UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Micropropagación de *Epithelantha micromeris (Engelmann)* para la Generación de Brotes.

Por:

MARÍA GUADALUPE FLORES PÉREZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila Septiembre 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTANICA

Micropropagación de *Epithelantha micromeris (Engelmann)* para la Generación de Brotes.

Por:

MARÍA GUADALUPE FLORES PÉREZ

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial para Obtener el Titulo de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobado por:

Leticia Escobedo B.

M.C. Leticia Escobedo Bocardo

Asesor principal

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación División de Agronomía

Saltillo, Coahuila. Septiembre 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTANICA

Micropropagación de *Epithelantha micromeris (Engelmann)* para la Generación de Brotes.

Por:

MARÍA GUADALUPE FLORES PÉREZ

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como

Requisito Parcial para Obtener el Titulo de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobado por:

M.C. Leticia Escobedo Bocardo

Asesor principal

Dr. Ricardo Requejo López

Sinodal

MC. María Alejandra Torres Tapia

Sinodal

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila. Septiembre 2011.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, "**Mi Alma Terra Mater**" por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de formarme en una de las mejores áreas de estudio que es la Agronomía, por permitirme realizar mi mayor meta, mi formación Profesional.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, gracias por su apoyo y confianza que depositó en mí al haberme brindado la oportunidad de haber realizado dicha investigación.

Al Dr. Ricardo Requejo López, por su tiempo y consejos para la culminación de dicho trabajo.

A la Biol. Ana María Ochoa Rivera por su apoyo y dedicación brindada durante la realización de la investigación en el laboratorio.

A la MC. María Alejandra Torres Tapia por apoyo y tiempo brindado incondicionalmente.

Al Dr. Manuel de la Rosa Ibarra, por sus sabios consejos brindados durante toda la carrera.

DEDICATORIA

A DIOS.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A MIS PADRES

María Irene. Gracias por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

José de Jesús. Gracias por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

Hermanos: Santa, Hilda, Oscar, Gaudencio, Jaime y Trinidad. Por su gran apoyo incondicional que me brindaron durante estos cinco años de mi vida, al igual que su amistad y sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

Abuelos: Petra y Trinidad**:** por sus sabios consejos y palabras de aliento de seguir adelante.

De manera muy especial a mi ***esposo Raúl y mi hijo Raúl Didier***: Gracias por todo el apoyo, amor y consejos que me has brindado para llegar al final de esta etapa tan importante de mi vida, le doy gracias a dios por haber dado la dicha de ser madre y tenerte entre mis brazos desde ese momento supe tenía que esforzarme cada día más por ti, tus sonrisas son las que me han dado fuerza para seguir adelante no me queda más que decir gracias a los dos por ser parte de mi vida los AMO.

A la Familia Gómez González: por la compresión y apoyo total que incondicionalmente me han brindado, por las palabras de aliento que me impulsaron a alcanzar esta meta, por aumentar mi fe en la esperanza en que siempre habrá tiempos mejores y por todo su cariño, para ustedes mi eterno agradecimiento.

A mis amigos: Ariana, Rosalba, Mary Cruz, Ema y Edgar a quienes admiro por su capacidad de luchar por lo que quieren, por su carácter alegre, por su franqueza y sinceridad. Hoy quiero agradecerles el que me hayan brindado su mano amiga

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS ix

ÍNDICE DE FIGURAS x

I. INTRODUCCIÓN 11

1.1 Objetivos 13

1.1.1. Objetivo General 13

1.1.2. Objetivos Específicos 13

1.2 Hipótesis 13

II. REVISIÓN DE LITERATURA 14

2.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica de *Epithelantha micromeris* 14

2.2. Descripción taxonómica 14

2.3 Cultivo de Tejidos Vegetales 17

2.4 Micropropagación 17

2.4.1 Fase 0; Preparación de la planta madre 17

2.4.2 Fase 1; Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia 18

2.4.3 Fase 2; Multiplicación de brotes 19

2.5 Factores que afectan el cultivo in vitro en cactus 19

2.5.1 Contaminación 20

2.5.2 Oxidación fenólica 20

2.5.4 Hiperhidricidad 21

2.6 Ventajas y Desventajas de la Micropropagación 22

2.6.1 Ventajas 22

2.6.2 Desventajas 22

2.7 Fitorreguladores 23

2.8 Clasificación de los Fitorreguladores 23

2.8.1 Citoquininas 24
2.8.2 Giberelinas 25
2.8.3 Kinetina 27
2.8.4 Ancymidol 28
2.8.5 Prohexadiona de calcio 28
2. 9 Micropropagación de cactáceas 29
2.10 Micropropagación de otras especies 31
III. MATERIALES Y MÉTODOS 36
3.1 Ubicación del lugar experimental 36
3.2 Material vegetal 36
3.3 Medio nutritivo 36
3.3.1 Preparación de soluciones madre 37
3.3 Preparación del medio nutritivo 38
3.4 Tratamientos 38
3.5 Siembra 39
3.6 Condiciones ambientales 40
2.7 Diseño experimental 41
3.8 Evaluación 41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 43
4.1 Diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris.* 43
4.2 Altura de brotes de Epithelantha micromeris. 45
4.3 Número de brotes de Epithelantha micromeris. 47
V. CONCLUSIONES 55
VI. RESUMEN 56
VII. LITERATURA CITADA 57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Factores que afectan el funcionamiento de las citoquininas. 25

Cuadro 2.2. Factores que afectan el funcionamiento de las giberelinas. 26

Cuadro 3.3. Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog 1962. 37

Cuadro 3.4. Listado de tratamientos para la formación de brotes de *Epithelantha micromeris.* 39

Cuadro 3.5. Formato para el registro de diámetro, altura del brote y No. de brotes de Epithelantha micromeris. 42

Cuadro 4.6. Análisis de varianza para el diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días. 43

Cuadro 4.7. Pruebas de medias para el diámetro de los brotes *de Epithelantha micromeris* a los 30 días. 44

Cuadro 4.8. Análisis de varianza para diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* 60 días. 44

Cuadro 4.9. Análisis de varianza para la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días. 46

Cuadro 4.10. Análisis de varianza para la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días. 46

Cuadro 4.11. Análisis de varianza para el numero de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días. 48

Cuadro 4.12. Pruebas de medias para la altura de los brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días. 48

Cuadro 4.13. Análisis de varianza para el número de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días. 49

Cuadro 4.14. Pruebas de medias para el número de brotes en *Epithelantha micromeris* a los 60 días. 49

Cuadro 4.15. Matriz de correlación múltiple entre las variables evaluadas mediante un análisis de Pearson en los niveles de significancia de 0.01** y 0.05*. 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Etapas fisiológicas de Epithelantha micromeris. a). Crecimiento grupal b). Floración c). Fructificación d). Senescencia de frutos.....16

Figura 2.2: Estructura y fórmula química de la kinetina, 6-furfurilaminopurina, C 10 H 9 N O 5. (Alan, 2010).....27

Figura 2.3: Estructura y formula química del ancymidol, α-ciclopropil-4-metoxi-α-(pirimidin-5-il) alcohol bencílico, C15 H16 N2 O2. (Alan, 2010).....28

Figura 2.4: Estructura y formula química de la Prohexadiona de calcio (P-Ca), 3-oxido de calcio-5-oxo-4-propionylcyclohex-3-enecarboxylate, $C_{10} H_{10} Ca O_5$. (Alan, 2010).....29

Figura 3.5. Obtención de explantes de Epithelantha micromeris. *Engelmann.* 40

Figura3.6. Siembra de explantes de Epithelantha micromeris. Engelmann. .40

Figura 4.7: Efecto de los reguladores de crecimiento en el diámetro de brotes de Epithelantha micromeris en dos fechas de muestreo.....45

Figura 4.8: Efecto de los reguladores de crecimiento en la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* en dos fechas de muestreo. 47

Figura 4.9: Efecto de los reguladores de crecimiento en la generación de brotes de *Epithelantha micromeris*, en las dos fechas de muestreo. 50

Figura 4.10: Efecto de los reguladores de crecimiento en la generación de brotes de Epithelantha micromeris, A) Kinetina, B) Kinetina más Ancymidol, C) Kinetina más Prohexadiona de calcio. 51

INTRODUCCIÓN

México cuenta con un gran número de especies de cactáceas, que han sido utilizadas desde tiempos antiguos con fines muy variados (Bravo-Hollis, 1978). La familia de las cactáceas está representada en México por 67 géneros y cerca de 925 especies y es un grupo conspicuo de la floración nativa de nuestro país; del total de géneros 15 están estrictamente restringidos a sus limitantes territoriales y 20 más son casi endémicos, así mismo en esta familia se encuentran plantas cuyo valor evolutivo, ecológico, histórico-cultural y económico es incuestionable (Bravo, 1994). Los frutos, néctares y polen son básicos para la permanencia de otras especies que son parte fundamental de muy complejos ensambles biológicos; algunas especies son altamente ornamentales por lo que son codiciadas por coleccionistas estadounidenses, europeos y asiáticos, lo que aunado a la destrucción de sus hábitats las han llevado al borde de la extinción. (Villavicencio, 2002). Existen alrededor de 35 especies que tienen potencial como cultivo para la obtención de frutos, vegetales o forraje (Nerd y Mizrahi, 1997).

La recolección, perturbación o pérdida de su hábitat y el lento crecimiento de los miembros de la familia Cactáceae han hecho vulnerables a la extinción a un gran número de estos organismos (Bravo-Hollis, 1978). Se han desarrollado desde hace varias décadas estrategias para la propagación de especies de cactáceas en peligro de extinción, endémicas o raras, como la micropropagación *in vitro* por cultivo de tejidos (Starling ,1983). La técnica consiste en proporcionar a los tejidos sales y vitaminas necesarias para su desarrollo, así como hormonas para provocar la diferenciación parcial o total de la planta mediante diversas combinaciones de auxinas y citocininas para la formación de callos, brotes, raíces, etc. (Echenique *et al*., 2004).

La desaparición de las cactáceas constituye uno de los problemas originados por el hombre a la naturaleza debido a la falta de conciencia tanto de los gobiernos como de los individuos por explotación irracional, trastornos en sus nichos ecológicos y contaminación del medio ambiente, que aunado a un lento crecimiento agrava la baja capacidad de recuperación en las poblaciones naturales de la mayoría de las especies que lo forman. La micropropagación *in vito* es una alternativa que podría solucionar en parte dicho problema, pues consiste básicamente en obtener un número muy alto de nuevas plantas partiendo de fragmentos mínimos de tejidos vegetales, cultivados en medios artificiales, bajo condiciones controladas. Por lo anterior, el presente estudio fue evaluar el efecto de tres reguladores de crecimiento en la generación de brotes *in vitro* de la especie *Epithelantha micromeris*, planteando los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para la generación de brotes *in vitro* de *Epithelantha micromeris.*

1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la kinetina para la generación de brotes *in vitro* de *Epithelantha micromeris.*
- Evaluar el efecto de la kinetina más ancymidol en la generación de brotes *in vitro* de *Epithelantha micromeris.*
- Evaluar el efecto de la kinetina más prohexadiona de calcio para la generación de brotes *in vitro* de *Epithelantha micromeris.*

1.2 Hipótesis

- Al menos una de las de las combinaciones y/o concentraciones de reguladores de crecimiento tendrán efecto en la generación de brotes de *Epithelantha micromeris.*

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica de *Epithelantha micromeris*

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

ORDEN Cactales

FAMILIA Cactáceae

SUBFAMILIA Cactoideae

TRIBU Cacteae

SUBTRIBU Thelocactinae

GENERO *Epithelantha*

ESPECIE *micromeris*

2.2. Descripción taxonómica

Tallo

Globoso, subgloboso o cortamente ovoide, de 4-5 y hasta 8 cm de alto por 2.5 a 6 cm de diámetro cubierto por espinas, presenta un ápice hundido y recubierto por un mechón de espinas erguidas (Bravo, 1991).

Raíz procede de la radícula del embrión, pueden ser adventicias, biológicamente la raíz principal es la que fijará la planta en el suelo y las secundarias intervendrán principalmente en el proceso de absorción. (Paredes et al., 2000). *Epithelantha micromeris* presenta una raíz principal que se ramifica inmediatamente (fasciculada), es decir con crecimiento indeterminado, además se encuentra en lugares pedregosos y de manera superficial contando con numerosos pelos radicales (Santiago, 2001)

Tubérculos

Dispuestos en 21 y 34 series de espiraladas, cónico-cilíndricos, de 1.5 mm de longitud y 3 mm de altura, ocultos por las espinas (Bravo, 1991).

Areolas

Pequeñas, alargadas, dimorfas; la florífera adyacente a la espinifera, situadas en el ápice de los tubérculos y cuando están en edad joven con lana blanquecina (Bravo, 1991). Las areolas forman también hojas reducidas, flores, nuevos tallos y además espinas, cerdas, pelos y a veces raíces adventicias (Paredes et al., 2000).

Espinas

De 13 a 28 y hasta 40 dispuestas en 1, 2 o 3 series según la edad de la planta, generalmente todas son radiales de 5 a 8 mm de longitud de color blanca o rosa con tintes amarillentos o sora castaño rojizo, pectinadas, horizontalmente radiadas, ascendentes en las areolas apicales, las externas son las más largas y erectas y se agrupan formando un pincel. Es frecuente que con el tiempo las espinas se rompan más o menos a la mitad.

Tubérculos

Brotan de las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes cercanos al ápice del tallo, muy pequeñas, infundibuliformes abriéndose poco, de 3 a 5 mm de longitud y de 3 a 6 mm de diámetro, emergen de entre la lana y las espinas del ápice del tallo; pericarpelo algo claviforme, desprovisto de escamas, segmentos exteriores del perianto de 3 a 5 hiperbólicos, de 1 a 2 mm de longitud a 2 mm de altura, con ápice redondeado y el margen irregularmente dentado, de color rosa pálido con la línea media más obscura, segmentos interiores del perianto cerca de 5 mm, casi obdeltoides, de 1 a 1.5 mm de longitud, de color rosa pálido, estambres de 10 a 15, de color amarillo claro estilo amarillento, lóbulos del estigma 3 o 4 amarillento.

Fruto

Claviforme, generalmente largo y angosto de 3 a 12 mm de longitud y de 1.5 a 5 mm de dímetro, sin escamas rojas y sin conservar adheridos los restos secos del perianto.

Semilla

Angostamente ovoide de 1.5 a 2 mm de longitud a 1 mm de ancho y 0.8 mm de espesor, hilo largo oblicuo amplio y hundido, el micrópilo en la porción aguda de la semilla, testa finalmente reticulada, perisperma escaso, embrión corto con los cotiledones apenas distinguibles (Bravo, 1991). Las etapas de desarrollo de *Epithelantha micromeris* se muestran en la Figura 2.1.

Distribución

En México se encuentra en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Zacatecas y en Estados Unidos al Norte de Nuevo México y Texas.

Estado de conservación

Según los criterios de la NOM-059-ECOL (2001), está considerada dentro de la categoría rara en el Listado en CITES Apéndice II.



Figura 2.1. Etapas fisiológicas de *Epithelantha micromeris*. a). Crecimiento grupal b). Floración c). Fructificación d). Senescencia de frutos.

2.3 Cultivo de Tejidos Vegetales

La técnica de cultivo de tejidos consiste en cultivar órganos y células vegetales en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen. Permite generar una gran cantidad de individuos con el mismo genotipo del individuo parental, más vigorosos y en un período de tiempo muy corto lo que resulta ideal para alcanzar una producción de plántulas de alta calidad (Street, 1977; Harmatmann y Kester, 1998; Boutherin y Bron, 2002; Escobedo, 2000).

El cultivo *in vitro* es posible gracias a una propiedad de las células vegetales denominada totipotencia celular según la cual toda célula viviente que posea un núcleo es capaz de generar fielmente la planta entera de la que procede independientemente de su especialización en ese momento. Cada célula posee por lo tanto la totalidad del patrimonio genético de la planta (Boutherin y Bron, 2002).

2.4 Micropropagación

Consiste en reproducir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en recipientes en que se pueden controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann y Kester, 1999).

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

2.4.1 Fase 0; Preparación de la planta madre

- Elección de plantas típicas, vigorosas, sanas.

- Puede ser necesaria la detección y eliminación de virus.

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

2.4.2 Fase 1; Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

- Esterilización en superficie y transferencia de los explantes al cultivo

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

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

- Conocer el material vegetal con que se trabaja.
- Realizar una adecuada preparación de la planta madre.
- Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos, en los casos en que utilicen plántulas crecidas in vitro como plantas madre es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación.
- Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados. La esterilización, en la mayoría de los casos, se hace utilizando calor.
- Cultivar los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril, localizada en un ambiente limpio y no puesto a corrientes de aire. La

masa de trabajo y las paredes de la cámara deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%, de la misma manera, deben desinfectarse exteriormente todos los recipientes que ingresen en el área de aire estéril (Echennique *et al.*, 2004).

2.4.3 Fase 2; Multiplicación de brotes

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

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

La etapa de multiplicación comprende dos periodos: 1) la fase de inducción, que implica el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente más auxinas que citocininas) para favorecer la desdiferenciación y 2) la fase de multiplicación, que requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación (en este caso el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas). (Echenique et al., 2004).

2.5 Factores que afectan el cultivo in vitro en cactus

La micropropagación presenta en general problemas durante el establecimiento *in vitro* de los cultivos y en su posterior propagación clonal, disminuyendo considerablemente

en algunos casos las posibilidades de éxito de los ensayos, entre estos problemas se mencionan: la contaminación, el pardeamiento y la hiperhidricidad de explantes.

En las cactáceas los mayores problemas se han presentado al utilizar cactus cultivados *ex vitro* como plantas madres, debido a que al ser cultivadas in vitro se presentan elevados niveles de contaminación. La hiperhidricidad también ha demostrado ser un problema importante, fundamentalmente debido a su metabolismo CAM y a la naturaleza suculenta de sus tejidos (Deberg y Read, 1991; Oliveira *et al*., 1995; Pérez *et al*., 2002).

2.5.1 Contaminación

Existen dos posibles vías de contaminación en el cultivo *In vitro*; por microorganismos endógenos y exógenos presentes en los explantes o por un mal manejo en los procesos en el laboratorio. Durante su crecimiento las plantas están expuestas a microorganismos que pueden contaminarlas a través de aberturas naturales, heridas, vectores o plantas hospederas, etc., de esa forma las plantas desarrollan una flora endofítica consistente en organismos procarióticos como bacterias y hongos (Cassells, 1991).

En la propagación *in vitro* de cactus los explantes provenientes de plantas silvestres o desarrolladas en invernaderos presentan serios problemas de contaminación debido a la presencia de patógenos que no pueden ser controlados fácilmente con una desinfección superficial, además la estructura morfológica de muchas de estas plantas dificulta su desinfección superficial y de esta manera el control de los patógenos exógenos que puedan estar presentes (Johnson y Emino, 1979).

2.5.2 Oxidación fenólica

Este fenómeno conocido también como pardeamiento ocurre cuando el explante, antes de entrar en contacto con el medio de cultivo es sometido a situaciones de estrés, por

ejemplo daño mecánico. EL oscurecimiento o pardeamiento se produce por la liberación de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos, lo que inhibe el crecimiento. El daño se manifiesta visualmente por la producción de exudados de color marrón o negro. Este fenómeno ocurre con mayor severidad en plantas con altos niveles de taninos y otros hidroxifenoles (Pierik, 1990).

En general el pardeamiento no es un problema frecuente en el cultivo *in vitro* de cactus, y puede ser controlado adicionando algunos compuestos como carbón activado, polivinilpirrolidona (PVD) y agua o leche de coco. (Minocha y Mehra, 1974).

2.5.4 Hiperhidricidad

La hiperhidricidad es un desorden fisiológico que produce tejidos translúcidos, hiperhidratados y suculentos en algunas especies propagadas *in vitro* (Ziv, 1991). Es un serio problema para el cultivo *in vitro* de cactus (Giusti *et al*. 2002), aunque no reduce el número de brotes producidos, puede impedir su enraizamiento y sobrevivencia *ex vitro* (Pérez *et al.*, 2002). Este desorden fisiológico se debe a condiciones propias del cultivo *in vitro*, por ejemplo alta humedad, exceso de carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores de crecimiento vegetales y baja intensidad luminosa (ZIv, 1991).

Algunos autores señalan que este fenómeno puede ser controlado aplicando las siguientes medidas: aumentan la concentración del gelificante y/o la sacarosa en el medio de cultivo o reemplazando el uso del “gelrite” por agar ya que mejoran el intercambio gaseoso en los frascos de cultivo, regulan los niveles de citoquinina, aumenta la intensidad luminosa, cambia el medio de cultivo o reduce la concentración de éste; Mencionan que la humedad relativa y el potencial hídrico en los frascos de cultivo son factores importantes para causar hiperhidricidad. (Seemann, 1993).

2.6 Ventajas y Desventajas de la Micropropagación

2.6.1 Ventajas

- Miniaturización. Las plantas cultivadas in vitro tienen un tamaño reducido, por lo que pueden cultivarse centenares de plantas por metro cuadrado de estantería, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de viveros, de costos en el mantenimiento y de labores.
- Cultivo en condiciones asépticas, lo que y con garantiza la calidad de las plantas durante el cultivo in vitro.
- Producción todo el año, al ser controladas las condiciones ambientales, aunque es necesario ajustar el trasplante en la época adecuada.
- Intercambio a través de fronteras, facilitado por la minimización y por el control de las condiciones sanitarias, Clayton *et al.* (1990).

2.6.2 Desventajas

- Personal capacitado
- Inversión inicial muy alta
- Crecimiento lento o “cero”, debido posiblemente al medio nutritivo inadecuado o a un estado fisiológico de la planta de origen desfavorable.
- Contaminación del cultivo, bien por una desinfección superficial insuficiente, bien por la existencia de bacterias internas o latentes, en los casos en que en las plantas origen no pueden atenuarse con el uso de mezclas de antibióticos, Clayton *et al.* (1990).

2.7 Fitorreguladores

Los reguladores de crecimiento de las plantas o Fitorreguladores son compuestos orgánicos de origen natural o sintético que en pequeñas concentraciones, aceleran, inhiben o modifican de alguna forma los procesos fisiológicos de las plantas (Coleto, 1994).

La respuesta de una planta o de una parte de ella a un fitorregulador puede ser distinta aún entre variedades de la misma especie, dependiendo de su edad, condiciones ambientales, estado fisiológico y contenido hormonal (Nickell, 1979).

2.8 Clasificación de los Fitorreguladores

Una clasificación básica de los Fitorreguladores sería aquella que los divide en hormonas naturales o fitohormonas y en hormonas sintéticas y, dentro de este último grupo, se puede diferenciar a los retardadores del crecimiento vegetal del resto, por su extraordinaria importancia y usos (Arteca, 1996).

En la clasificación de los reguladores de crecimiento encontramos al grupo de los promotores que son: auxinas, citoquininas, giberelinas, en el grupo de los inhibidores/ retardantes encontramos: ácido abscísico, ancymidol, brutalina, etileno, carbaril, ácido jasmónico cloruro de clormecuat, cloruro de mepicuat, daminozida, paclobutrazol y prohexadiona cálcica (Weaver, 1976).

2.8.1 Citoquininas

Es un grupo de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de adeninas, y las más frecuentes son la kinetina y benciladenina (sintéticas) y la zeatina (natural).

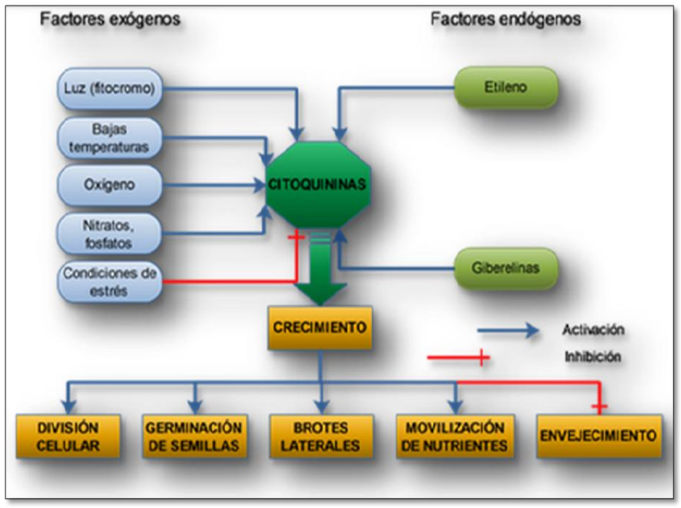
Las citoquininas o citocininas se encargan de regular los procesos de división celular. Dentro de la planta se sintetizan en el meristemo apical de las raíces, aunque también se encuentran en abundancia en frutos y semillas inmaduras.
Sus principales efectos fisiológicos son:

1. Estimulan la mitosis celular, en particular cuando actúan en conjunción con las auxinas.
2. Promueven la formación y crecimiento de brotes laterales.
3. Estimulan la germinación de las semillas y el desarrollo de brotes.
4. Activan la movilización de nutrientes hacia las hojas, y en ellas la maduración de los cloroplastos.
5. Estimulan el crecimiento celular en hojas y cotiledones.
6. Retrasan la senescencia directamente y modo indirecto estimulan la síntesis de óxido nítrico.

Las citoquininas son producidas como respuesta a la luz roja (por lo que parece estar implicado el fitocromo) y son también estimuladas por el aumento de la concentración de oxígeno en el medio o por la presencia en el suelo de nitratos y sulfatos. Las bajas temperaturas también son importantes activadores de las citoquininas, lo cual tiene un significado biológico interesante: la activación de las citoquininas en las semillas y por tanto el inicio de la germinación, se produce después de que haya transcurrido un periodo frío el invierno como se muestra en la Cuadro 2.1; Por el contrario, las condiciones de estrés inhiben la acción de las citoquininas, lo que también es coherente desde el punto de vista de las necesidades de adaptación de la planta, ya que impide que las semillas germinen cuando las condiciones no son las adecuadas. En cuanto a

los factores endógenos, tanto el etileno como las giberelinas activan la actividad de las citoquininas (Alda, 2011).

Cuadro 2.1. Factores que afectan el funcionamiento de las citoquininas.



2.8.2 Giberelinas

Las giberelinas se encuentran en cantidades particularmente abundantes en órganos jóvenes de las plantas, especialmente en los puntos de crecimiento del vegetal (zonas apicales) y en las hojas jóvenes en proceso de formación.

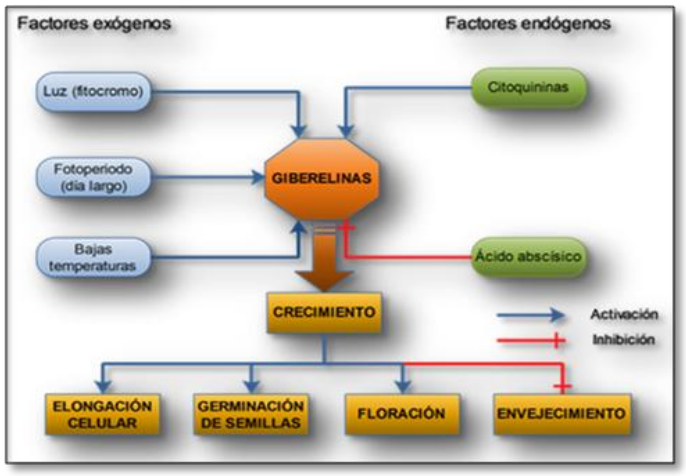
Las giberelinas son también hormonas que estimulan el desarrollo de la planta, aunque de un modo diferente a como lo hacen las auxinas, su principal efecto es estimular el desarrollo del tallo, pero por debajo del meristemo apical y también estimulan la germinación de las semillas y la movilización de nutrientes en ellas. Tienen, además, algunos efectos menores como inducir la floración en condiciones no demasiado apropiadas, inducir la formación de frutos sin fecundación o detener el envejecimiento de frutos y hojas en algunas plantas.

Las giberelinas se sintetizan, en general en las partes en desarrollo y en particular son especialmente abundantes en las estructuras reproductivas, razón por la cual su origen se encuentra en ápices de tallos y raíces, hojas jóvenes, flores y semillas inmaduras y embriones en germinación.

La luz es el factor ambiental que más influye sobre las giberelinas. Por una parte, la luz roja aumenta la concentración de giberelinas, lo que parece indicar que en este mecanismo tiene influencia el fitocromo, otro de los elementos importantes en la regulación de la fisiología vegetal. El fotoperiodo, los días largos y el frío incrementan la síntesis de giberelinas, como podemos observar en el Cudro 2.2.

La actividad de las giberelinas también es influida por otras hormonas vegetales; las citoquininas la incrementa mientras que el ácido abscísico la reduce (Alda, 2011).

Cuadro 2.2. Factores que afectan el funcionamiento de las giberelinas.



Redemacher. (2000) menciona que existen cuatro diferentes tipos de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas. Son compuestos sintéticos, utilizados para reducir el crecimiento de una manera controlada, sin cambiar los patrones de desarrollo y sin utilizar compuestos fitotóxicos estos son: a) compuestos tipo onium, tales como cloruro

de clormequat, cloruro de mepiquat, clorfonuim y AMO-1618. Bloquean las cíclasas copalil-difosfato sintasa y ent-kaureno sintasa, involucradas en las etapas tempranas del metabolismo de las giberelinas; b) compuesto con un heterociclo que contiene nitrógeno, p.e. ancimidol, flurprimidol, tetciclasis, paclobutrazol, uniconazol-P e inabenfido. Bloquean a las monooxigenasas dependientes del citocromo P450, así inhiben la oxidación del ent-kaureno en el ácido ent-kaurenoico; c) estructura simulada de ácido 2-oxogluutárico, es el co-substrato de dihidrogenasas que catalizan las etapas tardias de formación de giberelina, acilciclohexanediones, p.e. prohexadiona de calcio y trinexapac-etil y daminozida. Bloquea particularmente la 3(3-hidroxilación; d) 16,17-dihidro-AG_5 y estructuras relacionadas que probablemente simulan al sustrato precursor de giberelinas de la misma dioxigenasa.

2.8.3 Kinetina

La kinetina que es uno de los reguladores de crecimiento más utilizado dentro del grupo de las citocininas, fue descubierto en 1954 a partir de ADN, como una sustancia que promovía la división celular en los tejidos cultivados "in vitro", al eliminarlo del medio de cultivo, las células producían la cariocinesis pero no la citocinesis, en la Figura 2.2 se muestra la estructura y formula química de la Kinetina.

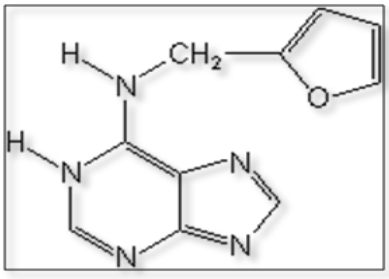


Figura 2.2: Estructura y fórmula química de la kinetina, 6-furfurilaminopurina, C 10 H 9 N O 5. (Alan, 2010).

2.8.4 Ancymidol

El Ancymidol (aciclopropil-(p-metoxifenil)-5-pirimidinmetanol), cuya estructura química se presenta en la Figura 2.3. Actúa en ciertas especies bajo condiciones específicas, como inhibidores de enzimas monooxigenasas que catalizan un paso oxidativo en la biosíntesis de las giberelinas. La estructura característica de esto inhibidor consiste en un par de electrones en el nitrógeno con hibridación sp^2 del anillo heterocíclico, localizados en la periferia de la molécula.

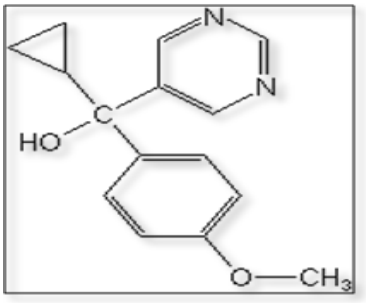


Figura 2.3: Estructura y formula química del ancymidol, α-ciclopropil-4-metoxi-α-(pirimidin-5-il) alcohol bencílico, C15 H16 N2 O2. (Alan, 2010).

2.8.5 Prohexadiona de calcio

La Prohexadiona de calcio (P-Ca) representa una interesante herramienta complementaria para las prácticas culturales y el material genético usado para conseguir y mantener un equilibrio vegetativo-reproductivo en cultivos hortícolas y ornamentales (Costa *et al*. 2004). Se asume que evita la elongación celular, teniendo como efecto una reducción de la estructura morfológica de las plantas (Grossmann *et al.* 1987) siendo antagonista de las giberelinas y auxinas que son las hormonas vegetales primarias responsables del crecimiento vegetativo (Rademacher, 2000), en la Figura 2.4. Se muestra la estructura y formula quimica de la Prohexasiona de calcio.

La inhibición de la síntesis de giberelinas mediante la Prohexadiona de calcio parece ser el resultado de la competencia por el sitio activo de las enzimas hidrolasas, involucradas en la etapa final de la síntesis de giberelinas, entre la Prohexadiona de calcio y el 2-oxoglutarato, co-sustrato natural de dichas enzimas, de hecho la estructura de la Prohexadiona de calcio es muy similar a la del ácido 2-oxoglutarato (Griggs et al., 1991).

En la biosíntesis de las giberelinas, la Prohexadiona de calcio, actuaría de forma primaria en la inhibición de la hidroxilación 3ß, como consecuencia de esto se reducen los niveles de la GA1 (activa), lo que conlleva a la acumulación de su precursor GA20 (inactiva) (Evans *et al*, 1999), esto se traduce en la planta en una reducción de la longitud de los brotes. Byers y Yoder (1999) afirman que la reducción en el crecimiento de los brotes, dada por la aplicación de Prohexadiona de calcio se debe a un acortamiento de los entrenudos. Se degrada en plantas superiores con unas pocas semanas de vida media, en el suelo, la Prohexadiona de calcio se descompone principalmente en dióxido de carbono, con una vida media menor a una semana (Evans *et al*, 1999).

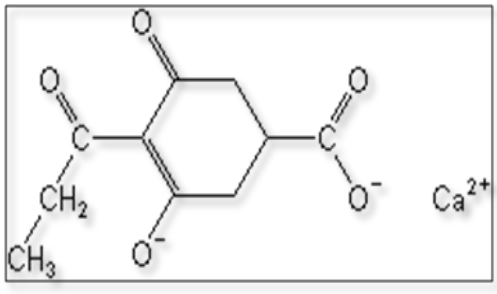


Figura 2.4: Estructura y formula química de la Prohexadiona de calcio (P-Ca), 3-oxido de calcio-5-oxo-4-propionylcyclohex-3-enecarboxylate, $C_{10} H_{10} Ca O_{5.}$ (Alan, 2010).

2. 9 Micropropagación de cactáceas

La generación de brotes de *Cephalocereus senilis* se llevó a cabo en medio MS suplementado con ácido naftalenacético (ANA) solo y en combinación con 6-

benzyladenina (BA) o kinetina (Kin) en concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 mgL $^{-1}$. Después de 40 días se logró la mejor respuesta con ANA al 3.0 mgL $^{-1}$ y kinetina 3.0 mgL $^{-1}$, con 11 brotes en promedio, de 9.0cm de altura y 0.6cm de diámetro (Bravo, 1987).

Vanegas (1991) utilizó para la micropropagación de *Neolloydia lophophoriodes* explantes de tallo en un medio MS adicionado con 20 mgL-^{1} de sacarosa, BA y Kinetina a diferentes concentraciones (0.0, 0.2, 0.4 0.8, 1.6 y 3.2 mgL-^{1}) mostrando mejores resultados en la concentración de 3.2 mgL-^{1} de BA con 73 % de explantes con brotes, seguidos de 0.8 mg/l^{-1} de kinetina con 68% de explantes por brotes.

La propagación de brotes *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus* se llevó a cabo en un medio MS adicionado con paclobutrazol y kinetina en concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 mgL $^{-1}$; la combinación de paclobutrazol 1.0 mgL $^{-1}$ y kinetina 3.0 mgL $^{-1}$ generó 18 brotes por explantes y no se presentaron brotes sobrehidratados, sin embargo para prohexadiona de calcio 3.0 mgL $^{-1}$ y kinetina 5.0 mgL $^{-1}$ se presentó sobrehidratación de brotes (Debergh et al,. 1992).

Ojeda (1993) analizó el crecimiento in vitro de *Atrophytum capricorne* en un medio MS suplementado con 30gL $^{-1}$ de sacarosa y con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento citocianina-auxina (5.0 mgL $^{-1}$ de BAP más 0.1 mgL $^{-1}$ANA) y citocinina-citocinina (0.1 mgL $^{-1}$de kinetina más 0.2 mgL $^{-1}$de BAP), el mejor tratamiento resultó ser el de las dos citocininas con un promedio de 29.5 brotes por explante, en tanto en el otro tratamiento reportó 8.75 brotes por explante.

Ortiz y Vargas (1995) utilizaron brotes para la micropropagación de *Hylocereus elengatissimus* que cortaron trasversalmente y sembraron en un medio Murashige y Skoog con varias concentraciones de Kinetina (0.0, 0.5 y 2.0 mgL-^{1}) y de ANA (0.0, 0.5 y 2.0 mgL-^{1}). Los tratamientos con ambos reguladores, particularmente aquellos con mayor proporción de kinetina formaron plántulas completas. Los medios más

adecuados para la micropropagación de esta cactácea fueron los adicionados con 0.5 mgL^{-1} de kinetina + 0.5 de ANA y 2.0 mgL^{-1}, de kinetina + 0.5 mgL^{-1} de ANA.

Choreño *et al.,* (2002) realizaron propagación *in vitro* en *Chephalocereus senilis* a partir de aréolas sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) complementado con ácido naftalenacético (ANA) solo y en combinación con 6-benzyladenina (BA) o kinetina (Kin) en concentraciones de 0.0, 0.3, 1 y 3.0 mgL mgL^{-1}. La activación de aréolas se inició después de 21 días en 0.3 ANA + 3.0 mgL^{-1} de kinetina. Se subcultivaron a los 61 días para su multiplicación durante 40 días, posteriormente los brotes fueron transferidos a medios sin reguladores, donde espontáneamente formaron raíz a los 30 días de la incubación.

Escobedo *et al*., (2002) trabajaron con plántula de *Mammillaria luethyi* para la regeneración de brotes a partir de callo, en un medio MS, encontrándose que los tratamientos que produjeron la mayor cantidad de brotes por explante 2.16, 1.83 y 1.58 correspondieron a los tratamientos que contenían 1.3 mgL^{-1} BAP, 3 mgL^{-1} BAP y 1 mgL^{-1} Kin respectivamente, mientras que los tratamientos que contenían altas concentraciones de citocininas produjeron callo friable. El efecto de BAP y Kin solos, favoreció la expresión morfogenética para la producción de brotes. La escasa respuesta de secciones de callo a la adición de auxina. ANA (0.0, 0.1 y 1.0 mgL^{-1}, indicó que la cantidad requerida para que se conformaran los brotes la sintetizó el explante en forma endógena, por lo que no fue necesaria su presencia.

2.10 Micropropagación de otras especies

Silos *et al.* (1995) obtuvieron brotes *de M. bocasana* a partir de areolas espiníferas, sometidas a distintos tratamientos con 2,4-D y kinetina a 9 diferentes concentraciones, en todos los tratamientos reportaron la producción de callo, pero en la concentración de 2.0 mgL^{-1} de 2, 4-D más 1 mgL^{-1} de kinetina se presentó brotación a los 30 días de la

siembra, los brotes obtenidos se trasvasaron al mismo medio y generaron 7.5 botes por explante.

Ramírez *et al.,* (2000) trabajaron en manzana cv Royal Gala, utilizaron P-Ca cuando el brote nuevo en la rama alcanzó 5cm de crecimiento en la primavera, los árboles se asperjaron a concentraciones de 0, 125, 175, 250 mgL^{-1}. El efecto fue mayor a 250 mgL^{-1}, al comparar este tratamiento con el testigo, se observó una diferencia de 30 cm de crecimiento. El efecto del retardante en sus diferentes dosis, también estuvo ligado con una notable reducción en la longitud de entrenudos en donde se presentaron diferencias en cada dosis de P-Ca. Presentó el mismo efecto para el cuajado de fruto, en los árboles testigo se produjeron frutos con tendencia a mayor peso y radio. El P-Ca a cualquier dosis provocó menor contenido de grados Brix y una mayor firmeza en los frutos cosechados.

Sugar *et al.,* (2002) aplicaron Prohexadiona de Calcio en brotes de 2,5-6 cm a diferentes cultivares de peral en concentraciones de 83 a 500 ppm. Se observó disminución en el peso de la fruta y en el retorno de la floración en el año siguiente. En contra posición Costa *et al.* (2000) reportó que las aplicaciones de Prohexadiona de Calcio aumentaron el tamaño de frutos de manzano e inclusive intensificaron la floración del año siguiente a la aplicación.

Elfving *et al.,* (2003) evaluaron las aplicaciones de Prohexadiona de Calcio en cerezo dulce, para evaluarlo como inhibidor de crecimiento y promotor de la floración en huertos de cerezo en alta densidad. Los tratamientos con Prohexadiona de Calcio redujeron el largo de los brotes, pero los brotes retomaron su crecimiento al final de la temporada cuando se realizó solo una aplicación de este producto. No hubo efecto en la estimulación de la floración, lo que concuerda con lo observado en peral y manzano por Basak y Rademacher (2000); Owens y Stove (1999) y Sugar, Elving y Mielke (2002).

Medjdoud *et al*., (2004) realizaron ensayos para probar la efectividad del Prohexadiona de Calcio en manzano en control de crecimiento. Llevaron a cabo aplicaciones foliares de Prohexadiona de Calcio en dosis de 100-400 mgL^{-1} entre 12 y 30 días después de la primera flor observándose que inhibieron el crecimiento de brotes. Las concentraciones de 200 y 400 mgL^{-1} aplicados 20-30 días después de primera flor inhibieron el crecimiento entre un 27 a un 36% en comparación al testigo. Las aplicaciones con 100 mgL^{-1} de Prohexadiona de Calcio a los 30 días después de la primera flor no tuvieron efecto en la reducción del crecimiento al final de la temporada, sin embargo la misma aplicación 20 días después de primera flor inhibió el crecimiento manteniendo su efecto hasta el comienzo del próximo invierno. Los brotes reanudaron su crecimiento entre 50 a 70 días después de la primera flor, dependiendo de la dosis y la fecha de aplicación, por lo que se necesitó una segunda aplicación para mantener el efecto.

Costa *et al.* (2004) llevaron a cabo un ensayo en manzanos de 7 años de edad durante dos temporadas. Probaron aplicaciones únicas y múltiples de Prohexadiona de Calcio en dosis de 125, 175 y 250 ppm en brotes de 5 y 20 mm. Todos los tratamientos con Prohexadiona de Calcio inhibieron el crecimiento de brotes. Los brotes con mayor vigor detuvieron su crecimiento una semana después de la aplicación, en cambio los brotes con un menor vigor tardaron 15 días en detener su crecimiento después de la aplicación.

López *et al.,* (2005) evaluaron el desarrollo de cultivos embriogénicos en los genotipos AAB de *Musa*, se cultivaron brotes axilares en el medio de cultivo P5 suplementado con tidiazuron y ancymidol (0.2, 0.4 y 0.6 mgL^{-1} cada uno por separado) para lograr la brotación de yemas axilares. Los ápices de brotes obtenidos de yemas axilares posteriormente se colocaron en un medio de cultivo ZZ con diferentes concentraciones de 2,4-D para formar los callos con estructuras embriogénicas. El mejor regulador de crecimiento para la brotación de yemas axilares fue el ancymidol (0.2 mgL^{-1}). La formación de callos con estructuras embriogénicas se logró a la concentración de 1.0 mgL^{-1} de 2,4-D con 13.6% Los embriones somáticos producidos permitieron el

establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas. Se demostró que es posible el desarrollo de la embriogénesis somática en el cv. Navolean.

Daquinta *et at,.* 2005 trabajaron en el cultivo in vitro del banano FHIA-18 utilizando yemas apicales que fueron establecidas en un medio MS (Murashige & Skoog 1962) suplementado con 4.0 mgL^{-1} de BAP y Paclobutrazol a 1.0 y 2.0 mgL^{-1} en diferentes modos de cultivo (sólido, líquido estacionario e inmersión temporal). Se utilizaron 7 explantes por frasco y 10 repeticiones por tratamiento, en la inmersión temporal se realizaron tres repeticiones, los mejores resultados se obtuvieron de la combinación de BAP 4.0 mgL^{-1} y Paclobutrazol 2.0 mgL^{-1} con 8 brotes por explante.

Bermúdez *et al*., 2008 utilizaron medios de cultivos líquido en las diferentes etapas de la micropropagación favoreciendo el desarrollo de los explantes de zábila (Aloe barbadensis Mill.) y permiten un ahorro de los costos de producción al excluir los gelificantes del medio de cultivo. Sin embargo, en la etapa de multiplicación los explantes de zábila expresan un mayor crecimiento en hojas con un bajo coeficiente de multiplicación al emitir pocos brotes nuevos. En otras especies, se ha señalado que el uso de retardantes de crecimiento en los medios de cultivo logran disminuir el crecimiento en hojas y estimulan la producción de nuevos brotes en cluster; razón por la cual se evaluó el efecto del Paclobutrazol (PBZ) y Ancymidol (ANC) como retardantes del crecimiento en los medios de cultivo para la multiplicación de zábila. Se realizaron tres experimentos; un experimento factorial para estudiar el efecto de dos retardantes del crecimiento (PBZ y ANC) y el tipo de explante (individual y doble). Un segundo experimento aleatorizado para determinar la dosis de ANC (0; 1; 2,5 y 5 mgL^{-1}) y tercer experimento para evaluar el uso de sistemas de inmersión temporal (SIT) con 2,5 mgL^{-1} de ANC. Se evaluaron las variables número de brotes, formación de cluster, longitud del explante, ancho de la hoja, grosor de la hoja, biomasa fresca y biomasa seca del explante. Se evidenció que el explante doble y el uso de 2,5 mgL^{-1} de ANC en los sistemas de medios de cultivo líquido aumentaron el número de brotes en cluster.

Ramírez *et al.,* (2008) evaluaron el efecto de prohexadiona de calcio (P–Ca) en el contenido endógeno de giberelinas en ápices de tomate saladette (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile pimiento (*Capsicum annuum* L.), se aplicaron tres dosis del retardante (125, 175 y 200 mgL^{-1}) y un testigo (H_2O) ambas hortalizas en el estadio de plántula con seis hojas verdaderas. Los ápices se cosecharon los días 0, 1, 3 y 6 después de haber realizado la aplicación de los tratamientos y las muestras se liofilizaron para su análisis en laboratorio. Se realizaron análisis cuantitativo y cualitativo de giberelinas, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se encontró que los ápices de tomate saladette tratados con P–Ca mostraron un menor contenido de las giberelinas A_4 y A_7 a partir del siguiente día de haberse aplicado los tratamientos. Esta tendencia fue consistente hasta el sexto día de evaluación. Resultados similares se registraron con los ápices de chile pimiento. Los análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas, permitieron identificar en ápices tratados con P–Ca la giberelina A_{20} en tomate saladette, mientras que las giberelinas A_{20} y A_{53} estuvieron presentes en chile pimiento. En los ápices testigo de ambas hortalizas, se encontraron las giberelinas A_1, A_4 y A_7.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicado en Buenavista, Saltillo, Coahuila, sobre la carretera Saltillo Zacatecas, siendo sus coordenadas geográficas 25° 22´ Latitud Norte 101° 1´ Longitud Oeste, con una altura promedio de 1734 msnm (CETENAL, 1977).

3.2 Material vegetal

Se partió de brotes de *Epithelantha micromeris* generados *in vitro*; de 0.8 a 1.0 cm de altura.

3.3 Medio nutritivo

Se utilizó el medio nutritivo propuesto por Murashige y Skoog 1962, (MS). Cuadro 3.

Cuadro 3.3. Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog 1962.

Compuestos	**Mg l^{-1}**	**g L^{-1}**	**g L^{-1} 10 lts**
Macronutrientes			
$NH_4 NO_3$	1650	1.65	16.5
KNO3	1900	1.9	19
$CaCl_2$. 2 H_2O	332.23	0.332	3.322
$KH_2 PO_4$	170	0.17	1.7
Mg SO_4 .7H_2O	370	0.37	3.7
Micronutrientes			
Kl	830	0.00083	0.0083
$H_3 BO_3$	6.2	0.0062	0.062
$MnSO_4$. 4H_2 O	17	0.017	0.1288
$ZnSO_2$. 7H $_2$ O	8.6	0.0086	0.086
$Na_2 MoO_4$. 2H_2O	250	0.00025	0.0025
$CuSO_4$. 5H_2O	25	0.000025	0.00025
$CoCl_2$. 6 H_2O	25	0.000025	0.00025
Sol. de Fierro			
Na2 EDTA	37.3	0.0373	0.0373
$FeSO_4$. 7H_2O	27.8	0.0278	0.0278
Vitaminas			
Inositol	100	0.1	1
Ac. Nicotínico	0.5	0.0005	0.005
Piridoxina- HCl	0.5	0.0005	0.005
Tiamina- HCl	0.1	0.0001	0.001
Glicina	2	0.002	0.02
Carbohidratos			
Sacarosa		30	
Solidificante			
Agar		8	
pH		5.8	

3.3.1 Preparación de soluciones madre

En el Cuadro 3.3 se muestran las cantidades de cada uno de los componentes del medio nutritivo MS, concentración a la que se prepararon las soluciones madre (10 X). Los componentes para preparar la solución de macronutrientes se pesaron en la

balanza analítica. Se disolvieron uno a uno en agua desionizada y se aforaron a 300 mL por lo que se tomaron para cada litro 30 mL de solución madre. El mismo procedimiento se utilizó para preparar las soluciones de micronutrientes, fierro y vitaminas y se aforaron a 100 mm de agua desionizada, tomándose para preparar cada litro 10 mL. Las soluciones madre se guardaron en el refrigerador, de donde se extrajeron cada vez que se preparó medio.

3.3 Preparación del medio nutritivo

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

1.- En un matraz se colocaron 500 ml mililitros de agua desionizada, enseguida se añadió el volumen correcto de cada una de las soluciones madre de macro, microelementos, fierro, vitaminas, reguladores de crecimiento y 30 g L^{-1} de sacarosa. La mezcla se aforó a un litro y se mantuvo en una parrilla de agitación por cinco minutos.

2.- El pH se midió con la ayuda de un potenciómetro (Hanna) y se ajustó a un valor de 5.8 utilizando soluciones de NaOH (0.5 y 0.1 N) y HCl (0.5 y 0.1 N).

3.- Se agregaron 8 g L^{-1} de agar que se diluyeron por medio de agitación continua con calor hasta que el medio se tornó transparente.

4.- El medio se distribuyó en frascos de gerber (20 mL/ frascos de medio) que se esterilizaron en la autoclave durante 15-20 minutos a una presión de 1 Kg cm^2 y a 120° C. Los frascos finalmente se sellaron.

3.4 Tratamientos

Los reguladores de crecimiento kinetina, ancymidol y prohexadiona de calcio agregados al medio nutritivo para la generación de brotes de *Epithelantha micromeris* constituyeron los siguientes tratamientos.

Cuadro 3.4. Listado de tratamientos para la formación de brotes de *Epithelantha micromeris.*

Identificación de tratamientos	Concentración
T1	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$
T2	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más ancymidol 1.00 mgL $^{-1}$
T3	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más ancymidol 2.00 mgL $^{-1}$
T4	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más ancymidol 3.00 mgL $^{-1}$
T5	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más prohexadiona de calcio 1.00 mgL $^{-1}$
T6	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más prohexadiona de calcio 2.00 mgL $^{-1}$
T7	Kinetina 1.00 mgL $^{-1}$ más prohexadiona de calcio 3.00 mgL $^{-1}$

3.5 Siembra

El protocolo que se utilizo para la siembra in vitro, fue la siguiente:

1. Se limpió la campana de flujo laminar con Qry y alcohol al 70%, y se encendió 30 minutos antes de comenzar a trabajar.

2. Los brotes de *Epithelantha micromeris, s*e sembraron bajo condiciones de asepsia en frascos de gerber en el medio de cultivo Murashige y Skoog

3. El instrumental (pinzas y bisturís) se esterilizó sumergiéndolo en solución de Qry durante 15 minutos, y antes de utilizarse directamente en la plántula se enjuagó con alcohol y se flameó en el mechero.

4. Se tomaron las plántulas para extraer los brotes que se utilizaron como explantes que se obtuvieron seccionando longitudinalmente los brotes evitando dañar la zona areolar como se muestra en la Figura 3.5 y 3.6 se manipularon frente al mechero en las cajas petri estériles.

El experimento se estableció el 22 de abril del 2010. Se registró el diámetro y altura de los explantes. La primera evaluación se programó a los 30 y 60 días de establecido el

experimento y se registro con la ayuda de un vernier (Scala) el diámetro, altura y número de brotes.



A) Plántula madre B) Corte del explante C) Explante

Figura 3.5. Obtención de explantes de Epithelantha micromeris. *Engelmann.*

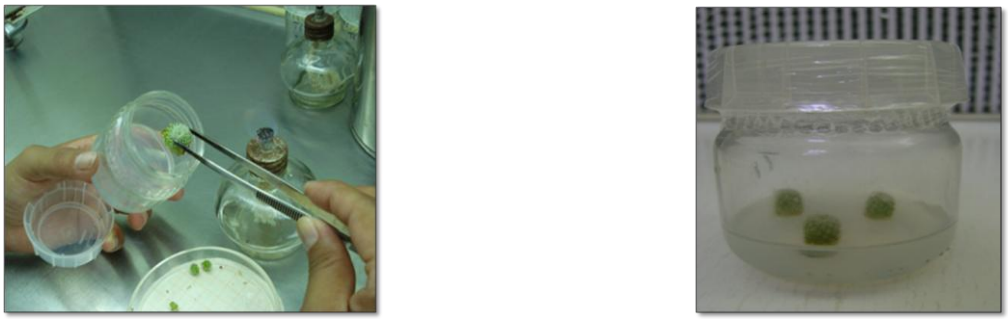


Figura3.6. Siembra de explantes de *Epithelantha micromeris. Engelmann.*

3.6 Condiciones ambientales

Los explantes estuvieron expuestos durante su desarrollo a condiciones controladas de temperatura a 24±2 °C con un fotoperíodo de 16 horas luz.

2.7 Diseño experimental

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa de la Universidad Autónoma de Nuevo León en un diseño bloques completamente al azar y una prueba Tukey ($p \leq 0.5$), utilizando siete tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento. Se colocaron 3 brotes por frasco considerando cada frasco como una repetición.

Con la ayuda de una correlación de medias Pearson nos permitió evaluar el comportamiento de las variables en dicho experimento.

Modelo estadístico

Bloques completamente al azar.

$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + £_{ij}$

$i=1,2,...,t$
$j=1,2,...,r$

μ = Parámetro, efecto medio
τ_i = Parámetro, efecto del tratamiento i
β_j = Parámetro, efecto del bloque j
ε_{ij}= valor aleatorio, error experimental de la u.e. i,j

Y_{ij} = Observación en la unidad experimental

3.8 Evaluación

Las evaluaciones se realizaron a los 30 y 60 días después de haber establecido el experimento, para cuantificar el diámetro, altura y número de brotes por explante que se generaron con las diferentes combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento (kinetina, ancymidol y prohexadiona de calcio), como se muestra en el Cuadro 3.5.

Cuadro 3.5. Formato para el registro de diámetro, altura del brote y No. de brotes de *Epithelantha micromeris.*

No. Tratamientos		Diámetro de brote (mm)			Altura de brote (cm)			No. de brotes		
T1	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T2	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T3	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T4	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T5	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T6	R1									
	R2									
	R3									
	R4									
T7	R1									
	R2									
	R3									
	R4									

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris.*

Los resultados obtenidos durante el experimento mediante el análisis de varianza y comparación de medias en dos evaluaciones a 30 y 60 días se describen a continuación.

El Cuadro 4.6 presenta el análisis de varianza para diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días de establecimiento bajo el efecto de los reguladores de crecimiento. El ANVA presentó diferencias significativas entre los tratamientos pero no para bloques, y con un coeficiente de variación de 15.07% lo que indicó una respuesta homogénea para cada tratamiento.

Cuadro 4.6. Análisis de varianza para el diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	0.332596	0.055433	3.5002	0.018
BLOQUES	3	0.061838	0.020613	1.3016	0.304
ERROR	18	0.285063	0.015837		
TOTAL	27	0.679497			
C.V. = 15.07%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

EL Cuadro 4.7 correspondiente a la comparación de medias reportó que los tratamientos con mayor diámetro fueron con el T4 donde se utilizo la combinación y concentración de Kinetina 1.0 mgL^{-1} mas Ancymidol 3.0 mgL^{-1} con 0.9725 mm de

dímetro y el T7, Kinetina 1.0 mgL^{-1} mas prohexadiona de calcio 3.0 mgL^{-1} con 0.9550 mm de dímetro presentándose una diferencia significativa entre tratamientos.

Cuadro 4.7. Pruebas de medias para el diámetro de los brotes *de Epithelantha micromeris* a los 30 días.

TRATAMIENTO	MEDIA	
4	0.9725	A
7	0.9550	A
3	0.8725	AB
2	0.8550	AB
6	0.8125	AB
5	0.7375	AB
1	0.6400	B

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

El Cuadro 4.8 presenta el análisis de varianza para diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días. El ANVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos y bloques, con un coeficiente de variación de 27.17% lo que indicó una respuesta concreta del crecimiento de los brotes ante los tratamientos.

Cuadro 4.8. Análisis de varianza para diámetro de brotes de *Epithelantha micromeris* 60 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	1.041096	0.173516	1.6881	0.181
BLOQUES	3	0.246716	0.082239	0.8001	0.512
ERROR	18	1.850185	0.102788		
TOTAL	27	3.137997			
C.V. = 27.17%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

La Figura 4.7 muestra el comportamiento del los reguladores de crecimiento para diámetro de los brotes de Epithelantha micromeris en las diferentes fechas de evaluación, conforme pasa el tiempo la tendencia en incrementar el diámetro aumenta. Los mejores tratamientos fueron él T4 Kinetina 1.0 mgL^{-1} más ancymidol 3.0 mgL^{-1} en 0.9725 mm y el T7, Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} con un valor de 1.2975 mm de diámetro y los que presentaron menor incremento para ambas fechas fue el tratamiento T1 Kinetina 1.0 mgL^{-1} en un 0.64 y 0.9125 mm de diámetro, esto se debe a las diferentes combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento.

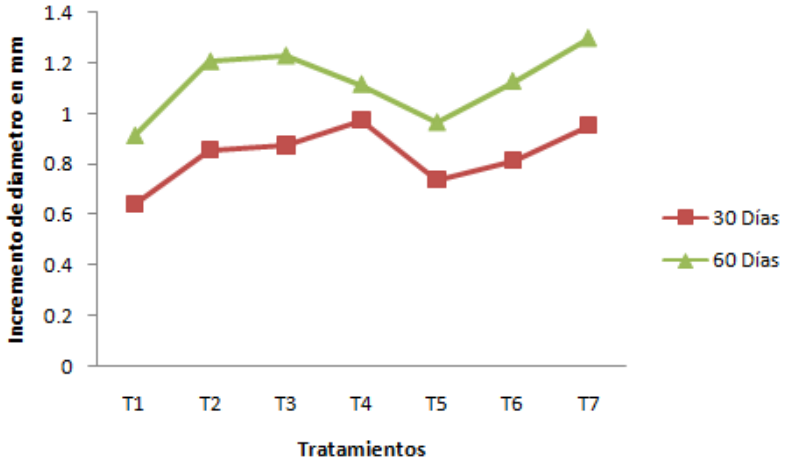


Figura 4.7: Efecto de los reguladores de crecimiento en el diámetro de brotes de Epithelantha micromeris en dos fechas de muestreo.

4.2 Altura de brotes de Epithelantha micromeris.

El Cuadro 4.9 muestra el análisis de varianza para altura de los brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días de establecimiento bajo el efecto de los reguladores de crecimiento. El ANVA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos al igual que para bloques, con un coeficiente de variación de 10.92% lo cual indicó un alto grado de homogeneidad en cada tratamiento para el desarrollo de los brotes.

Cuadro 4.9. Análisis de varianza para la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	0.229832	0.038305	1.7356	0.170
BLOQUES	3	0.029495	0.009832	0.4455	0.727
ERROR	18	0.397255	0.022070		
TOTAL	27	0.656582			
C.V. = 10.92%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

El Cuadro 4.10 presenta el análisis de varianza para altura de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días de establecimiento bajo el efecto de los reguladores de crecimiento. El ANVA no presentó diferencias significativas entre los tratamientos y bloques, con un coeficiente de variación de 18.08%, valor indicador de la fiel respuesta del crecimiento de los brotes mediante la combinación de los tratamientos.

Cuadro 4.10. Análisis de varianza para la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	0.862045	0.143674	1.4341	0.256
BLOQUES	3	0.441467	0.147156	1.4688	0.256
ERROR	18	1.803360	0.100187		
TOTAL	27	3.106873			
C.V. = 18.08%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

La Figura 4.8 muestra el comportamiento del los reguladores de crecimiento para altura de brotes de *Epithelantha micromeris,* en dos fechas evaluadas, los valores más bajos en ambas fechas correspondieron al (T4) Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Ancymidol 3.0 mgL^{-1} con 1.27cm de altura a los 30 días y 60 días con 1.43 cm de altura, sin embargo (T7) Kinetina 1.0 mgL^{-1} mas Prohexadiona de calcio 3.0 mgL^{-1} fue el mejor para ambas fechas de evaluación con valores de 1.4975 y 2.065 cm de altura para los 30 y 60 días respectivamente.

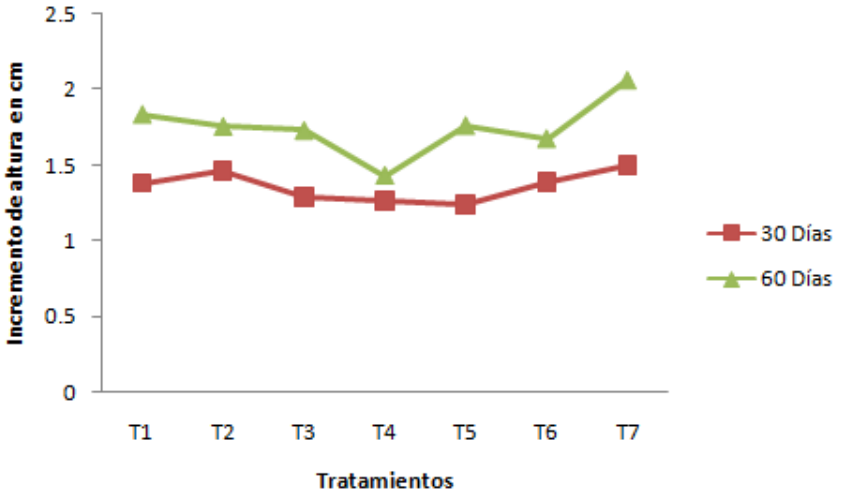


Figura 4.8: Efecto de los reguladores de crecimiento en la altura de brotes de *Epithelantha micromeris* en dos fechas de muestreo.

4.3 Número de brotes de Epithelantha micromeris.

El Cuadro 4.11 muestra el análisis de varianza para número de brotes en *Epithelantha micromeris* a los 30 días de establecimiento bajo el efecto de los reguladores de crecimiento. El ANVA presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos pero no para bloques, con un coeficiente de variación de 37.87% lo que muestra homogeneidad a la respuesta a los tratamientos.

Cuadro 4.11. Análisis de varianza para el numero de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	94.145203	15.690867	14.1494	0.000
BLOQUES	3	1.109680	0.369893	0.3336	0.803
ERROR	18	19.960999	1.108944		
TOTAL	27	115.215881			
C.V. = 37.87%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

EL Cuadro 4.12 correspondiente a la comparación de medias reportó que el tratamiento que generó mayor número de brotes fue el T7 donde se utilizó la combinación y concentración de Kinetina 1.0 mgL^{-1} mas prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} con 6.2150 brotes en promedio por explante y mostró diferencia altamente significativa entre tratamientos.

Cuadro 4.12. Pruebas de medias para la numero de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 30 días.

TRATAMIENTO	MEDIA	
7	6.2150	A
6	4.3125	AB
3	3.1525	BC
5	2.3225	BCD
2	1.9875	BCD
4	0.9375	CD
1	0.5400	D

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

El Cuadro 4.13 muestra el análisis de varianza para número de brotes en *Epithelantha micromeris* a los 60 días de establecimiento bajo el efecto de los reguladores de crecimiento. El ANVA mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos

pero no para bloques, con un coeficiente de variación de 41.69% lo que indico que al menos uno de los tratamientos produjo una respuesta altamente significativa en las variables evaluadas.

Cuadro 4.13. Análisis de varianza para el número de brotes de *Epithelantha micromeris* a los 60 días.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	450.676025	75.112671	4.8448	0.004
BLOQUES	3	0.742676	0.247559	0.0160	0.997
ERROR	18	279.065918	15.503662		
TOTAL	27	730.484619			
C.V. = 41.69%					

Diferencia estadísticamente significativa, (Tukey, P<0,05).

EL Cuadro 4.14 correspondiente a la comparación de medias reportó que el tratamiento que generó mayor número de brotes fue el T7 donde se utilizó la combinación y concentración de Kinetina 1.0mgL^{-1} mas prohexadiona de Calcio 3.0 mgLl^{-1} con 16.1650 brotes en promedio por explante y mostró una diferencia altamente significativa entre tratamientos.

Cuadro 4.14. Pruebas de medias para el número de brotes en *Epithelantha micromeris* a los 60 días.

TRATAMIENTO	MEDIA	
7	16.1650	A
6	13.1625	AB
5	11.2075	ABC
3	8.9550	ABC
1	6.4875	BC
2	6.3300	BC
4	3.7975	C

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, P<0,05).

El comportamiento para la generación de brotes mediante el efecto de los reguladores de crecimiento se muestra en la Figura 4.9 a través del tiempo se tiene un incremento en la generación de brotes pero no para todos los tratamientos como es el caso del T4 Kinetina 1.0 mgL^{-1} más ancymidol 3.0 mgL^{-1}, para el 22 de mayo mostró un promedio de 0.9375 y el 22 de junio un 3.7975 de brotes por explante mientras que para él (T7) Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de calcio 3.0 mgL^{-1} tiene un efecto positivo en un valor máximo a los 30 días en 6.21 5 y a los 60 días un 16. 165 brotes por explante como se puede observar en la Figura 4.10.

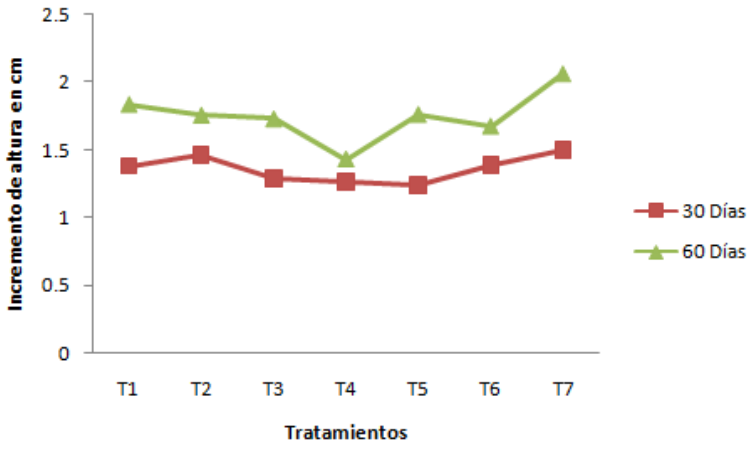


Figura 4.9: Efecto de los reguladores de crecimiento en la generación de brotes de *Epithelantha micromeris*, en las dos fechas de muestreo.

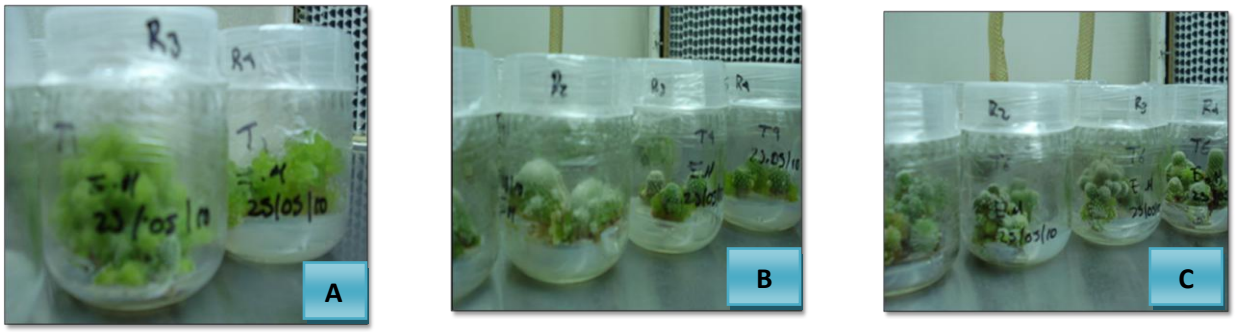


Figura 4.10: Efecto de los reguladores de crecimiento en la generación de brotes de *Epithelantha micromeris,* A) Kinetina, B) Kinetina más Ancymidol, C) Kinetina más Prohexadiona de calcio.

El análisis de correlación de medias múltiple muestra la relación que existe entre las variables evaluadas como se mencionara a continuación.

Cuadro 4.15. Matriz de correlación múltiple entre las variables evaluadas mediante un análisis de Pearson en los niveles de significancia de 0.01** y 0.05*.

Diam mm 1, 2, 3: Diámetro. Alt cm 1, 2, 3: Altura. Brot 1, 2, 3: Brotes. ** Altamente significativo (0.01). *

Correlación	Diam1mm	Diam2mm	Diam3mm	Alt 1 cm	Alt 2 cm	Alt 3 cm	Brot 1	Brot 2
Diam1 mm	1.000	-.115	.001	**.838****	-. 159	.048	**-.630****	**-. 432***
	.	.560	.998	.000	. 420	.807	.000	0.22
	28	28	28	28	28	28	28	28
Diam2 mm	-.115	1.000	**.872****	-.178	. 178	.186	.322	.220
	.560	.	.000	.365	. 366	.343	.095	.262
	28	28	28	28	28	28	28	28
Diam3 mm	.001	**.872****	1.000	-.077	. 046	.079	.138	.069
	.998	.000	.	.698	.818	.690	.482	.727
	28	28	28	28	28	28	28	28
Alt 1 cm	**.838****	-.178	-.077	1.000	-. 299	.022	**-. 691 ***	**-. 439 ***
	.000	.365	.698	.	.122	.913	.000	0.19
	28	28	28	28	28	28	28	28
Alt 2 cm	-.159	.178	.046	-.299	1.000	.286	.263	.288
	.420	.366	.818	.122	.	.141	.177	.137
	28	28	28	28	28	28	28	28
Alt 3 cm	.048	.186	.079	.022	.286	1.000	.219	**.459 ***
	.807	.343	.690	.913	.141	.	.262	.014
	28	28	28	28	28	28	28	28
Brot 1	**-.630****	.322	.138	**-.691****	.263	.219	1.000	**.860 ****
	.000	.095	.482	.000	.177	.262	.	.000
	28	28	28	28	28	28	28	28
Brot 2	**-.432***	.220	.069	**-.439***	.288	**.459***	**.806 ****	1.000
	.022	.262	.727	.019	.137	.014	.000	.
	28	28	28	28	28	28	28	28

Significativo (0.05)

El Cuadro 15. Indica que el diámetro uno tiene un nivel altamente significativo 0.01 de correlación con la altura uno en un .838 sin embargo para el número de brotes es

altamente significativo 0.01 en un - .630 y para el brote dos es significativo 0.05 con un valor de - .432, esto nos indica que entre más altura menos numero de brotes para ambos casos.

La variable diámetro dos tiene alta correlación (0.01) con la altura uno hasta en un .872.

La variable diámetro tres nos indica una alta correlación con el diámetro dos. Presenta un valor altamente significativo (0.01) de un .872.

La altura uno está relacionada con el diámetro uno con un valor altamente significativo (0.01) de .838, esto quiere decir que entre más altura mayor diámetro , sin embargo para brotes es lo contrario entre mas altura menor número de brotes presentándose un grado de significancia (0.05) de un -.691 en brote 1 y -.439 para brote dos.

La variable altura tres tiene una relación (0.05) con el número de brotes de un .459, esto nos indica que entre más altura mayor número de brotes.

Para la variable brote 1 existe una correlación (0.01) con diámetro uno en un -.630, relacionándose también con la altura uno del brote hasta en un -.691 sin embargo para el numero de brotes dos presenta un valor altamente significativo (0.01), de un .806 lo cual indica la estrecha relación de los valores tomados a los 30 y 60 días.

En la variable brote dos existe una correlación (0.05), para diámetro uno en -.432 y en altura uno de -.439, sin embargo para altura tres mostró un valor de .459 pero para la variable brote dos presentó una relación (0.01) de .860 lo que significa que se obtendrán plantas con menor diámetro, altas a el tiempo evaluado y el comportamiento entre brotes.

Los resultados obtenidos por Johnson y Emino (1979), así como Echenique *et al.* (2004) coinciden con los del presente trabajo, ya que indican que es necesario un

balance adecuado citocinina: auxina para la formación de brotes en cultivo *in vitro*, de esta manera, los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentración deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación.

Se lograron brotes de E. micromeris con alturas de 1.4975 y 2.065 cm a los 30 y 60 días respectivamente lo que concuerda con Papafotiu *et al*. (2002) que desarrollaron brotes de cactus *M. elongata* de 1 cm o más de largo, luego de dos meses de cultivo y con Giusti *et al*. (2002) que obtuvieron en *M. pectinifera* brotes de hasta 1,5 cm de longitud, al cabo de unas 12 semanas de cultivo; mientras que con *M. san - angelensis* los explantes apicales originaron brotes simples y múltiples de 5 mm de longitud luego de 16 semanas. (Martínez – Vázquez y Rubluo, 1989).

Choreño 2002 trabajó con aréolas de Cephalocereus senilis cultivadas en medio MS adicionado con Kin que después de 40 días, obtuvo hasta 11 brotes en promedio con una altura de 0.9 cm y un diámetro de 0.6 cm, con apariencia vigorosa y sana. mientras que con *M. san - angelensis*, los explantes apicales originaron brotes simples y múltiples luego de 16 semanas, los cuales produjeron al menos 8 – 12 brotes por explantes (Martínez – Vázquez y Rubluo, 1989). Lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio que indican que se generaron 16.16 brotes de E. micromeris a los 60 días.

La utilización de kinetina en el desarrollo de brotes de E. micromeris fue fundamental ya que Ortiz y Vargas (1995) utilizaron brotes para la micropropagación de *Hylocereus elengatissimus* en un medio Murashige y Skoog con varias concentraciones de Kinetina. Los tratamientos con mayor proporción de kinetina formaron plántulas completas, también Velázquez y Soltero (2001) encontraron que las fuentes de citocinina (Kinetina y 2IP) presentaron efectos altamente significativos sobre la producción de brotes de *Epithelantha micromeris* var. Micromeris, además Dabekaussen *et al.* (1991) mencionan que la citocinina BAP es un requisito esencial para la activación de areolas, lo que permite llevar a cabo la micropropagación de

Sulcorebutia alba; mientras que Ortiz y Vargas (1995) observaron que la activación de areolas por la Kinetina se traduce en la formación de brotes y plántulas completas

La combinación de citocinina con retardantes del crecimiento resultó adecuada para aumentar la cantidad y calidad de brotes de E. micromeris en el presente estudio, al respecto Daquinta *et at*,.2005 trabajaron en el cultivo in vitro del banano FHIA-18 utilizando yemas apicales que fueron establecidas en un medio MS (Murashige & Skoog 1962) en diferentes medios de cultivo (sólido, líquido estacionario e inmersión temporal) los mejores resultados se obtuvieron de la combinación de BAP 4.0 mgL^{-1} y Paclobutrazol 2.0 mgL^{-1} con 8 brotes por explante mientras que Debergh et al,. 1992 propagaron brotes *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus* en un medio MS adicionado con paclobutrazol y kinetina en concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 mgL^{-1}; la combinación de paclobutrazol 1.0 mgL^{-1} y kinetina 3.0 mgL^{-1} generó 18 brotes por explantes y no se presentaron brotes sobrehidratados, sin embargo para prohexadiona de calcio 3.0 mgL^{-1} y kinetina 5.0 mgL^{-1} se presentó sobrehidratación de brotes.

CONCLUSIONES

TRATAMIENTO CON KINETINA

El tratamiento uno (T1) Kinetina 1.0 mgL^{-1}, produjo la menor cantidad de brotes por explante; a los 30 días 0.54 brotes por explante y a los 60 días 6.48 brotes por explante.

TRATAMIENTOS CON KINETINA MÁS ANCYMIDOL

El tratamiento tres (T3) Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Ancymidol 2.0 mgL^{-1} fue el mejor a los 30 días con 3.15 brotes por explante y a los 60 días el mejor tratamiento fue el (T5) Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Ancymidol 3.0 mgL^{-1} con 11.20 brotes por explante.

TRATAMIENTOS CON KINETINA MÁS PROHEXADIONA DE CALCIO

El tratamiento T7 Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} resultó ser el mejor de todos los tratamientos probados en el experimento, a los 30 días con 6.215 brotes por explante y a los 60 días con 16.165 brotes por explante.

CONCLUSION GENERAL

El mejor tratamiento indica que la combinación de Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} generó la mayor cantidad de brotes de *Epithelantha micromeris,* es decir, el retardante llevó a cabo su función al acortar los entrenudos y retrasar su desarrollo lo que permitió que la citocinina incrementara su número.

Los brotes obtenidos de los tratamientos que contenían Prohexadiona de calcio no presentaron problemas de sobrehidratación.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para la generación de brotes *in vitro* de *Epithelantha micromeris,* se inicio a partir de brotes propagados *in vitro* que se colocaron en un medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS) adicionado con Kinetina 1.0 mgL^{-1}*,* Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Ancymidol 1.0, 2.0, 3.0 mgL^{-1} y Kinetina mgL^{-1} más Prohexadiona de calcio 1.0, 2.0, 3.0. mgL^{-1}. Se colocaron tres brotes por cada frasco de gerber, considerando cada frasco como una repetición y se contó con cuatro repeticiones por tratamiento. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 24°C±2°C, con un fotoperíodo de 16 horas y una intensidad lumínica de 2800 lux. Se evaluó el número de brotes por explante a los 30 y 60 días de haber establecido el experimento. El tratamiento T7 Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} resultó ser el mejor de todos los tratamientos probados en el experimento, produjo a los 30 días 6.215 brotes por explante y a los 60 días 16.165 brotes por explante. El mejor tratamiento indica que la combinación de Kinetina 1.0 mgL^{-1} más Prohexadiona de Calcio 3.0 mgL^{-1} generó la mayor cantidad de brotes de *Epithelantha micromeris,* es decir, el retardante llevó a cabo su función al acortar los entrenudos y retrasar su desarrollo lo que permitió que la citocinina incrementara su número.

Palabras clave: *Epithelantha micromeris,* Kinetina, Ancymidol y Prohexadiona de calcio.

LITERATURA CITADA

Alda, F. 2011. Regulación de la fisiología vegetal I: Las hormonas vegetales. Disponible en, http://b-log-ia20.blogspot.com/2011/02/regulacion-de-la-fisiologia-vegetal-i.html.

Alan W. 2010. Reguladores de Crecimiento**.** Compendio de nombres comunes de los plaguicidas. Copyright.

Arteca, R.N.1996. Plant Growth Substances. Principles and Applications. Chapman & Hall, NY, EE.UU., 332 p.

Basak, A. and Rademacher W. 2000. Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of Prohexadione-Ca. Acta Horticulturae. 514: 41-50.

Bermúdez, L. Albany, N. Villegas, Z. Vilchez, J. Molina, M. 2008. Efecto de retardantes de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *aloe barbadensis* mill. en sistemas de medios líquido.Deparatamento de Botánica, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado 15205. Maracaibo ZU. 4005, Venezuela.

Boutherin, D. y Bron, G. 2002. Reproduccion de las plantas horticolas. Edición Omega, Barcelona España.

Bravo, H. E. 1994. Las cactáceas de México, Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. D.F.

Bravo, H. H. 1978. Las cetáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 130-699.pp

Bravo. H. H. 1991. Las cactáceas de México. Primera edición Vol. II. Editorial Universidad Autónoma de México. pp 239.

Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México, Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. I, 743P.

Bryers, R. and Yoder, K. 1999. Prohexadione-Calcium inhibits apple, but not peach, tree growth, but has little influence on apple fruit thining or quality. Hortscience. (34): 1205-1209.

Cassells, A. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation, Technology and 99. Cell, Tissue Organ Culture 2: 349 – 353.

CETENAL.1977. Comisión de Estudios del Territorio Nacional Saltillo, carta geológica. G-1473. Escala 1:50000. Saltillo, Coahuila, México.Chem.Soc. in plant growth substances (Ed. N.B. Mandova). Cap.. 10,pp263-279.

Choreño. T. J. M; González. R.H.; Terrazas. S. T y Hernández. L. A. .2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth pfeiffer a partir de aréolas. Revista Chapingo Serie Horticultura 8(2): 183-196.

Clayton, P. Hubstenberger, J. y Phillips, G. 1990. Micropropagation of members of the *Cactaceae* subtribe *Cactinae*. Journal of the American Society for Horticultural Science 115(2): 337 – 343.

Coleto, J. 1994. Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. 2ed.Neografis, Madrid, España.167pp.

Costa, G. Sabatini, E. Spinelli, F. Andreotti, C. Bomben, C. VIzzotto, G. 2004. Two years of application of prohexadione-ca on apple: Effect on vegetative and cropping performance, fruit quality, return bloom and residual effect. Acta Horticulturae 653: 35-40.

Daquinta, M. Lezcano, R. Escalona, M y Santos. R. 2005. Multiplicación *in vitro* del banano FHIA-18 con el empleo de paclobutrazol, INFO*MUSA.* Vol 10, N° 2

Debergh, P y Read, P. 1991. Micropropagation, In: Deberg, P y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation, Technology and Aplication. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp 1 – 13.

Debergh, P, Aitken-Chistie, J. Cohen, D. Grout, B. von Arnold,S. Zimmermann,T.W. and M.Ziv.1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Cutlure.30:135-140.

Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mroginski. 2004. “Biotecnologia y Mejoramiento Vegetal”. Primera edición. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.

Elfing, D.C. Lang, G.A. and Visser, B.B. 2003. Prohexadione-Ca and ethephon reduce shoot growth and increase flowering in young, vigorous sweet cherry trees. HortScience. 38: 293-298

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

Escobedo, B. L. 2000. El cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. Memorias de la primera semana de agronomía Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México.

Evans, J.R. Evans, R.R. Regusci, C.L and Rademacher, W. 1999. Mode of Action, Metabolism, and Uptake of BAS 125W Prohexadione Calcium. HortScience 34 (7): 1200-1201.

Fahn, A. 1978. Anatomía Vegetal. H. Blume. Ediciones. Mdrid, España.

Fay, M. F. y Gratton, J. 1992. Tissue cultura of cacti and other succulents: a literatura revie and a report on micropropagation at Kew. Bradleya 10: 33-48.

García M, Escalona M, Meneses. S. 2004. Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores de crecimiento en la tuberización *in vitro* de ñame. Biotecnología Vegetal 4 (4): 184-187.

George, E. y Sherrington, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. London, England. Eastern Press. 709 p.

GIusti, P.; Vitti, D. Fiocchetti, F. Colla, G.; Saccardo, F. y Tucci, M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae 95: 319 – 332.

Griggs, D.H., Hedden, P., Temple. Smith, K.E., Rademacher, W. 1991. Inhibition of gibberellins 2ß-hydroxylases by acyclohexanedione derivatives. Phytochemistry. 30: 2513-2517.

Grossmann, K.; Kwiatkowski, J.; Siebecker, H.; Jung, J. 1987. Regulation of plant morphology by growth retardants. Effects on phytohormone levels in soybean seedlings determined by immunoassay. Plant Physiology 84: 1018-1021.

Haberlandt, G. 1902. Kuitinversuch mit isolierten pflantzer Sber. Acad.Wiens Wien. III:69-92. En cultivo de tejidos vegetales, Hurtado, D. V y M. E. Merino. Primera edición. Trillas. México. 1987.

Hartmann, H. y Kester, D.E. 1999. Propagacion de plantas. Editorial Continental. S. A. de C.V. Edición. México. 760 pp.

Johnson, J. y Emino, E. 1979. Tissue culture propagation in the *Cactaceae*. Cactus and Succulent Journal (U.S.A.) 51: 275 - 279.

Johnson, J.L y Emino, E.R.*1979. Tissue cultura propagation in the cactáceae. Cact. Succ.J. (US) 51: 275-277.*

Lindsey, K. y M. G. K. Jones. 1989. “Biotecnología Vegetal agrícola”. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

López. J. Gómez R. Rayas. A. Montano. N. Reinaldo. D. Trujillo. R. Cabrera. M. Santos. A. Ventura. J. Medero. V. García. M. Basail. M. Cantero. A. y Albert. J. 2005. Embriogénesis somática en el cv. Navolean a partir de ápices de brotes de yemas axilares. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo 6, Santo. Domingo., Villa Clara, CP 53 000, Cuba. *Biotecnología Vegetal. 5: (2). 109– 113.*

Martínez, Vázquez, O., and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mamillaria san-angelensis* Sánchez–Mejorada. J. Hort. Sci. 64(1): 99-105.

Medjdoub, R.,V.A L, J., and Blanco, A. 2004. Prohexadione-Ca inhibits vegetative growth of `Smoothe Golden Delicios´apple tree. Scientia Horticulturae. 101: 243-253

Minocha, S. y Mehra, P. 1974. Nutricional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (*Cactaceae*). American Journal of Botany 61(2): 168 – 173.

Naraganaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tisúes cultures. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Reintert, J. and Bajab, Y.P.S. (Ed.), 179-206, Springer, Verlang, Berlin.1977.

Nava-Esparza, V. C. y Yánez, L. 1984. Propagation de Cephalocereus senilis mediante cultivo de tejidos. Cact. Suc. Mex. 29: 3-7.

Nerd A,. and Mizrahi. 1997. Reproductive biology of fruit cacti. Hort. Rev. 18:322-346.

Niickell, L.G. 1979. Controling Biological Brhavior of plant with Synthetia plant Growth regulating chemicals, symp.13th. Middle Atlantic Rec. Meet. Amer.

Oliveira, S., Pires, M., Priolli, A. y Mangolin-, C. 1995. *In vitro*propagation of *Cereus peruvianus* MILL. (*Cactaceae*). *In vitro* Cellular Development. Biology Plant 31:47 – 50.

Ortiz. M. J. G. y Vargas .F.M. 1995. Micropropagación in vitro de Heliocereus elegantissimus (Britton y Rose) var. elegantissimus (cactaceae). Cact. Y Suc. Mex. 40(2): 41- 46. pp.

Owens, C.L and Stover, E. 1999. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to Prohexadione-calcium. HortScience. 34: 1194-1196.

Papafotiou, M., Balotis, G.; Louka, P y Chronopoulos, J. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 163 – 167.

Pérez, E. y Dávila, C. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg, and *P. strobiliformis* Wedermann (*Cactaceae*). *In vitro* Cellular Development Biology Plant. 38 (1) 73 – 78.

Pérez, M.B.E.E. Villalobos, E. Meza y H. Lizalde. 1995. Desarrollo de sistemas para la propagación masiva y conservación del germoplasma in vitro de 20 especies mexicanas de cactáceas. Investigación y Científica, 15: 36-43.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid, España. Mundi – Prensa. 362 p.

Ramírez, H. Herrera, B. Gámez. Méndez, H. Benavides, A. De la cruz, J.A. Breton. Álvarez, H. Rancaño, J.H. y Villareal, Q. J. A. 2008. Prohexadiona de calcio disminuye el contenido de giberelinas endógenas en ápices de tomate saladette y chile pimiento. Rev. Chapingo Ser.Hortic. (14): 2.

Ramírez, H.; Hoad, G. V.; Benavides, A.; Rangel, E. 2001. Gibberellins in apple seeds and the transport of (3H)-GA4. Revista de la sociedad Química de México 45(2): 47–50.

Ramírez, H; Benavides, A; Robledo, V; Hernández, J. (2000). Efecto de prohexadiona de calcio en manzano (*Malus doméstica Borkh*). Departamento de Horticultura. UAAAN. Saltillo Coahuila. México. Acta Hort. 565:139-140.

Redemacher, W. 2000. Growht retardants: effects on giberellin biosíntesis and other metabolic pathways. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 501-531.

Rodriguez-Garay, B., and A. Rubluo.1992.*In vitro* morphogenetic responses of the endange-red cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). Cactus and Suculent J. 64:116-119.

Santiago. M. H. 2001. Enraizamiento in vitro de Epithelantha micromeris Engelmann (CACTACEA). Tesis profesional U.A.A.A.N., Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p21.

Seemann, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación, In: Barriga, P y Neira, C (ed). Cultivos no tradicionales. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Pp: 87–145.

Sociedad Mexicana de Cartología A. C. las cactáceas y suculentas mexicanas.

Starling, R. 1983. In vitro propagation of Leuchienbergia principis, Cactus and Succulnt Journal (U.S.) 57: 114-115.

Street, H. E. 1977. Growth Patterns in tissue (callus). Cultures in: Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs. Vol. II. Ed. Blackewell Scientific Publications. Pp. 267-307.

Sugar, d., elfving, d and mielke, e. 2002. effects of prohexadione-calcium (apogee^{tm}) on blossoming, production and fruit quality in pear. acta horticulturae. 596: 757-760.

Swain, S. et al., 1997. Gibberellins are required for embryo growth and seed development in pea. The Plant Jour*nal. 12 (6): 1329-1338.*

Villavicencio, G. E. 2002. Técnica de multiplicación para cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción. Comisión Nacional Forestal. Gerencia de Investigación y Desarrollo Tecnológico Forestal, Nicaragua.

Weaver.J.R. 1976.-Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial trillas. México.

Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitr* plants. In: Deberg, P y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation, Technology and Aplication. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 45 - 69.