandes que permitieron la fácil penetración de los líquidos desinfectantes donde fueron sumergidas. Se realizó el mismo procedimiento de desinfección para todas las especies.

Una vez iniciado el proceso de desinfección, el primer lavado se realizó con agua destilada y esterilizada, después con alcohol al 70% eso con el fin de retirar grasas que dificulten la desafección, se regreso a agitación con agua para retirar los residuos de los desinfectantes y posteriormente a la solución de cloro al 30% para retirar microorganismos que pudieran proliferar en los medios de cultivo, por ultimo se lavaron con agua esterilizada. Todo esto se realizó con la mayor asepsia y bajo la campana de flujo laminar, como lo requieren todos los procesos de las técnicas de cultivo *in vitro*. Posteriormente se retiraron del saco de tela y se prosiguió con el secado de las semillas, colocando a estas en una caja de petri, bajo la campana de flujo laminar.

3.2.2. Preparación de los medios nutritivos

Se midieron las cantidades correctas de reactivos que llevaría cada tratamiento, se colocaron en un vaso de precipitado para preparar 1 litro de medio nutritivo, cada uno según su composición; T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃. Evitando en todo momento el contacto con el polvo del ambiente. Se colocó sobre el agitador magnético, se añadió una barra magnética y agua destilada para mezclar hasta disolver los reactivos totalmente, el medio se aforó hasta obtener un litro, se midió el pH con un potenciómetro eléctrico y se ajustó a 5.7 usando HCl o NaOH y mezclando constantemente. Una vez bien disuelto se llenaron los tubos de ensayo con 3 ml de medio nutritivo, de cada tratamiento se llenaron 100 tubos, se taparon y esterilizaron en la autoclave. Una vez esterilizados se dejaron enfriar a una inclinación de 45° con el fin de facilitar la siembra, se titulan con un marcador indicando el tratamiento.

3.2.3. Siembra de las semillas

La siembra se realizó bajo la campana de flujo laminar, una vez que las semillas estaban desinfectadas, se establecieron en el medio nutritivo a una profundidad de tres veces el tamaño de la semilla. Este procedimiento se realizó para todo el experimento.

3.2.4. Incubación

Una vez realizada la siembra los tubos se titularon con nombre de la especie y fecha de siembra. Se colocaron en gradillas en distribución completamente al azar como lo demanda el diseño experimental y se colocaron en la sala de incubación con un fotoperiodo de 16 horas y a una temperatura de +/- 25 °C, donde posteriormente se realizaron las evaluaciones cada siete días, durante siete semanas.

3.3. Diseño experimental y Análisis Estadístico

Para el experimento se utilizó un diseño completamente al azar y 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 la prueba de comparación (Tukey $P \leq 0.05$).

3.4. Parámetros evaluados

Los parámetros evaluados en esta investigación fueron: porcentaje y velocidad y de germinación, altura de la plántula y longitud de radícula. Las evaluaciones se agruparon por especie.

3.4.1. Evaluación del porcentaje de germinación

Para evaluar el porcentaje de germinación, se realizó el primer conteo de las semillas germinadas a los siete días de establecido el experimento, posteriormente se siguió la evaluación con el mismo intervalo de días hasta finalizar la investigación, considerando como semilla germinada aquellas que registraron 5mm de radícula.

3.4.2. Evaluación de la velocidad de germinación

La velocidad de germinación se obtuvo mediante la evaluación del número de semillas germinadas en función del tiempo. Se tomó la evaluación por intervalos de siete días.

3.4.2. Evaluación de altura de plántula

Esta se realizó al finalizar la investigación extrayendo las vitroplántulas del medio nutritivo y midiéndolas con una fracción de hoja milimétrica colocada bajo la caja petri. Se tomaron y anotaron los datos correspondientes a cada especie y tratamiento, para posteriormente ser procesados.

3.4.3. Evaluación de longitud de radícula

Esta también se realizó al finalizar la investigación extrayendo las vitroplántulas del medio nutritivo y midiendo la radícula con una fracción de hoja milimétrica colocada bajo la caja petri. Se tomaron y anotaron los datos correspondientes a cada especie y tratamiento, para posteriormente ser procesados.

Se tomaron y anotaron los datos correspondientes, para posteriormente ser procesados, las vitroplántulas fueron colocadas en nuevos medios nutritivos para su posterior multiplicación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los siguientes resultados se presentan por especie, considerando la respuesta de cuatro especies de dos géneros diferentes: genero *Mammillaria* con: (*M. backebergiana* y *M. pringlei*) y genero *Turbinucactus* con: (*T. alonsoi* y *T. polaskii*) sometidas a la germinación *in vitro*, considerando diferentes medios de cultivo en la etapa de establecimiento.

Es importante mencionar que para seleccionar el mejor tratamiento en la promoción de la germinación, se consideró no solo del tratamiento (medio de cultivo) que registró el mayor porcentaje de semillas germinadas, sino también aquel en donde las plántulas lograron sobrevivir. Así mismo se consideró en la selección aquellos tratamientos que promovieron la emergencia de un vástago con buen desarrollo, en altura y radícula por ser las estructuras encargadas de la absorción de los nutrientes y del área fotosintetizadora. Es importante recordar que las reservas que contiene la semilla le son útiles solo en los primeros días de vida, por lo que el tratamiento deberá proporcionarle también los nutrientes necesarios hasta el momento del subcultivo o trasplante.

4.1. Velocidad de germinación

Los resultados que a continuación se presentan indican la velocidad de germinación de las plántulas en función del tiempo de incubación. Esta evaluación nos reveló el tratamiento que promovió en el menor tiempo este proceso, seleccionando el medio adecuado para romper con la dormancia de cada una de las semillas de estas especies. Sánchez (2004), obtuvo resultados favorables para la velocidad de germinación en cuatro especies de cactáceas al aplicar AG₃ a tres diferentes dosis.

Para *Mammillaria backebergiana* se encontraron diferencias significativas en la velocidad de germinación, siendo el tratamiento T2 (MS + AG₃) el que registro la velocidad de emergencia más lenta, lo que significa que para esta especie el medio elaborado con macro, mico nutrimentos y un promotor de la germinación inhibieron el proceso germinativo en comparación al resto de los tratamientos. El efecto opuesto que

se obtuvo con los tratamientos adicionados con el osmoacondicionador, T3 (Agar + osmoacondicionador) y T4 (Agar + osmoacondicionador+ AG₃) donde la velocidad de emergencia fue mayor desde la segunda fecha de evaluación (a los catorce días de incubación), efecto que se mantuvo hasta la penúltima evaluación donde finalizó la emergencia de las plántulas. Con el T4, no se registro la muerte de las semillas ya germinadas, como ocurrió en los tratamientos T2 (MS + AG₃) y T3 (Agar + osmoacondicionador), en donde este último registro un 13 % de mortalidad a pesar de que en la penúltima evaluación registro con este tratamiento un 100 % germinación (Figura 1).

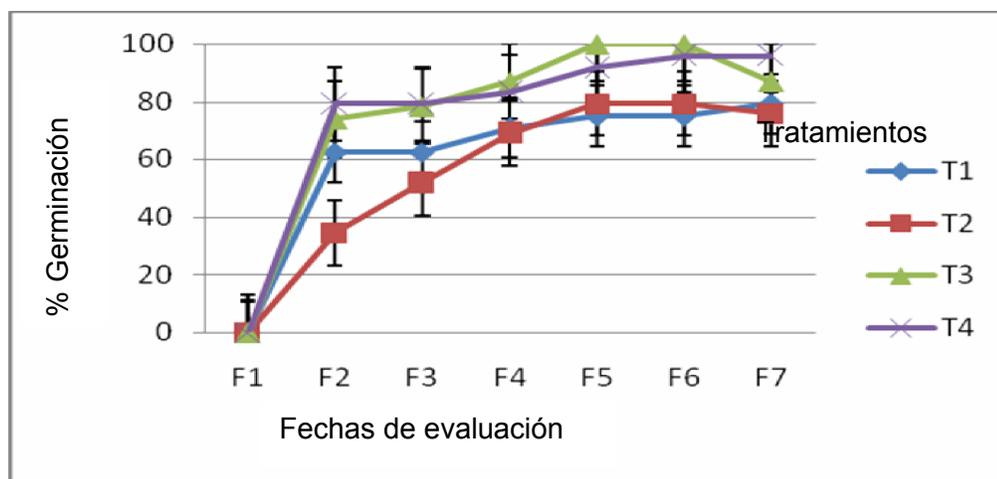


Figura 1. Velocidad de germinación *in vitro* en diferentes medios de cultivo para *M. backebergiana*, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Para *Mammillaria pringlei* al igual que para *M. backebergiana* el tratamiento T2 (MS + AG₃) registro la velocidad de emergencia más lenta. Un efecto opuesto se obtuvo con los medios de cultivo adicionados con osmoacondicionadores T3 (Agar + osmoacondicionador) y T4 (Agar + osmoacondicionador+ AG₃), registrando una germinación superior al 90 % (Figura 1 y 2). A diferencia de *M. backebergiana* esta especie no presento mortalidad en las semillas germinadas y su respuesta a este proceso fue mas uniforme en casi todos los tratamientos. Esto indica que esta especie no presenta alto nivel de dificultad para germinar, pero que al igual que a *M. backebergiana* el osmoacondicionador le facilita aun mas este proceso. Como lo reportan D'Aubeterre *et al.* (2006), para el caso del cardón de Guanajo, los tratamientos germinativos, incluyendo al testigo, dieron un porcentaje de germinación superior al 71.3

%. Quedando demostrado que algunas especies de cactáceas no necesitan estrictamente un proceso o tratamiento para promover su germinación (Figura 2).

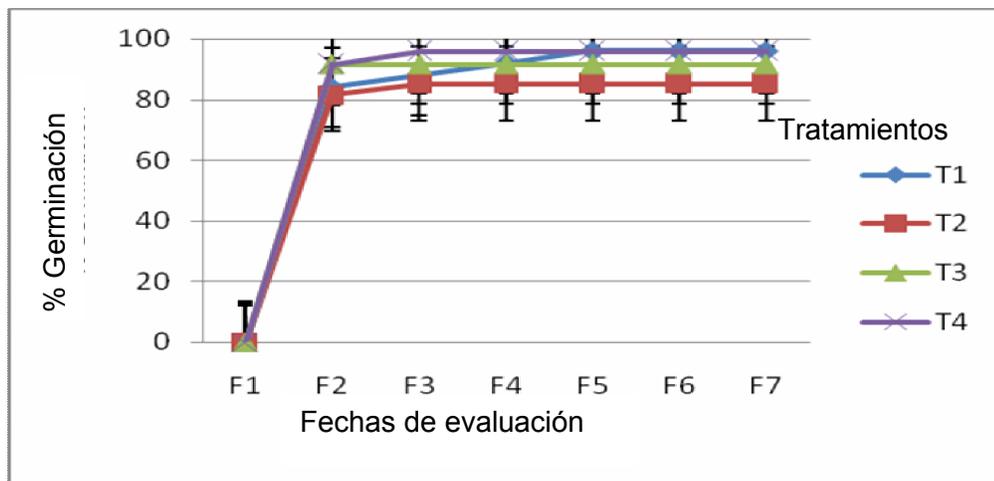


Figura 2. Velocidad de germinación *in vitro* en diferentes medios de cultivo para *M. pringlei*, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Para *T. polaskii* los tratamientos que promovieron en menor tiempo la germinación, en la segunda evaluación fueron los medios de cultivo adicionados con el osmoacondicionador; T3 (Agar + osmoacondicionador) y T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃); sin embargo, hasta los 49 días de evaluación solo se había desarrollado el epicotilo, por lo que las plántulas desarrolladas no fueron normales. Kozai (1991), menciona que cuando el osmoacondicionador está presente en el medio, las plantas no desarrollan fotoautotofía, lo cual pudo causar un lento crecimiento, menciona también que en algunos casos se da un alto porcentaje de muertes durante la aclimatación. Este efecto no se presentó en las vitroplántulas que emergieron en los otros medios de cultivo, pues con el tratamiento T2 (MS + AG₃) se obtuvo a los 21 días de incubación una emergencia máxima desarrollando plántulas normales. Se concluye que para esta especie un medio de cultivo adicionado con un osmoacondicionador promueve una pronta germinación; sin embargo, al parecer afecta el desarrollo de la plántula pues los tratamientos que no contenían el osmoacondicionador no presentaron vitroplántulas mal formadas. Para *T. polaskii* se cumple lo encontrado por D'Aubeterre *et al.*, (2006) y en el caso de *M. pringlei* y *M. backebergiana* de este mismo estudio se hace notar que algunas especies no presentan problemas para este proceso (Figura 3).

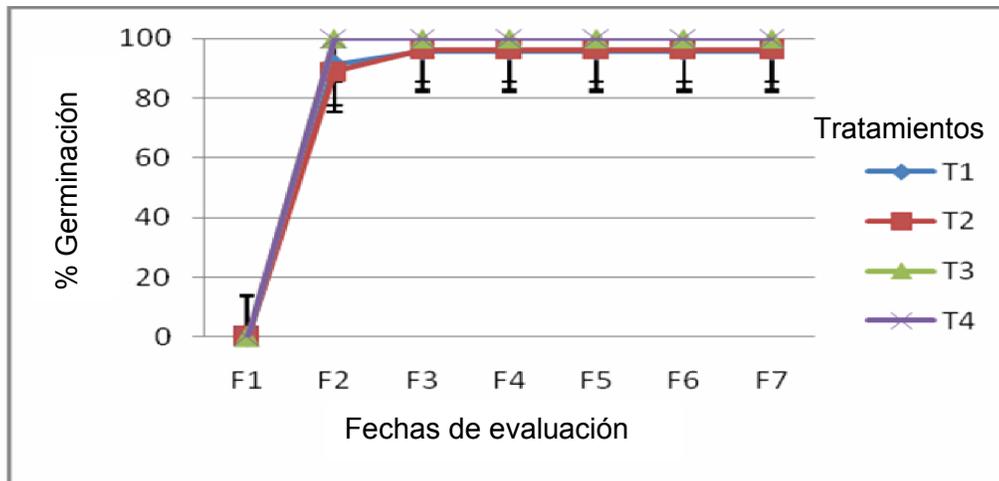


Figura 3. Velocidad de germinación *in vitro* en diferentes medios de cultivo para *T. polaskii*, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

En comparación a *T. polaskii*, *T. alonsoi* especie del mismo genero, registró diferencias en todos los tratamientos evaluados. Los medios de cultivo de los tratamientos T2 (MS + AG₃) y T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃), registraron desde los catorce días de evaluación mayor velocidad de emergencia, registrando un 15 % de emergencia a los 28 días de evaluación, para esta variable los resultados fueron mínimos debido a la escasa respuesta de gemación (Figura 4).

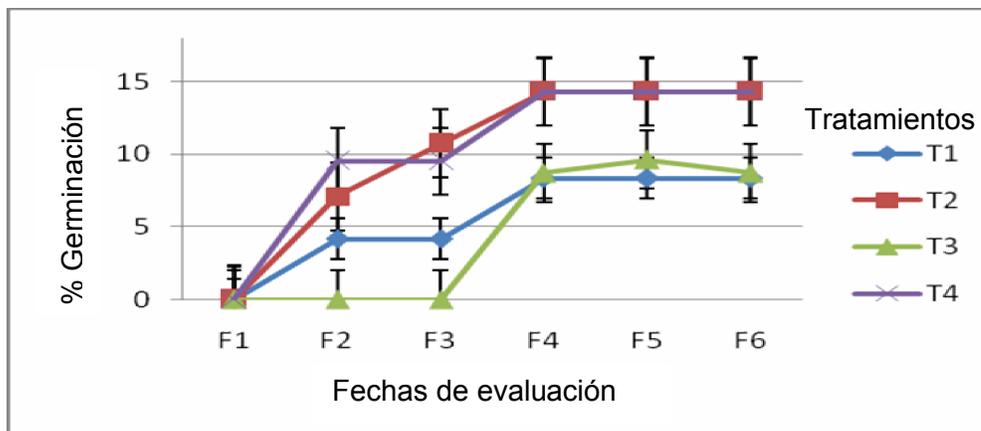


Figura 4. Velocidad de germinación *in vitro* en diferentes medios de cultivo para *T. alonsoi*, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

4.2. Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación representa el número de semillas germinadas a partir del total de semillas establecidas en cada tratamiento evaluado. Este conteo se realizó al final del experimento contando solo vitroplántulas vivas.

En esta investigación el porcentaje de germinación varió considerablemente en respuesta a los tratamientos para cada una de las especies de cactáceas, aun siendo estas del mismo genero, por lo que asumimos al igual que García (1993), que se debe establecer una metodología en particular para incrementar y mejorar la germinación de cada una de las especies, pues las cuatro especies de cactáceas con las que trabajo, poseen requerimientos al parecer estrictamente con la anatomía y estructura de las semillas.

Para el caso de *M. backebergiana* existieron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el medio de cultivo T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃) del que se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (96 %); sin embargo este tratamiento desarrollo vitroplántulas anormales junto con el tratamiento T3 (Agar + osmoacondicionador), a diferencia del tratamiento T1(MS (Murashige and Skoog) de donde se obtuvieron vitroplántulas normales con un porcentaje de germinación estadísticamente menor (79 %), pero con plantulas con estructuras bien desarrollados (tallo y radícula) (cuadro 1).

En *M. pringlei* se presentó el mismo efecto que la especie anterior; sin embargo todos los tratamientos registraron un porcentaje superior al 85%. Con esta especie los tratamientos T1 MS (Murashige and Skoog) y T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃) fueron estadísticamente iguales registrando un porcentaje de germinación del 96 %, lo que demuestra que bajo condiciones controladas este porcentaje es significativo; sin embargo, entre ellos existieron diferencias en la altura el epícotilo y radícula por lo que es necesario considerar estas variables al seleccionar el medio adecuado (Cuadro 2).

Con la especie *T. polaskii* los tratamientos T3 (Agar + osmoacondicionador) y T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃) fueron estadísticamente iguales y de los que se

obtuvo el 100 % de germinación, desarrollando vitroplantas anormales, efecto que no es conveniente en la micropropagación de esta especie. En cambio los tratamientos T1 (MS) (Murashige and Skoog) y T2 (MS + AG₃), se registró un porcentaje estadísticamente igual (96%) altamente significativo. En ambos casos las vitroplantas desarrolladas fueron normales con pocas diferencias en su altura de epicotilo y radícula, por lo que ambos tratamientos podrían utilizarse en la etapa de establecimiento en la germinación *in vitro* de esta especie (Cuadro 3).

4.3. Altura de plántula y Longitud de radícula

La altura de la plántula obtenida en este tiempo de evaluación es mínima, pues una de las características principales de las especies de esta familia es que son de lento crecimiento. Sin embargo, la altura obtenida en esta etapa es importante pues garantiza en parte la capacidad de la plántula para sobrevivir, pues podrá llevar a cabo la fotosíntesis y así continuar con su desarrollo, siendo útil para su posterior subcultivo. Por otra parte la evaluación de la longitud de la radícula es muy importante, pues las plántulas obtienen mediante ella los nutrientes. Una buena radícula nos habla de una plántula capaz de realizar sus funciones, por este motivo los mejores tratamientos son aquellos donde las plántulas presentan un desarrollo mas completo, tanto de vástago como de radícula. La variación en el tamaño responde a los tratamientos pues unos promueven y otros anulan el desarrollo de la misma.

Para el caso de *M. backebergiana* la altura media de las vástago obtenida mediante el T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃) fue el mas alto con 3.37 mm; sin embargo, no desarrollo radícula, los resultados que produjo el T1 (MS) fueron muy similares con 3.25 mm de altura de vástago, pero con el mas alto desarrollo de radícula. A pesar de que estos tratamientos no son homólogos, los otros tratamientos no se alejan mucho de estas medidas, por lo que podría asumirse que la especie respondió favorable a esta variable. Las diferencias significativas inducidas por el medio de cultivo utilizado, se denotan en la variable, longitud de raíz. El mejor tratamiento para la variable radícula fue el T1 (MS) con una longitud media de 2.8 mm siendo la mas significativa estadística y fisiológicamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación *in vitro* de *M. backebergiana* en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

| TRATAMIENTO | GERMINACION (%) [*] | ALTURA PLANTULA (mm) [*] | LONGITUD DE RADICULA (mm) [*] |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| T1 | 79.16 c | 3.25 a | 2.08 a |
| T2 | 75.86 c | 2.86 a | 0.68 b |
| T3 | 86.95 b | 2.82 a | 0.00 c |
| T4 | 95.83 a | 3.37 a | 0.00 c |

^{*}Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P (\alpha \leq 0.05)$); T1- MS (Murashige and Skoog), T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Con el T2 (MS + AG₃) se presentó una disminución muy importante en esta variable, que para los otros dos tratamientos aunados al osmoacondicionador, inhibieron totalmente el desarrollo de la radícula. Podría asumirse que el ácido giberélico tuvo un efecto negativo como lo menciona Sánchez (2004), donde al evaluar la longitud de radícula en *Ferocactus stainesii* encontró que los tratamientos que incluyeron GA₃ dejaron ver un efecto inhibitorio, pues presentaron la menor elongación de las raíces a comparación del testigo (MS). Al igual que Kozai (1991), la presencia de osmoacondicionadores inhibe su buen desarrollo. Estos efectos no se observaron en todas las especies.

En *M. pringlei* todos los tratamientos produjeron un buen porcentaje de germinación, el T2 (MS + AG₃) fue el mejor tratamiento para esta especie, pues para las variables de altura de plántula presentó 6.22 mm) y con una longitud de raíz de 4.22 mm, fue el que presentó los valores más significativos del análisis de varianza para estas dos variables, aunque presentó 85% de germinación que fue el menor porcentaje de todos los tratamientos, la diferencia no es mucha y es un buen porcentaje. El T1 (MS) también presentó resultados positivos con mayor porcentaje de germinación pero con valores un tanto menores a los del T2 para las variables altura de plántula y longitud de raíz, siendo estas dos últimas buenas medidas. El resto de los tratamientos con respecto a las variables altura de plántula y longitud de raíz presentaron medidas un tanto menores aunque los porcentajes de germinación fueron altos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación *in vitro* de *M. pringlei* en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

| TRATAMIENTO | GERMINACION (%) [*] | ALTURA PLANTULA (mm) [*] | LONGITUD DE RADICULA (mm) [*] |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| T1 | 96.00 a | 5.52 a | 3.32 ba |
| T2 | 85.18 b | 6.22 a | 4.22 a |
| T3 | 91.66 ba | 3.41 b | 2.20 bc |
| T4 | 95.83 a | 4.66 ba | 1.29 c |

^{*}Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P (\alpha \leq 0.05)$); T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Para la especie *T. polaski* los tratamientos T3 (Agar + osmoacondicionador) y T4 (Agar + osmoacondicionador + AG₃) obtuvieron el 100 % de la germinación, sin embargo para la variable raíz presentaron datos con valores de cero, sugiriendo que para esta especie la falta de sales o la presencia del osmoacondicionador, como lo menciona Kozai (1991), en este ultimo o la donde uno de estos elementos o en su conjunto incidieron en esta variable, provocando la inhibición de su desarrollo. También presentaron los valores más bajos para altura de plántula tal vez debido falta de nutrientes. Pero esta especie en particular no presento mortalidad de plántulas durante toda la evaluación, en estos tratamientos. Por lo que se puede especular que lo que mantuvo con vida a estas plántulas fue la absorción de nutrientes mediante los haces vasculares. Lo cierto que para esta especie en particular, se obtuvieron mediante el T2 (MS + AG₃) los mejores resultados, tomando en cuenta la velocidad y porcentaje de germinación, así como las mejores características de plántulas; vástago y radícula.

Cuadro 3. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación *in vitro* de *T. polaskii* en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

| TRATAMIENTO | GERMINACION (%) [*] | ALTURA PLANTULA (mm) [*] | LONGITUD DE RADICULA (mm) [*] |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| T1 | 95.65 b | 9.65 a | 4.17 a |
| T2 | 96.29 b | 10.29 a | 5.85 a |
| T3 | 100.00 a | 4.13 b | 0.00 b |
| T4 | 100.00 a | 6.05 b | 0.10 b |

^{*}Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey ($P (\alpha \leq 0.05)$); T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Para *T. alonsoi* las variables altura de plántula y longitud de radícula no fue posible evaluarlas, por su casi nulo desarrollo aunado a que su proceso de germinación probablemente sea aun mas largo (Cuadro 4). Algunas de las causas por las que no presento un favorable porcentaje de germinación podría deberse a la presencia de tegumentos muy duros como lo presentan algunas semillas como *Passiflora caerulea L.* donde Severin, *et al.* (2004), encontró que al realizarle un corte en el tegumento y con alternancias de temperatura, obtuvo una mejor respuesta de germinación en el medio; (MS, 2 % de sacarosa y 0,7 % de agar). Según Jurado y Flores (2005), mencionan que algunas especies de cactáceas presentan mayor germinación en semillas de 1 año o más, que en semillas recién colectadas, así como especies que tienen la capacidad de germinar de manera similar con semillas recién colectadas y con semillas de 1 o 2 años de edad. Este puede ser otro de los factores del porque *T. alonsoi* no respondió a los tratamientos sometidos. Según Vilchis (2005) y Velásquez (2004), la especie *Echinomastus mariposensis* y *Astrophytum miriostigma*, respectivamente, necesitan el proceso de escarificación con ácido sulfúrico por distintos tiempos, pues mencionan que el ácido sulfúrico a un tiempo adecuado a la especie, ocasiona pequeñas lesiones que permiten la entrada de agua y oxígeno, factores necesarios para la germinación. Un exceso de tiempo en esta solución ocasiona daños al embrión anulando la germinación o provocando el desarrollo de plantas malformadas. Pudiera ser que esta especie necesite de algún tipo de escarificación.

Cuadro 4. Comparación de medias respecto a la respuesta de la germinación *in vitro* de *T. alonsoi* en diferentes medios de cultivo establecidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

| TRATAMIENTO | GERMINACIÓN (%) |
|-------------|-----------------|
| T1 | 8.33 |
| T2 | 14.28 |
| T3 | 8.96 |
| T4 | 14.28 |

T1- MS (Murashige and Skoog) T2- MS + AG₃, T3- Agar + osmoacondicionador, T4- Agar + osmoacondicionador + AG₃.

Como es notorio se encontraron muy pocas referencias para las variables Altura de plántula y longitud de radícula, haciendo necesaria la evaluación de estas variables en este tipo de investigaciones, pues Vilchis (2005) y Sanchez (2004), reportan diferencias en las medidas de ambas variables, dependientes de la especie y los tratamientos. Por otra parte Rodrigo *et al.* (2006), reporta plántulas de *Rhodophiala bífida* obtenidas *in vitro* con los tratamientos DDF, DDS y DS, un elevado porcentaje de plántulas vitrificadas, alcanzando 78 %, 72 % y 68 % respectivamente. Siendo este uno de los problema comunes en los cultivos *in vitro* fenómeno que no se presento en esta investigación.

En este tipo de investigaciones, autores como (García, 1993; Ibáñez *et al.* 1998), coinciden en que es necesario establecer diferentes medios de cultivo, que se adapten a cada una de las especies de cactáceas. Los resultados obtenidos sostienen este principio, pues las especies presentaron diferentes resultados a los distintos tratamientos sometidos.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta investigación, se puede concluir que:

Los medios nutritivos para promover y optimizar la germinación *in vitro* necesitan adecuarse a cada especie en particular, pues cada una responde fisiológicamente diferente a ellos.

La germinación *in vitro* de las semillas de cactáceas, resulta una muy buena opción para obtener explantes para su micropropagación, permite trabajar con mayor asepsia y mejora el manejo de los explantes.

Para *M. backebergiana* con 79% de germinación el T1 (MS 100%) fue el mejor, pues produjo plántulas con mejores características, en altura de vástago y longitud de radícula.

Para *M. pringlei* con 85% de germinación fue el T2 (MS 100 % + AG3) el mejor, pues presento las mejores características en altura de vástago y longitud de radícula.

Para *T. polaskii* el T2 (MS 100 % + AG3) con 96% de germinación presento las mejores características en altura de vástago y longitud de radícula. Siendo este tratamiento y especie los que mejores resultados obtenidos en esta investigación.

Para *T. alonsoi* los tratamientos no parecen haber mejorado la germinación pues los resultados no fueron significativos.

Hace falta más investigación en este ámbito, probar mas formulas nutritivas en las especies de cactáceas, con el fin de establecer el más apropiado para cada especie, pues se presentaron resultados diferentes entre especies del mismo género.

6. LITERATURA CITADA

- Anderson F. E. 2001. La Familia de Cactus. Timber pp. 665-673.
- Barba, A. 1991. Reguladores de crecimiento vegetal (capítulo 4). En: cultivo de tejidos vegetales. México: Trillas, pp 48-66.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas Biología y Tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 637p.
- Black, B. and Bukovac, M. J. 1996. Plant growth regulator application technology, uptake and action. pp. 40-50, In: P. K. Andrews; G. A. Lang; K. Millinix (eds). Tree Fruit Physiology: Growth and Development. Good Fruit Grower. Washington, USA.
- Bravo H y Scheinvar L. 1995. El interesante Mundo de las cactáceas. UNAM. México. pp 130-134.
- Bravo, H. 1978. Las cactáceas de México 2° ed. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bravo, H. y M. H. Sánchez. 1991a. Las cactáceas de México. Tomo II. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Imprenta Madero. 404p.
- Bravo, H. y M. H. Sánchez. 1991b. Las cactáceas de México. Tomo III. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Imprenta Madero. 643p.
- Cardwell, V. B. 1984. Seed germination and corp production. In: Physiological basis of corp growth and development. American Society of Agronomy-Corp Science Society of America. Madison, Wisconsin. pp 53-92.
- Christopher R. 2003. Saqueo de cactus — un comercio espinoso que amenaza al Desierto Chihuahuense. WWF News Centre. www.panda.org/news_facts/newsroom/index.cfm?uNewsID=5406&uLangID=4. (26 Agosto 2008).
- Comparan, S. S. y J. Luna 1994. Aplicación de la Técnica de cultivo *in vitro* de tejidos para la propagación de las especies *Echinocereus delaetii* y *Pelecyphora aselliformis*. Memorias del Primer Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. México D.F. 65 p.
- Copeland, L. O. and M. B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology. 2da. ed. Burgess Publishing Company. USA.
- Cuellar CH. L., Ma. E. M. Rubio, J. F. N. Treviño. 2006. La Germinación *in vitro* una Alternativa para Obtener Explantes en Cactáceas. Departamento de biología

celular y genética, Facultad. De Ciencias Biológicas UANL. www.lamolina.edu.pe/CIZA/PDFs/Art%209-%20ZA10.pdf. (17 Septiembre 2008).

- D'Aubeterre, R., Z. Piñero., E. García y M. A. Figarella. 2006. Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre la germinación de cinco especies de cactáceas (*Opuntia ficus indica*, *Pilosocereus moritzianus*, *Stenocereus griseus*, *Cereus deficiens* y *Cereus hexagonus*) del estado Lara. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro de Investigaciones del estado Lara. INIA Lara, Venezuela. www.ceniap.gov.ve/pbd/Congresos/agroforesteria/articulos%20pdf/daubeterre_ramon_2.pdf -. (10 Septiembre 2008).
- Escobar, 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.
- Fitz, W.A. & B. Maurice. 2002. *Turbinicarpus alonsoi*. Powerset. Wikipedia articles. <http://www.powerset.com/explore/go/Turbinicarpus-alonsoi>. (07 Octubre 2008).
- García, R. H. 1993. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. 67p.
- Glass, E. C. 1998. Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México. Fideicomiso para la Biodiversidad. México, D. F.
- Gouvêa, L. 1983. A germinação das sementes. Secretaria-Gral de Organização das Escolas Americanas, Washinton, D.C. 722 p.
- Guiñazú, M. E.; M. T. Ponce; J. Guzmán; J. E.; M. A. Cirrincione. 2005. "Micropropagación de vid: protocolo para variedades; Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Vol. 37, no. 2, pp 93 - 103. <http://bdigital.uncu.edu.ar/bdigital/fichas.php?idobjeto=787>. (02 Septiembre 08).
- Hartmann, H. y D. E. Kester. 1995. Propagación de plantas. Ed. Continental. México. 130 p.
- Heinemann, H. 1980. ¿De Dónde Viene el Nombre de Cacto?, en Cactáceas y Suculentas Mexicanas, vol. XXV, N° 2. pp 27-32 .
- Heras, C. M. G. 1990. Germinación y cultivos de tejidos de especies cactáceas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 88 p.

- Hernández, H. M. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Herbario Nacional. Instituto de Biología, UNAM. [www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/ct_a26\(33-52\).pdf](http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/ct_a26(33-52).pdf). (25 Septiembre 2008).
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp 31-43. Citado por Sosa, (2004).
- Hill, T. A. 1997. Hormonas reguladores del crecimiento vegetal. Ediciones Omega. Barcelona, España. 94 p.
- Hu, C. Y. and P. J. Wang. 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Culture. pp 177-227.
- Hudson, T. H. y D. E. Kester. 1982. Propagación de Plantas principios y practicas. Edición Continental, S.A. de C.V. México.
- Ibáñez, R., K. R. Páez y N. Fregoso. 1998. Las pitayas también tienen su historia. CNCA.
- IMGEMA. 2008. Técnicas de cultivo *in vitro*. Jardín de Córdoba. España. www.jardinbotanicodecordoba.com/inves_cons_cult_invi.php. (29 Septiembre 2008).
- Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis on yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant cell tissue and organ culture. 31(2): pp 155-159.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1996. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Seed Sci & Technol, Zürich, Switzerland. pp 274-333.
- Isaza, L. 2004. Establecimiento *in vitro* con fines de producción masiva. Año 10 No. 26 pp193-198. [www.utp.edu.co/php/revistas/sciencia ettechnica](http://www.utp.edu.co/php/revistas/sciencia_ettechnica). (29 Agosto 2008).
- Izquierdo, J. y G. Palomino. 1996. Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas en zonas áridas oficina regional la FAO para América Latina y el caribe. Santiago - Chile.
- Jacobsen, J. V. 1984. The Seed: Germination. In Johri, B.M. 1984. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag New York. pp 611-646.
- Jiménez, E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp Híbrido*). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Citado por Sosa, (2004).

- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro* (capítulo 1) En: Propagación y mejora de plantas por Biotecnología de las Plantas. pp 13-22. . .
- Jurado, E. y J. Flores. 2005. Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? *Vegetation Sci.* 16. pp 559-564.
- Kaktalina. 2006. Genero *Turbinicarpus*. Cactus y Crasas. www.agoracactus.com.ar/index.php?topic=1526.msg6783#msg6783. (12 Septiembre 2008).
- Kozai, T. 1991. Autotrophic Micropropagation. Autotróficas Micropropagación. p.313-343. In: Bajaj (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry 17: High-tech and Micropropagation I*. En: Bajaj (ed.) *Biología en la agricultura y la silvicultura 17: High-tech y Micropropagation I*. Springer-Verlag, NY Springer-Verlag, NY.
- León, J. 2006. Cactáceas. [www.suculentas.com/familias/cactaceas /index.php](http://www.suculentas.com/familias/cactaceas/index.php). (02 Septiembre 2004).
- López, C. E. 2003. Enraizamiento y aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*. www.ciencias.uma.es/enraizamiento.html. (29 Agosto 08).
- López, G. J. J. y G. P. García. 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.
- Machado, P. 2002. Micropropagación *in vitro* de la *Gerbera jamesonii* H Bolus. Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientie en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Citado por Sosa, (2004).
- Martínez, S., C. González, M. Fonte. y O. Pérez 1992. Evaluación de diferentes métodos de introducción de donantes en Biofábricas. Ponencia al 7mo Forum de Ciencia y Técnica. MINAGRI. 20 p. <http://rutas.ucf.edu.cu/Tesis%20Maestria/Tesis%20Odalmys.pdf>. (29 Agosto 2008).
- Mauseth, J. D. 1991. *Botany: an introduction to plant biology*. Philadelphia: Saunders. USA. pp 348 – 415.
- Michel L., B. Willy. 2003 a. Mammillarias Specie description. http://mammillarias.net/gallery/mammillaria_species.php?searchstring=backebergiana%20ssp%20backebergiana&lg=uk. (5 Octubre 2008).
- Michel L., B. Willy. 2003 b. Mammillarias Specie description. www.mammillarias.net/gallery/mammillaria_species.php?searchstring=pringlei&lg=uk. (5 Octubre 2008).

- Morales, R. M. E. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth). Tesis de Maestría, Especialidad en Botánica. Fac. de C. Biológicas. UANL. México.
- Moreno, P. N., J. J. López y L. Arce. 1992. Aspectos sobre las semillas y su germinación de *Echinomastus mariposensis* (Hester) . Cact. Suc. Mex. 37 p.
- Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25. pp 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.
- Nelo Font. 2005a. Mammillarias, *Mammillaria rhodantha*. www.nelocactus.org/rhodantha.html. (4 Octubre 2008).
- Nelo Font. 2005b. Mammillarias, *Mammillaria backebergiana*. <http://www.nelocactus.org/backebergiana.html>. (4 Octubre 2008).
- Nessman, J. D. 1994. Para el Cuidado de los Cactus y Plantas Crasas. Ed. SUSAETA. Madrid, España. 153 p.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Normativo II. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_059_a2g.html.(20/ Octubre /2008).
- Nobel, P. S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México. 211p.
- Ondarza, R. 2002. Biotecnología Básica. Trillas. México. 21p.
- Orellana, P. 1998. Introducción a la Propagación Masiva. (capitulo 7). En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp 125-132.
- Padilla, R. J. L.; H. S. Espino y L. M. Valera. 1995. Respuesta *in vitro* de *Echinocereus pectinatus* a dos reguladores del crecimiento NAA y BAP. Memorias del II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Aguascalientes Ags. México. 55p.
- Pelacho A. A. M., L. M. Closas, C. R. M. Baldovino, J. S. Llop, J. B. Solans, G. A. Valls. 2008. Medio de cultivo. www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm. (24 Agosto 2008).
- Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Ed. Hemisferio Sur S.A. Arg., 281p.

- Pérez, P. J. N., E. Jiménez, y D. Agramonte. 1998. Propagación masiva en Biofábrica (capítulo 14). En: Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Editado por Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Pierik, R. L. M. 1990. Preparación y composición de los medios nutritivos. En: Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp 49-84.
- Planetacactus. 2005. Fichas: Mammillaria. [www.planetacactus.com /fichas_cactus/mammillaria/mammillaria.html](http://www.planetacactus.com/fichas_cactus/mammillaria/mammillaria.html). (09 Agosto 2008).
- Polina, M. F. J. 1989. Efecto del acondicionamiento osmótico y las giberelinas sobre semillas de chile serrano (*Capsicum annum* L.) cv. Tampiqueño 74. Tesis UANL. México.
- Roberts, A. and D. Matthews. 1995. The Preparation *in vitro* of Chrysanthemum for Transplantation to Soil. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture. 40: pp 191-193.
- Rodrigo J. M, F. J. Rosselló, P. A. Marinangeli y Curvetto N. R. 2006. Germinación *in vitro* de *Rodophiala bifida*. Departamento de Agronomía-Universidad Nacional de Sur. CERZOS (CONICET-UNSur) http://209.85.173.132/search?q=cache:XTLLBfY1OVEJ:www.maa.gba.gov.ar/agricultura_ganaderia/floricultura/MACRO%2520MICRO%2520PROPAG/75%2520Germinacion_in_vitro_Rodophiala_bifida_FINAL.doc+Germinaci%C3%B3n+in+vitro+de+Rodophiala+b%C3%ADfida&hl=es&clink&cd=1&gl=mx (10 Agosto 2008).
- Rodríguez L. y Apezteguía R. (1985). Cactus y otras suculentas en Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México.
- Sagawa, Y. and J. Kunisaki, T. 1990. Micropropagation of Floriculture Crops. Citado por Trinidad, (2005).
- Salisbury, B. F. y Ross. 1994. Fisiología vegetal. Editorial Iberoamérica S. A de C. V. México, D. F. 759 p.
- Sánchez, B. N. A. 2004. Germinación *in vitro* de cuatro especies de cactáceas *Astrophytum myriostigma*, *Epithelantha micromeris*, *Ferocactus stainesii* var. *pringlei*, *Normanbokea valdeziana*. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. 46 p.
- Sánchez, S. O. 1987. La flora del Valle de México. Cuarta Edición. Editorial Herrero, S. A. México.

- Sandoval, M.P., J. González, R. Ramírez. 2005, Cultivo *in vitro* de tres especies de cactáceas con diversas concentraciones de dos reguladores de crecimiento. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad de Guanajuato. Irapuato, Gto. México. [www.cio.mx/3_enc_mujer/files/extensos /Sesion%202/S2-BYQ17.doc](http://www.cio.mx/3_enc_mujer/files/extensos/Sesion%202/S2-BYQ17.doc) (07 Agosto 2008).
- SAS Institute. 1988. SAS/ETS User's Guide - Version 6 Edition. SAS Institute Inc., Box 8000, Cary, N. C. 27512
- 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.
- Severin, C., Salinas A., Gattusso S., Gattusso M., Busilacchi H., Gibileo G. y Agurre A. 2004. Número VI. Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* L. cultivadas *in vitro*. Secretaría de Investigaciones - Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Rosario. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - ISSN N° 1515-9116. [www.fcagr.unr.edu.ar/ Investigacion/revista/rev6/5.htm](http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev6/5.htm) - 29k. (07 Octubre 2008).
- Soberón J. R., E. N. Quiroga, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone. 2005. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. [www.biologia.edu.ar/plantas /reguladore_vegetales_2005/giberelinas. htm](http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladore_vegetales_2005/giberelinas.htm). (15 Septiembre 2008).
- Sosa, R. F. M. 2004. Propagación *in vitro* de la *Heliconia standleyi* Macbride. Tesis de Maestría. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Cienfuegos – Cuba. <http://rutas.ucf.edu.cu/Tesis %20Maestria /tesis%20Flora%20M%20Sosa.pdf>
- Starling, R. J. 1985. *In vitro* Propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cact. and Succ. J. (57): 114-115.
- Tierramérica. 2002. Cactus, Medio Ambiente y Desarrollo. Revista Digital. www.tierramerica.net/2002/0526/conectate.shtml. (01 Octubre 2008).
- Trinidad, G. R. 2005. Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. y *Turbincarpus knuthianus* Boed. y Aclimatación de estas especies y *T. ophoroides* Werd. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. 84 p.
- UPV. 2003. Universidad Plitecnica de Valencia. Parte III. Tema 14: Fitorreguladores. www.etsmre.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_14.htm. (01 Octubre 2008).

- Velazques T. N. 2004. Efecto de la escarificación y aplicación de ácido giberélico en la respuesta germinativa de *Astrophytum miriostigma*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. 86 p.
- Vidalic, S. 1992. Tissue cultura applied to ornamental species. Rome pp 134-143.
- Vilchis, C. Y. 2005. Escarificación de semillas de *Echinomastus mariposensis* con ácido sulfúrico y AlgaEnzim plvo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. 50 p.
- Villalobos, A. V. 1982. Tissue cultura applied to ornamental species in: Micropropagación of selected root crop, ornamental species. Rome. pp 155-164.
- Villalobos, V. M. y T. A. Thorpe. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultado. En: Roca, M.; Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT. pp 127-141.
- Villarreal, Q. J. Á.. 1993. Introducción a la Botánica Forestal. Editorial Trillas. México D. F. 153 p.
- Villavicencio G., E. E.; A. P. Cano; H. I. L. Almeida; M. A. G. Arellano y A. S. Juárez. 2006a. Producción comercial del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto para Productores Núm. 12 Coahuila, México. 8 p.
- Villavicencio Gtz., E. E., A. Villegas M., Ma. C. López P. 2000. Germinación y multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. (Cactácea amenazada de extinción).XVIII Congreso Nal. de Fitogenética. Irapuato Gto. México. 83p.
- Villavicencio, Gtz. E. E., J. J. López-González, O. U. Martínez B., y A. Cano Pineda. 2006b. Micropropagación de cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción del desierto Chihuahuense en: Recursos Genéticos Ornamentales de México. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA), Universidad Autónoma del Estado de México. ISBN:968-835-971-8. pp 44-56.
- Villavicencio, Gtz. E. E., A. Villegas M., C. A. Berlanga R. 2005. Micropropagación de *Asrophytum myriostigma* Lem. Cactácea ornamental (Parte 1). Asociación Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal A. C (ANABAF). ISBN: 968-02-0202-X. México D. F., p. 178-189.
- Wang, P. J. and Charles. 1991. Clonal multiplication of *Cryptomeria japonica* D. Don *in vitro*. In: Studies and Essays in Commemoration of the Golden Jubilee of Academia Sinica, Taipei, Taiwan: pp 559-566.
- Zimmerman, J. L. y Currier, T. 1991. Somatic embryogenesis: A model for early development in Higher plants. The plant cell 5. pp 530-560.

7. ANEXOS

Cuadro 5. Análisis de varianza para la velocidad de germinación de la especie *M. backebergiana*.

| Tiempo | Cuadrado medio | Media |
|--------|----------------|-------|
| F1 | 0.00 | 0.00 |
| F2 | 2403.03 | 61.00 |
| F3 | 2233.33 | 67.00 |
| F4 | 1788.88 | 77.00 |
| F5 | 1216.16 | 86.00 |
| F6 | 1142.42 | 87.00 |
| F7 | 1357.57 | 84.00 |

Cuadro 6. Análisis de varianza para la velocidad de germinación de la especie *M. pringlei*.

| Tiempo | Cuadrado medio | Media |
|--------|----------------|-------|
| F1 | 0.00 | 0.00 |
| F2 | 1142.42 | 87.00 |
| F3 | 909.09 | 90.00 |
| F4 | 827.27 | 91.00 |
| F5 | 743.43 | 92.00 |
| F6 | 743.43 | 92.00 |
| F7 | 743.43 | 92.00 |

Cuadro 7. Análisis de varianza para la velocidad de germinación de la especie *T. aolonsoi*.

| Tiempo | Cuadrado medio | Media |
|--------|----------------|-------|
| F1 | 0.00 | 0.00 |
| F2 | 498.90 | 5.20 |
| F3 | 592.10 | 6.25 |
| F4 | 1025.21 | 11.45 |
| F5 | 1025.21 | 11.45 |
| F6 | 1025.21 | 11.45 |

Cuadro 8. Análisis de varianza para la velocidad de germinación de la especie *T. polaskii*.

| Tiempo | Cuadrado medio | Media |
|--------|----------------|-------|
| F1 | 0 | 0 |
| F2 | 519.58 | 94.56 |
| F3 | 215.00 | 97.82 |
| F4 | 215.00 | 97.82 |
| F5 | 215.00 | 97.82 |
| F6 | 215.00 | 97.82 |
| F7 | 215.00 | 97.82 |

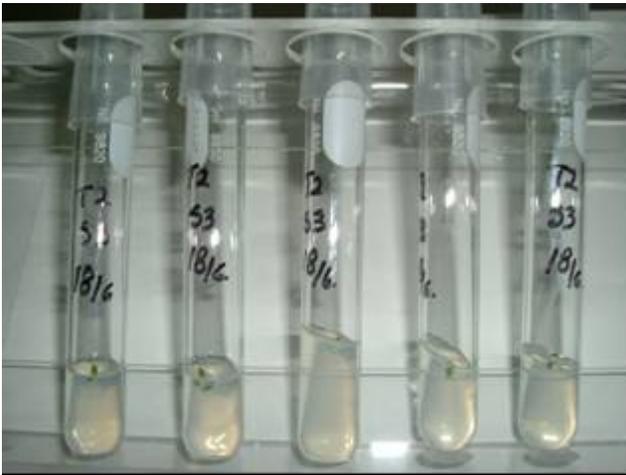


Imagen 1. Esquema en el que se montó el experimento para las cuatro especies de cactáceas.



Imagen 2. Explantes de la especie *M. pringlei*, se observa la calidad del explante.



Imagen 3. Medición de plántulas al finalizar el experimento, con la ayuda de papel milimétrico.