



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.)  
Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

**DULCE MARÍA TAPIA CRUZ**

**DIRECTOR: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA**

**PACHUCA DE SOTO, HIDALGO**

**2006**

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A las autoridades del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), de la UAEH por facilitarme el uso de sus instalaciones durante el desarrollo del presente trabajo.
- ✓ Con profundo respecto a la Dra. Ana Laura López Escamilla, por sus enseñanzas, su valiosa asesoría, por su motivación y apoyo constante durante mi formación profesional y durante la realización de esta tesis. MIL GRACIAS.
- ✓ Al Programa del Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) por la beca otorgada durante la realización del proyecto PROPAGACIÓN *in vitro* DE CACTÁCEAS AMENAZADAS DE LA BARRANCA DE METZTITLÁN.
- ✓ A los directivos y personal de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, por la donación de material biológico y por su apoyo durante el trabajo de campo.
- ✓ Al comité del vivero “Florycactus” (Xochitl Huitznáhuatl S. de R. L. Mi.) en Dom Con. S/N Barrio Tlaxomoti “El pato” en Metztitlán Hgo, por permitirme el uso de sus instalaciones durante la etapa de aclimatización *ex vitro* de las plantas, por sus atenciones y colaboración en el mantenimiento de las mismas. Gracias a la Sra. Salomé, a su hija Agustina y a la Sra. Maru.
- ✓ A la Biol. Laura Patricia Olguín Santos de la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias-UNAM por sus valiosas sugerencias y aportaciones al trabajo escrito.
- ✓ Al Dr. Salvador Arias Montes del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM por su asesoría sobre la biología de las cactáceas y por el apoyo otorgado en la colecta de los frutos.

0

- ✓ Al M. en C. Mario Segura Almaráz del Centro de Investigaciones Biológicas-UAEH por la realización de la secuencia fotográfica de la germinación y por su constante motivación.
- ✓ A la empresa Gerber ® por la donación de frascos.
- ✓ A todos y a cada uno de mis profesores por dedicar parte de su tiempo y esfuerzo en mi formación profesional. MIL GRACIAS.
- ✓ A mis compañeros del Laboratorio de Morfofisiología Vegetal del CIB-UAEH especialmente a Gil, por todo su apoyo en el trabajo de campo, a Noemy por su constante motivación y a Marisol. Mil gracias por las horas compartidas de trabajo en el laboratorio.
- ✓ A mi familia y amigos por su constante motivación y apoyo en todos los aspectos. MIL GRACIAS.

## *DEDICATORIA*

*A mi familia*

*A mis padres Juan Tapia Ramírez y Catalina Cruz Romero*

*Por sus desvelos y esfuerzos que impulsan los míos*

*A mis hermanos Rigoberto, Marina Isela y Nadia, en especial a ti Mari, por ser el pilar mas fuerte de nuestra familia, por dar todo incondicionalmente*

*A Itzel, Karla, Juan Manuel, Mariana y José Angel*

*Gracias por esta oportunidad, por su confianza y cariño de siempre*

*A Mane, por tu invaluable compañía.*

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN  
EL LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGÍA  
VEGETAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DE LA UAEH, BAJO LA DIRECCIÓN  
DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA.

<b>ÍNDICE</b>	I
<b>ABREVIATURAS</b>	II
<b>RESUMEN</b>	iii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
1.-Las cactáceas	3
2.- Problemática de conservación	4
3.- Micropropagación	6
a) Reseña histórica	6
b) Definición	7
c) Ventajas y desventajas de la micropropagación	13
4.- Micropropagación en Cactaceae	14
5.- <i>Cephalocereus senilis</i> (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae)	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>IV. OBJETIVOS</b>	23
1.- General	23
2.- Particulares	23
<b>V. MATERIAL Y MÉTODO</b>	24
1.- Establecimiento <i>in vitro</i> y germinación de <i>C. senilis</i> (Etapa I)	24
2.- Inducción y proliferación de brotes (Etapa II)	25
3.- Individualización y enraizamiento (Etapa III)	27
4.- Elongación de brotes	27
5.- Aclimatización <i>in vitro</i> y establecimiento <i>ex vitro</i> (Etapa IV)	28
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	31
1.- Germinación	31
2.- Respuestas morfogénicas	39
a) Formación de callo	39
b) Organogénesis	41
1) Por activación areolar	41
2) Por regeneración apical	47
3) Rizogénesis	48
3.- Enraizamiento de los brotes regenerados	49
4.- Elongación de los brotes	50
5.- Aclimatización <i>in vitro</i> y evaluación de la sobrevivencia <i>ex vitro</i>	52
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	59
<b>LITERATURA CITADA</b>	61
<b>Anexo 1.</b> Descripción botánica de <i>Cephalocereus senilis</i>	71
<b>Anexo 2.</b> Sanción legal por la sobrecolecta de individuos de flora o fauna silvestre	72
<b>Anexo 3.</b> Formulación de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MS 50%	73

## ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indol-butírico
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenacético
ATIB	Ácido 2,3,5-triyodobenzóico
BA	N <sup>6</sup> -benciladenina
CAM	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (Crassulacean Acid Metabolism)
CITES	Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies de Flora y Fauna Silvestres
Kin	Kinetina
MS	Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962)
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2ip	N <sup>6</sup> -2-isopentil-adenina

## RESUMEN

*Cephalocereus senilis* es una especie de la familia Cactaceae, endémica de México muy apreciada como ornamental, por lo que desde hace tiempo ha sido objeto de sobrerrecolecta con fines comerciales. Actualmente se encuentra en la categoría de amenazada de extinción (A) de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001. Se distribuye en Veracruz y en Hidalgo, en este último dentro de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán.

Su propagación por medio de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales es una alternativa de conservación ya que a partir de poco material es posible obtener un número elevado de individuos que pueden ser comercializados sin afectar a las poblaciones silvestres. En el presente trabajo se logró la propagación *in vitro* de esta especie a partir de explantes longitudinales provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de 3 mm de longitud aproximadamente. La micropropagación fue por activación de aréolas utilizando medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 12 combinaciones de citocinina/auxina. Se obtuvieron en promedio de 7 y 11 brotes por explante en los tratamientos BA/ANA 1/0 y 2/0 mg/L respectivamente y el 86% de enraizamiento en medio MS basal adicionado con 15 g/L de sacarosa. Cuarenta semanas después de su establecimiento *ex vitro* se obtuvo hasta el 56% de sobrevivencia en el tratamiento donde las plantas micropropagadas se sometieron a un periodo de aclimatización *in vitro* que consistió en utilizar medio MS líquido con puentes de papel filtro reduciendo a la mitad su concentración y adicionado con 7.5 g/L de sacarosa.

## I. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad y el grado de amenaza de las poblaciones de cactáceas en México son motivo suficiente para realizar estudios con esta familia desde varios puntos de vista, como el taxonómico, sistemático, ecológico, fisiológico, morfológico y etnobotánico, entre otros, sin embargo los trabajos sobre su conservación y restauración de sus poblaciones actualmente son prioritarios.

Dado que las cactáceas han sido utilizadas como ornamentales desde hace mucho tiempo, se ha incrementado el interés para propagarlas en viveros comerciales; pero algunas especies presentan ciertas características que dificultan su propagación por los métodos convencionales, como aquellas cuyas etapas de maduración y producción de flores tardan años o bien, que no producen hijuelos, y/o tienen problemas de polinización y producen semillas que no son viables (Gratton y Fay, 1990).

La propagación por cultivo de tejidos se ha recomendado para aumentar la producción de plantas con alto potencial comercial como diversas ornamentales, frutales y hortícolas principalmente (Evans, 1990), pero además se considera una alternativa de conservación *ex situ* para especies que tienen algún grado de amenaza y que su propagación de manera convencional no es factible (Gratton y Fay, 1990).

Por medio de estas técnicas se han logrado propagar especies de grupos vegetales con algún riesgo de extinción, entre ellas las cactáceas, donde la propagación por esta vía ha sido exitosa en la mayoría de los casos (Oliveira *et al.*, 1995; Machado y Prioli, 1996; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

Sin embargo, aunque las técnicas para la obtención de plantas *in vitro* siguen un procedimiento general, son necesarios estudios específicos, puesto que se ha comprobado que cada especie tiene sus propios requerimientos hormonales y responde de diferente manera y en diferente tiempo, incluso bajo las mismas condiciones de cultivo (Malda *et al.*, 1999a; Rubluo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

Tal vez esta sea una desventaja para emplear estas técnicas con fines comerciales a gran escala, pero también resulta un incentivo para realizar más estudios de este tipo que, aunados a la creación de áreas naturales protegidas, ayuden a evitar el saqueo de las cactáceas mexicanas permitiendo su comercialización.

Por lo anterior se presenta este trabajo sobre la micropropagación de *C. senilis*, especie endémica de México que se encuentra amenazada de extinción; debido a que sus poblaciones han sido alteradas por la sobrerrecolecta de individuos jóvenes por su uso ornamental.

## II. ANTECEDENTES

### 1- Las cactáceas

La familia Cactaceae es endémica de América, en donde se distribuye desde el norte de Canadá hasta Argentina y, desde el nivel del mar hasta los 5100 m de altitud (Rzedowski, 1998; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Además de México, países como Chile, Brasil, Perú, Argentina, Bolivia, Estados Unidos y Costa Rica presentan un elevado porcentaje de especies endémicas (Hernández y Godínez, 1994).

En México la familia Cactaceae se encuentra entre las primeras cinco familias con el mayor número de especies nativas, de las cuales el 82.6% son endémicas (Rzedowski, 1998; Villaseñor, 2003). En el estado de Hidalgo de acuerdo al listado florístico de Villavicencio *et al.* (1998) esta familia ocupa el segundo lugar en diversidad, con 222 especies, superada únicamente por la familia Compositae.

Las cactáceas habitan en todos los tipos de vegetación excepto en la acuática, pero en donde alcanzan su máximo desarrollo es en los matorrales xerófilos y en los bosques tropicales caducifolios de las zonas áridas y semiáridas (Rzedowski, 1978, citado por Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). En México estas son las zonas más extensas puesto que ocupan aproximadamente la mitad de su territorio (Rzedowski, 1998; Toledo y Ordóñez, 1998), y se les considera el centro de concentración de especies de cactáceas más importante a nivel mundial (Hernández y Godínez, 1994).

La abundancia de los taxa de distribución restringida o endemismos a nivel de familia y género está positiva y notablemente correlacionada con la aridez (Rzedowski, 1998).

En México se han descrito varias zonas que están determinadas por las particularidades de su medio, en donde las cactáceas han alcanzado un gran desarrollo, de acuerdo a Bravo-Hollis y Scheinvar (1999) estas son:

- 1.- La zona árida Chihuahuense o desierto Chihuahuense
- 2.- La zona árida del desierto de Sonora
- 3.- La zona árida Querétano-Hidalguense
- 4.- La zona árida de Tehuacán–Cuicatlán.
- 5.- La zona árida de la depresión del Balsas en los estados de Michoacán y Guerrero Challenger (1998) también menciona
- 6.- El desierto Tamaulipeco y
- 7.- El desierto de la Provincia Biogeográfica Californiana.

Las cactáceas a diferencia del resto de las angiospermas, presentan una alta modificación de sus órganos y un sistema metabólico conocido como Metabolismo Ácido de las Crasuláceas. Dichas modificaciones les permiten por un lado acumular grandes cantidades de agua y por otro, evitar su pérdida excesiva (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

## **2.- Problemática de conservación**

Las zonas áridas y semiáridas de México están siendo alteradas por la agricultura de riego, la industria minera mexicana (Challenger, 1998), por el sobrepastoreo del ganado introducido, por la sobreexplotación de algunas especies del matorral xerófilo con importancia industrial como son la candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*), el guayule (*Parthenium argentatum*), la jojoba (*Simmondsia chinensis*), la lechugilla (*Agave lechuguilla*) y el mezquite

(*Prosopis juliflora*) entre otras, y por la severa extracción y el tráfico ilegal de numerosas especies de cactáceas (Toledo y Ordóñez, 1998).

Además, los asentamientos humanos en este tipo de vegetación cubren extensas áreas con toneladas de basura, en buena parte sin quemar y que debido a la falta de humedad no se degradan fácilmente, sino que persisten y se acumulan. El resultado de las actividades humanas dentro de los ecosistemas de zonas áridas de México ha sido la alteración y la degradación (Challenger, 1998). La alteración de estos ecosistemas ocasiona la modificación de las poblaciones que en él habitan, debido a esto, de los 913 taxa entre especies (669) y subespecies (244) de cactáceas que se reconocen actualmente en México, 255 están incluidos en alguna categoría de la NOM-059-ECOL-2001, 65 en el Libro Rojo de la IUCN y 41 se encuentran en el Apéndice I de la CITES (Guzmán *et al.*, 2003). Además existen otros listados de especies en riesgo de extinción en donde Cactaceae es de las familias con el mayor número de especies enlistadas (Vovides *et al.*, 1997).

Aunado a la problemática de origen antropogénico, la mayoría de las especies poseen características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen más vulnerables a los efectos de perturbación. Puesto que en condiciones naturales tienen tasas de crecimiento muy bajas y sus ciclos de vida son frecuentemente largos, las cactáceas generalmente requieren de periodos extensos para restablecerse demográficamente después de un evento de perturbación.

Otro aspecto característico de esta familia es la baja probabilidad de reclutamiento y sobrevivencia de nuevas plántulas, ya que en esta etapa son más susceptibles a la deshidratación y a depredadores, además muchas de las

especies se distribuyen en áreas muy restringidas y en condiciones edáficas especializadas (Hernández y Godínez, 1994).

### **3.- Micropropagación**

#### **a) Reseña histórica**

Gottlieb Haberlandt fue el pionero en el desarrollo del cultivo *in vitro* con los ensayos que realizó en 1902 sobre el cultivo de células aisladas de 3 géneros de monocotiledóneas. A pesar de lograr que las células sobrevivieran en condiciones artificiales, no consiguió que se dividieran, sin embargo definió el principio de la totipotencialidad celular, que es la base teórica del cultivo *in vitro*.

A partir de 1950 se establecieron las herramientas necesarias que permitieron el desarrollo de los medios de cultivo y el descubrimiento de las hormonas vegetales. Al respecto en 1962, Murashige y Skoog desarrollaron la formulación de un medio de cultivo con el que lograron un crecimiento rápido de tejidos de hojas de tabaco, en la actualidad se le conoce como medio MS y sus sales inorgánicas se usan con éxito en casi todas las especies.

Con el descubrimiento de las hormonas vegetales se iniciaron los trabajos sobre combinación hormonal, para controlar detalladamente la formación de brotes y de raíces en tejido indiferenciado (Jiménez-González, 1998a).

En 1963 White organizó el primer Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Universidad de Pensilvania en Estados Unidos de Norteamérica. Posterior a este evento las investigaciones progresaron y cada vez se encontraron diversas aplicaciones del Cultivo de Tejidos Vegetales (Collin y Edwards, 1998). En la actualidad las investigaciones sobre este tema han abierto otra área de la biología conocida como biotecnología vegetal (Jiménez-González, 1998a).

## **b) Definición**

El Cultivo de Tejidos Vegetales, (CTV) es el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos y químicamente definidos.

Dentro de las aplicaciones del CTV se encuentra la micropropagación que se define como la formación de brotes a partir de ápices, yemas o meristemos y la subsecuente regeneración de plantas.

Las formas de regeneración vegetal o respuestas morfogenéticas son: 1) organogénesis, se refiere a la formación de un primordio unipolar a partir de una yema hasta su desarrollo como un brote vegetativo, en este caso siempre existe conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Dentro de la organogénesis existen dos vías: a) la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o en primordios de hojas y la b) la formación de yemas *de novo* a partir de meristemos preexistentes o de tejido no meristemático, las cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células. 2) Embriogénesis somática, los embriones somáticos, asexuales o adventicios son los que se forman a partir de células que no son el resultado de la fusión de gametos, estas estructuras son bipolares, es decir que tienen un

eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Jiménez-González, 1998a).

Cualquier vía de micropropagación puede producir un gran número de plantas que son fenotípicamente similares a la planta original, pero el sistema más apropiado para obtener plantas genotípicamente iguales es la propagación por yemas axilares, puesto que es la respuesta más estable para conservar el genotipo, porque evita la variación somaclonal, muy común en la micropropagación cuando existe una fase intermedia de tejido indiferenciado (Evans, 1990; Pérez-Ponce, 1998).

El proceso de micropropagación consta de 5 etapas (Orellana-Pérez, 1998)

#### **Etapas 0.-** Selección del material vegetal.

El material biológico que se va a utilizar como fuente de explantes debe estar sano y completamente libre de patógenos. Se recomienda mantenerlo en un invernadero con un estricto control fitosanitario. Durante esta etapa, también se puede cambiar el estatus fisiológico de la planta madre, manipulando variables como: el fotoperiodo, la temperatura y la adición de hormonas vegetales.

El origen del material vegetal es crítico para el posterior crecimiento y respuesta organogenética (Kalilian-Fakhrai y Fakhrai, 1990).

#### **Etapas I.-** Desinfección y establecimiento *in vitro*

Se utiliza un tren de desinfección que consiste en someter el material a un lavado con detergente y posteriormente desinfectando con alcohol e hipoclorito de sodio (cloro comercial) en concentraciones que varían del 20 al 70% y de 2 al 50% respectivamente. También se reporta el uso de Cloruro de mercurio

(HgCl<sub>2</sub>) aunque por ser altamente tóxico no se recomienda. Los tiempos y concentraciones dependen del tipo de explante utilizado y son determinados por ensayo y error. También se emplean soluciones surfactantes como Tween 20 o Tween 80 para romper la tensión superficial del agua y permitir que los desinfectantes estén en contacto directo con la superficie del explante (Gratton y Fay, 1990; Villavicencio-Gutierrez *et al.*, 1999; Wakhlu y Bhau, 2000; Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Pelah *et al.*, 2002; Giusti *et al.*, 2002).

El medio de cultivo que se utiliza casi de manera general en cactáceas es el MS (Murashige y Skoog, 1962) ya que se reporta que es capaz de soportar todas las fases de la organogénesis.

Es importante seleccionar un tipo de explante adecuado, dependiendo de su disponibilidad y del objetivo de la investigación (Fay y Gratton, 1992).

Para la propagación de cactáceas, Rubluo y colaboradores (2002) recomiendan utilizar plántulas generadas *in vitro* como fuente de explantes, porque evitan problemas de contaminación, principalmente bacteriana; de otra forma resulta difícil desinfectar el tallo de organismos provenientes del campo, puesto que las espinas no dejan que las soluciones estén completamente en contacto con la superficie de la planta.

En cactáceas los explantes provenientes de plántulas pueden ser de cuatro tipos: 1) apicales, si se utiliza únicamente el ápice de la planta, 2) laterales, si se realiza un corte longitudinal de la plántula previa eliminación del ápice, 3) longitudinales, mediante un corte longitudinal de la plántula completa o 4) transversales, segmentos transversales del tallo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

## **Etapa II.-** Inducción y proliferación de brotes

Durante esta etapa se pretende inducir la formación y proliferación de brotes mediante la adición de hormonas vegetales al medio de cultivo. Las hormonas que se utilizan pertenecen a dos tipos, citocininas y auxinas. Las citocininas se utilizan para activar a las yemas laterales, las más utilizadas son N<sup>6</sup>-Benciladenina (BA), kinetina (K) y N<sup>6</sup>-2-isopentil-adenina (2ip). Las auxinas se utilizan para inducir la formación de callo y para generar la formación de raíces de los brotes formados.

Para la inducción de callo la auxina más utilizada es el 2,4-D y en algunos casos puede además inducir embriogénesis somática. El medio de cultivo utilizado durante la proliferación de los brotes puede contener únicamente una citocinina como en el caso de *Mammillaria candida*, *Stenocactus coptonogonus*, *Acharagma aguirreana* o *Stenocereus stellatus* en donde el mayor número de brotes por explante se formó con BA 1mg/L, al igual que para especies columnares como *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi*. En *Nyctocereus serpentinus*, *Astrophytum ornatum*, *Mammillaria oteroi* *Pilosocereus chrysacanthus* el mejor resultado se obtuvo con BA 2 mg/L en ausencia de auxinas (Pérez-Molphe-Balch, 1998 y Castro-Gallo *et al.*, 2002). Las concentraciones de citocininas utilizadas pueden ser de hasta 10 mg/L como en el caso de *C. senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000).

Las auxinas se utilizan en concentraciones muy bajas por ejemplo, en *Escobaria minima* y *Mammillaria pectinifera* se utilizó BA 5 mg/L+ANA 0.01 mg/L.

La mayoría de los aspectos de crecimiento y diferenciación celular así como la organogénesis en cultivo de tejidos, son controlados por la interacción de estas hormonas, tanto de las endógenas como de las exógenas que se agregan al medio de cultivo (Kalilian-Fakhrai y Fakhrai, 1990; Gaspar *et al.*, 1996) por lo que es necesario un balance adecuado para cada especie que se desee micropropagar (Rubluo, 1997; Malda *et al.*, 1999a; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

### **Etapas III.- Enraizamiento de brotes**

Durante esta etapa los brotes formados se separan del explante y se someten al efecto de las auxinas, puesto que estas hormonas definen órganos generalmente raíces (Gaspar *et al.*, 1996). Las auxinas más utilizadas para inducir el enraizamiento de los brotes en cactáceas son el Ácido Indolacético y el Ácido  $\alpha$ -naftalenacético.

También se ha observado que la presencia de carbón activado en el medio de cultivo promueve la formación de raíces. En *Acharagma aguirreana*, *Pachycereus schottii* y *Stenocereus stellatus* se utilizaron 3 gr/L y obtuvieron el 100% de brotes enraizados (Castro-Gallo *et al.*, 2002), sin embargo existen trabajos en donde se reporta la formación de raíces en medio basal, sin la adición de alguna hormona; como en *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha elephantidens*, *Epithelantha micromeris*, *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecycphora aselliformis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000; Wakhlu y Bhau, 2000; Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Giusti *et al.*, 2002).

#### **Etapa IV.- Acclimatización**

Durante esta etapa las plantas salen del ambiente aséptico y se preparan para su transferencia a condiciones *ex vitro*, es la etapa más arriesgada en un sistema de micropropagación exitoso puesto que de su resultado depende la eficacia total del sistema de micropropagación.

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, intercambio gaseoso limitado por el escaso flujo de aire, la temperatura constante y el medio de cultivo que es rico en compuestos orgánicos con grandes cantidades de sacarosa como fuente de carbono, que además, en algún momento de la micropropagación esta adicionado con hormonas exógenas. Estas características del ambiente *in vitro* inciden directamente en el fenotipo de las plantas cultivadas en características morfológicas como tallos delgados y alargados, bajas cantidades de ceras cuticulares y epicuticulares, incremento en la cantidad de agua dentro de las células, escasa actividad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixotrófico (Agramonte-Peñalver *et al.*, 1998; Pospíšilová *et al.*, 1999).

Estas alteraciones morfológicas y fisiológicas ocasionan que las plantas regeneradas *in vitro* no sobrevivan después de su establecimiento *ex vitro*, por lo cual se han propuesto una serie de estrategias que permiten incrementar la sobrevivencia, y están enfocadas a reducir la humedad relativa gradualmente, incrementar la intensidad luminosa e inducir el crecimiento autotrófico, principalmente (Agramonte-Peñalver *et al.*, 1998). Para lo que se pueden emplear contenedores ventilados que favorecen el movimiento del agua a través de la planta (Santamaría *et al.*, 2000) o incluso se pueden destapar los

frascos algunos días antes de que las plantas se saquen a suelo pero se debe tener cuidado de que no se contaminen demasiado. Respecto a la intensidad luminosa los frascos de cultivo pueden mantenerse en condiciones de invernadero para que reciban luz natural algunos días antes de que las plantas se establezcan *ex vitro*, así mismo se pueden realizar ajustes a la formulación de los medios de cultivo de las etapas finales (Agramonte-Peñalver *et al.*, 1998).

### **c) Ventajas y desventajas de la micropropagación**

#### Ventajas

- 1.- El rango de multiplicación es rápido para especies de difícil regeneración.
- 2.- Las estaciones del año no restringen la producción de las plantas pues se encuentran en ambientes controlados.
- 3.- Es posible la producción de plantas que de forma convencional serían difíciles de propagar.
- 4.- Se puede mantener la auto-incompatibilidad de las líneas usadas en la producción de semillas híbridas.
- 5.- Mediante el cultivo de meristemos es posible la producción de plantas libres de virus.
- 6.- Existe el potencial para automatizar la propagación a través del cultivo de brotes adventicios o de embriones en medio líquido.

#### Desventajas

- 1.- Se requiere de personal capacitado para dar un seguimiento a las plantas propagadas.

- 2.- El equipo, material y los reactivos necesarios son costosos.
- 3.- Se requiere de cuidados para mantener las áreas totalmente asépticas.
4. Después de la propagación *in vitro* se requiere de un largo periodo para aclimatizar las plantas.
- 5.- El tiempo de investigación para establecer las condiciones de cultivo para nuevas especies que son difíciles de regenerar o enraizar, puede ser muy largo.
- 6.- Existen fenómenos que afectan el proceso de la micropropagación: la formación de compuestos fenólicos dentro del frasco de cultivo, la presencia de contaminantes endógenos y la hiperhidratación de las plantas (Collin y Edwards, 1998).

#### **4.- Micropropagación en Cactaceae**

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada con fines de conservación en algunas especies de la familia Cactaceae, principalmente para aquellas, que son utilizadas con fines comerciales (Fay y Gratton, 1992).

El primer trabajo que se publicó sobre la propagación *in vitro* de una cactácea fue en 1976, por Kolár y colaboradores sobre *Mammillaria woodsii*, en el que lograron la regeneración de brotes a partir de tejido indiferenciado de médula cultivado en medio MS con 2 mg/L de kinetina. Tres años después Mauseth (1979) reportó la propagación de 10 especies de cactáceas a partir de aréolas en presencia de BA (1 a 10 mg/L (Olguín-Santos, 1994).

Fay y Gratton (1992), publicaron una lista de especies de plantas suculentas con las que se han realizado trabajos de micropropagación, y

mencionan que la familia Cactaceae es la de mayor interés para realizar estudios de este tipo.

En dicho listado se encuentran 33 especies, entre las que figuran *Astrophytum myriostigma*, *Aztekium ritteri*, *Acanthocalycium spiniflorum*, *Cumarinia odorata*, *Echinocactus grusonii* y *Turbinicarpus pseudomacroechele*, de las cuales 10 especies pertenecen al género *Mammillaria*, y tal vez este sea el género de Cactaceae en el que se ha puesto más interés respecto a propagación *in vitro* (Rubluo, 1997).

También se han realizado trabajos con *Cereus peruvianos* (Oliveira *et al.*, 1995; Machado y Prioli, 1996), con *Mammillaria elongata* (Papafotiou *et al.*, 2001) y *Epithelantha micromeris* (Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001) entre otras especies.

En la tabla 1 se muestran los resultados de trabajos sobre la propagación *in vitro* de algunas cactáceas, como el tipo de explante que generó la mejor respuesta, así como el número de brotes por explante que se formaron con la concentración hormonal que se indica. Los tipos de explantes que se han utilizado son; basales, transversales o apicales, pero en ninguno de los trabajos se evaluaron explantes longitudinales, el número de brotes por explante varía en gran medida desde 2 brotes por explante aproximadamente como en *C. senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000) hasta 18 en *Mammillaria sphaelata* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), la citocinina que más se utiliza para la regeneración de brotes en cactáceas es BA y en menos casos kinetina y 2ip.

0

Tabla 1.- Principales resultados de algunos trabajos sobre micropropagación de cactáceas

ESPECIE	EXPLANTE	BROTOS POR EXPLANTE (%±DE)	MS CON HORMONAS VEGETALES (mg/L)	REFERENCIA
<i>Astrophytum myriostigma</i> <b><i>Cephalocereus senilis</i></b> <i>Coryphantha clavata</i> <i>Coryphantha durangensis</i> <i>Coryphantha radians</i> <i>Echinocactus platyacanthus</i> <i>Echinocereus dubius</i> <i>Echinocereus pectinatus</i> <i>Echinofossulocactus sp.</i> <i>Ferocactus hamatacanthus</i> <i>Ferocactus histrix</i> <i>Ferocactus latispinus</i> <i>Ferocactus pilosus</i> <i>Mammillaria candida</i> <i>Mammillaria craigii</i> <i>Mammillaria formosa</i> <i>Mammillaria obscura</i> <i>Mammillaria sphaclata</i> <i>Mammillaria uncinata</i> <i>Nyctocereus serpentinus</i> <i>Stenocactus coptonogonus</i>	<b>Secciones transversales de plántulas germinadas <i>in vitro</i> o del tallo de plantas adultas mantenidas en invernadero</b>	9.23 ± 0.917 <b>2.82 ± 0.49</b> 4.73 ± 0.512 4.37 ± 0.492 4.15 ± 0.475 9.00 ± 0.985 4.87 ± 0.722 3.86 ± 0.966 12.05 ± 1.65 5.83 ± 0.625 5.62 ± 0.63 5.33 ± 0.834 5.125 ± 0.45 13.25 ± 2.37 4.65 ± 0.349 4.42 ± 0.46 4.78 ± 0.51 17.5 ± 2.56 5.25 ± 0.432 2.15 ± 0.752 16.75 ± 2.4	BA (1) + ANA (0.01) <b>BA (1) + ANA (0.01)</b> BA (1) BA (1) + ANA (0.01) BA (1) BA (1) BA (1) + ANA (0.01) BA (1) + ANA (0.01) BA (1) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) + ANA (0.01) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) BA (1) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) + ANA (0.1) BA (1) + ANA (0.01) BA (1) BA (2) BA (1)	<b>Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i>, 1998</b>
<i>Astrophytum myriostigma</i>	basal	4	Kin (1)	Villavicencio-Gutiérrez <i>et al.</i> , 1999
<b><i>Cephalocereus senilis</i></b>	<b>Secciones del tallo de una planta joven</b>	<b>1.67</b>	<b>BA (10)</b>	<b>Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000</b>
<i>Epithelantha micromeris</i>	Brotos formados <i>in vitro</i> . (no indican el tipo de explante)	17.25	Kin (8)	Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001
<i>Acharagma aguirreana</i> <i>Astrophytum ornatum</i> <i>Coryphantha elephantidens</i> <i>Ferocactus flavovirens</i> <i>Mammillaria bocasana</i> <i>Mammillaria oteroi</i> <i>Pachycereus schotti</i> <i>Pilosocereus chrysacanthus</i> <i>Stenocereus stellatus</i> <i>Thelocactus hexaedophorus</i>	n. e apical apical n. e lateral lateral transversal apical n. e apical	7.0 ± 1.3 11.0 ± 0.9 2.8 ± 0.7 7.5 ± 0.8 7.4 ± 0.4 5.3 ± 0.4 4.3 ± 0.6 9.6 ± 1.3 7.0 ± 0.7 13.6 ± 1.1	BA (1) BA (2) BA (3)+ ANA (0.1) 2ip (4) BA (2) + ATIB (2) BA (2) BA (3) BA (2) BA (1) 2ip (6)	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Escobaria minima</i> <i>Mammillaria pectinifera</i> <i>Pelecyphora aselliformis</i>	apicales, laterales y basales, los últimos mostraron la mejor respuesta	4.25 4.01 5.62	BA (5)+ANA (0.01) BA (5)+ ANA (0.01) Kin (5.28)+ANA (0.01)	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnegiea gigantea</i> <i>Pachycereus pringlei</i> <i>Stenocereus thurberi</i>	apical transversal transversal	4.5 ± 0.5 3.8 ± 0.3 4.3 ± 0.4	BA (1)	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	segmentos laterales del hipocótilo	5	BA (1.81)	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003

BA: N<sup>6</sup>-benciladenina, ANA: Ácido α-naftalenacético, 2iP: N<sup>6</sup>-2-isopentil-adenina, Kin: kinetina, ATIB: Ácido 2,3,5-triyodobenzóico y n. e = no especificado.

## 5.- *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae)



Figura 1. *C. senilis* en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán Hgo.

Es una cactácea columnar que llega a medir hasta 15 m de altura, su tallo es columnar simple aunque en raras ocasiones llega a ramificarse (usualmente cuando ha sufrido una lesión). En los organismos juveniles el tallo se encuentra completamente cubierto de cerdas de color blanco que llegan a medir desde 12 hasta 30 cm de largo, debido a esta particularidad, la especie es conocida como “viejito” (Figura 1). En estado adulto presenta un cefalio lateral, en donde en algunas costillas se reducen los espacios interareolares, por lo que hay abundantes cerdas blancas y tricomas de color beige. Las flores son de color rosa claro, miden de 5 a 9 cm de largo, se encuentran parcialmente ocultas en el cefalio y son nocturnas. El fruto es ovoidal, mide 3 cm de largo y de 2 a 2.5 cm de ancho, y es de color oscuro cuando madura. Las semillas (2.5 mm de largo y 2 mm de ancho) son numerosas con forma de gorro-casco, testa negra brillante con ornamentaciones celulares con puntuaciones (Anexo 1) (Bravo-Hollis, 1978).

Esta especie se distribuye en los estados de Hidalgo y Veracruz (Bravo-Hollis, 1978; Hernández y Godínez, 1994; Vovides *et al.*, 1997; Dávila-Aranda *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2003). En Hidalgo se distribuye en la Barranca de Tolantongo (Challenger, 1998) y en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán al centro-Este del estado (Figura 2), en los cerros que se encuentran al Este del Río Venados y que forman la barranca de Metztitlán, y en la base de los cerros “El León” y “Partido” en los márgenes del Río Grande Tulancingo en

el Municipio de Huasca. En esta área de la Reserva se localiza el tipo de vegetación al que se le ha llamado matorral crassicaule de *Cephalocereus senilis* puesto que dicha especie es la dominante (CONANP, 2003). En el estado de Veracruz se distribuye en el municipio de Huayacocotla (com. pers. Arias-Montes).



Figura 2.- Ubicación de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán en el estado de Hidalgo (Modificado de CONANP, 2003).

Existen diversos factores que a lo largo del tiempo han incidido en gran medida en la distribución de las poblaciones, actualmente estos se reflejan en la disminución del área de distribución de la especie puesto que en 1963, Britton y Rose reportaban su distribución hasta el estado de Guanajuato (citado por Chacón-Hernández, 1984).

Se considera que de todas las especies que se distribuyen en la barranca de Metztitlán, *C. senilis* es la más afectada por la extracción ilegal (que se da en todo su rango de distribución). Esta extracción disminuye en las zonas cercanas a las comunidades, por la presencia de los pobladores. El

saqueo a gran escala más reciente ocurrió en 1991 cuando llegaron a la Vega de Metztlán diez camiones trailer, contratados por una empresa japonesa, que fueron llenados con organismos de *C. senilis*, pero no se conocen cifras exactas de la cantidad de organismos recolectados (CONANP, 2003).

De 1998 a 2003 la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente Delegación Hidalgo, decomisó más de 600 organismos en los municipios aledaños a la Barranca de Metztlán a pesar de la sanción legal que origina este tipo de actos (PROFEPA, 2004) (Anexo 2). Si bien es cierto que esta cifra no es comparable con la de 1991, si indica que la especie se sigue recolectando de manera ilegal por tener una alta demanda en el mercado.

De acuerdo a un trabajo realizado sobre la ecología de las poblaciones de *C. senilis* en el que compararon dos poblaciones en la Barranca de Metztlán; una, en una zona no perturbada y otra en una perturbada, se obtuvo que en la zona no perturbada se encontró un individuo de menos de 10 cm de longitud cada 13 m<sup>2</sup>, en cambio en la zona perturbada se localizó uno cada 357 m<sup>2</sup>. Lo mismo sucedió para los organismos adultos ya que en la zona no perturbada se encontró uno cada 6.79 m<sup>2</sup> mientras que en la perturbada uno cada 19.3 m<sup>2</sup> (Nava-Esparza y Yáñez, 1984a).

En el trabajo citado se concluyó que el pastoreo y la sobrerrecolecta fueron los factores que determinaron la distribución de esta especie y que los individuos pequeños fueron los más afectados, debido tal vez a que son los que se manejan y transportan con más facilidad y porque en los individuos adultos las cerdas tienden a desaparecer por lo que dejan de ser tan atractivos.

También se han realizado estudios de carácter bioquímico con *C. senilis* en donde se reporta el descubrimiento de nuevos compuestos, por ejemplo

Pare *et al.* (1991) aislaron e identificaron un pigmento rojo llamado Cephalocerona, en cultivos *in vitro* de callo en suspensión tratados con quitina 8 mg/L. En otro estudio realizado por Liu *et al.* (1994) aislaron un nuevo flavonoide tetraglicósido a partir de material fresco (no especifican la edad de la planta). De acuerdo a datos espectroscópicos su estructura fue establecida como caempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil(1-->2)-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1-->6)]- $\beta$ -D galactopiranosido-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido.

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales han sido aplicadas con fines de propagación como un intento para la conservación de *C. senilis*. Se tiene el reporte de tres trabajos sobre el cultivo *in vitro* con esta especie; el primero realizado por Nava-Esparza y Yañez (1984b), en el que a partir de plántulas germinadas *in vitro* obtuvieron la formación de callo, pero no la diferenciación de brotes. El segundo trabajo lo llevaron a cabo Pérez-Molphe-Balch y colaboradores (1998), utilizaron segmentos del tallo de un organismo de entre 2 y 3 años de edad como fuente de explantes, obtuvieron la formación de entre 2 y 3 brotes por explante con la combinación hormonal BA/ANA 1/0.01 mg/L, el 100% de enraizamiento *in vitro* con 0.5 mg/L de AIA y hasta el 85% de sobrevivencia en condiciones *ex vitro*. El tercer trabajo lo realizaron Flores-León y Ortiz-Montiel (2000), en este estudio provocaron la etiolación (condición de una planta cultivada en la oscuridad o con baja intensidad de luz y caracterizada por el alargamiento de los entrenudos, la reducción de las hojas y la pérdida de la clorofila) de un organismo de 20 cm de longitud que provenía de su hábitat natural, seccionaron el ápice en segmentos de 0.5 cm<sup>3</sup> para generar brotes por activación areolar, obtuvieron en promedio 1.67 brotes por

explante con 10 mg/L de BA y el 90% de sobrevivencia en condiciones *ex vitro*.

En los tres trabajos utilizaron el medio MS como medio basal.

En cuanto a su estatus de conservación desde 1994 ha estado en la categoría de Amenazada de extinción de acuerdo a la NOM-059-ECOL-1994 y a la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 1994; 2002). No se encuentra en la lista roja de la UICN, y en cuanto a su situación dentro del comercio internacional se ubica en el Apéndice II de la CITES (Arias *et al.*, 2005).

Dada la importancia que tiene *C. senilis*; tanto ecológica, por ser una especie endémica de México y de distribución restringida representativa de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hgo., como económica por tener una elevada demanda comercial como planta de ornato, ha llevado a la aplicación del CTV con fines de propagarla. A pesar de que existen algunos trabajos publicados del tema, estos no dejan de ser escasos, por lo cual, todas aquellas investigaciones que permitan conocer más de cerca el comportamiento *in vitro* de esta especie aportarán nuevos conocimientos que no sólo podrían ser aplicados a nivel de especie, sino también a nivel de género o familia.

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *C. senilis* es una especie endémica, amenazada, con distribución restringida, de lento crecimiento y saqueada con fines comerciales se hace evidente la necesidad de establecer estrategias de conservación que aseguren la no afectación de las poblaciones silvestres, y al mismo tiempo promover su propagación con fines comerciales con base en las ventajas que proporciona la micropropagación.

El empleo de esta técnica es una alternativa de conservación, ya que a partir de poco material silvestre es posible obtener un número mayor de organismos que pueden ingresar al mercado de manera legal, lo más importante, sin perturbar las poblaciones naturales de por si ya alteradas.

Por lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

#### IV. OBJETIVOS

##### 1.- General

- Establecer la técnica de propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae).

##### 2.- Particulares

- Obtener un método para la desinfección y germinación *in vitro* de semillas de *Cephalocereus senilis*.
- Determinar la concentración hormonal adecuada para promover la formación del mayor número de brotes.
- Lograr la sobrevivencia en condiciones *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

## V. MATERIAL Y MÉTODO

### 1.- Establecimiento *in vitro* y germinación de *C. senilis* (Etapa I)

Las semillas utilizadas provenían de un fruto recolectado en julio de 2002 en la Reserva de la Biosfera “Barranca de Metztitlán” Hgo. Se escarificaron y desinfectaron de la siguiente manera: se lavaron con una solución de 50 ml de agua destilada y 6 gotas de Dawn ® (detergente líquido comercial) durante 20 minutos, después se escarificaron 15 segundos con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado, enseguida se lavaron con 50 ml de agua destilada y 6 gotas de Microdyn ® (bactericida comercial, plata coloidal 0.35%) durante 30 minutos, se desinfectaron 3 minutos con alcohol 70% y después con 50 ml de hipoclorito de sodio (NaOCl, 6% cloro activo) al 30% con cuatro gotas de “Tween 80” durante 30 minutos. Finalmente en condiciones asépticas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Todo el proceso se realizó en constante agitación.

Se sembraron 100 semillas en cada uno de los siguientes medios de cultivo (Anexo 3): 1) MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30g/L; 2) MS al 50% de sus componentes, (MS 50%) y 3) agua con agar. Para todos los medios, el pH se ajustó a 5.7-5.8 y se utilizó agar Bioxón ® 8g/L. En los tres casos, 50 semillas se escarificaron y desinfectaron y 50 semillas únicamente se desinfectaron.

Se colocaron 3 semillas en cada frasco que contenía 30 ml del medio de cultivo, se mantuvieron en incubación a  $26 \pm 2^{\circ}$  C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de  $60-70 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  con lámparas de luz incandescente. Se realizaron observaciones cada 5 días durante los 45 posteriores a la siembra.

## 2.- Inducción y proliferación de brotes (Etapa II)

Se estableció un barrido hormonal en el que se utilizaron plántulas germinadas *in vitro* de 1 a 3 cm de longitud como fuente de explantes, disecándolas para obtener dos explantes longitudinales, previa eliminación de la raíz (Figura 3).

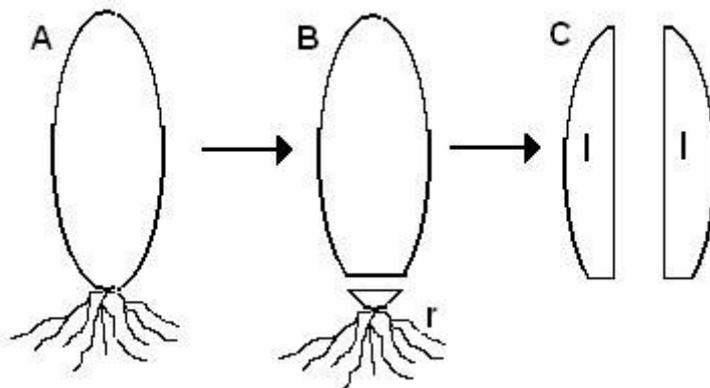


Figura 3. (A) Disección de plántulas de *C. senilis* de 1-3 cm de longitud, (B) a las cuales se les eliminó la raíz y (C) se cortaron longitudinalmente para obtener dos explantes. r = raíz; l = explante longitudinal.

Se utilizó el medio de cultivo MS con sacarosa 30 g/L, agar 8 g/L y pH 5.7-5.8 adicionado con N6-benciladenina (BA) en combinación con ácido naftalenacético (ANA) (BA/ANA) en concentraciones 0, 1 y 2 mg/L y 0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L respectivamente (medio de inducción) (Tabla 2). Se establecieron 12 tratamientos en los que, dependiendo de la cantidad de material biológico disponible, se sembraron de 12 a 20 explantes en cada uno colocando de 2 a 3 de ellos en cada frasco tipo Gerber® que contenía 30 ml del medio de inducción.

0

Tabla 2.- Concentraciones de N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) y de ácido naftalenacético (ANA) utilizadas para inducir la formación *in vitro* de brotes de *Cephalocereus senilis*.

	BA (mg/L)			
	0	1	2	
ANA (mg/L)	0	0/0	1/0	2/0
	0.01	0/0.01	1/0.01	2/0.01
	0.1	0/0.1	1/0.1	2/0.1
	1	0/1	1/1	2/1

Los cultivos permanecieron en un cuarto de incubación ( $26 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de  $60-70 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) durante 8 a 12 semanas, (tiempo de inducción) y posteriormente fueron subcultivados a medio MS sin hormonas para promover la proliferación de brotes. Los cultivos fueron evaluados para registrar los tipos de respuestas morfogénicas y el número de brotes por tratamiento. El número total de brotes fue registrado después de 36 semanas de cultivo.

### Repetición de tratamientos

Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo a la disponibilidad del material biológico se repitieron los dos tratamientos en donde se obtuvo el mayor número de brotes. Se sembraron 30 explantes longitudinales provenientes de plántulas germinadas *in vitro* en cada tratamiento. Se colocó un explante en cada frasco que contenía 30 ml del medio de inducción.

Para conocer el número de brotes formados por explante después de 12 semanas en el medio de inducción se realizó el primer conteo de los brotes y posteriormente se subcultivaron a MS en donde permanecieron 8 semanas. Después de este tiempo se realizó la segunda evaluación del número de

brotos, los cuales se individualizaron y subcultivaron a MS adicionado con 15 g/L de sacarosa para estimular la formación de raíces.

### **3.- Individualización y enraizamiento (Etapa III)**

Brotos de aproximadamente 10 mm de longitud, provenientes de los distintos tratamientos con hormonas vegetales, se individualizaron y subcultivaron a medio MS reduciendo la sacarosa a 15 g/L y se mantuvieron en condiciones de incubación ( $26 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de 60-70  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

La formación de raíces se evaluó semanalmente en las tres semanas posteriores al subcultivo y después una vez cada 3 meses durante los siguientes 6 meses. Se consideró como brote enraizado aquel que presentó al menos una raíz de 5 mm de longitud.

### **4.- Elongación de brotes**

Los brotes enraizados se transfirieron a medio MS líquido (con puentes de papel filtro) adicionado con sacarosa 15 g/L. Se comparó la longitud en medio de cultivo sólido y en líquido. De un total de 40 plantas, 20 se sembraron en medio MS sólido y 20 en medio MS líquido, ambos con sacarosa 15 g/L (la siembra y las mediciones se realizaron el mismo día). Se evaluaron la longitud del tallo y de la raíz, el diámetro del tallo y el peso fresco de los brotes. Las mediciones se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar antes y después de 16 semanas de incubación a  $26 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de 60-70  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ .

## 5.- Aclimatización *in vitro* y establecimiento *ex vitro* (Etapa IV)



Figura 4. Sistema de aclimatización *in vitro*. m, medio líquido con puentes de papel filtro; t, tapas perforadas y selladas con cinta Micropore®

Con el fin de estimular el funcionamiento del aparato fotosintético, se llevó a cabo la aclimatización *in vitro* en puentes de papel filtro con medio de cultivo MS líquido al 50% de sus componentes, adicionado con sacarosa 7.5 g/L y se mantuvieron en un contenedor ventilado formado por un frasco de vidrio tipo Gerber® de 110 ml de capacidad, con tapas de polipropileno a las

cuales se les realizó un orificio de 8 mm de diámetro en la parte central, que se cubrió por ambos lados con una capa de cinta Micropore® (Figura 4).

Dos lotes de brotes que permanecieron seis y siete meses en la etapa de elongación se colocaron en el sistema anteriormente descrito para su aclimatización *in vitro* y continuaron ahí cinco y cuatro meses respectivamente, antes de transferirlos a condiciones *ex vitro*.

Los cultivos en etapa de aclimatización *in vitro* fueron incubados a  $26 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 16/8 e intensidad luminosa de  $60-70 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ .

Otros dos lotes de brotes que estuvieron cuatro y siete meses en la etapa de elongación (MS líquido con 15 g/L de sacarosa) y un último lote donde los brotes permanecieron durante 11 meses en medio de enrizamiento (MS con sacarosa 15 g/L) se removieron del frasco para ser colocados a condiciones *ex vitro*.

Los brotes que permanecieron tanto en la fase de aclimatización *in vitro* como aquellos que directamente se transfirieron a suelo siguieron el mismo

0

procedimiento: se sacaron de los frascos y se les enjuagó la raíz con agua destilada, cuidando de no maltratarla o romperla. Se sembraron en un sustrato formado por una mezcla (1:1) de piedra pómez y materia orgánica (tierra de hoja) en charolas de plástico con tapas transparentes para mantener la humedad relativa. Las plantas permanecieron hasta 12 semanas en estas condiciones y posteriormente se transplantaron a contenedores individuales en donde se les quito la tapa y se mantuvieron en condiciones de invernadero. La sobrevivencia se evaluó de 28 a 40 semanas después de su establecimiento *ex vitro*.

En la figura 5 se muestra el procedimiento general que se utilizó para propagar *in vitro* a *C. senilis*.

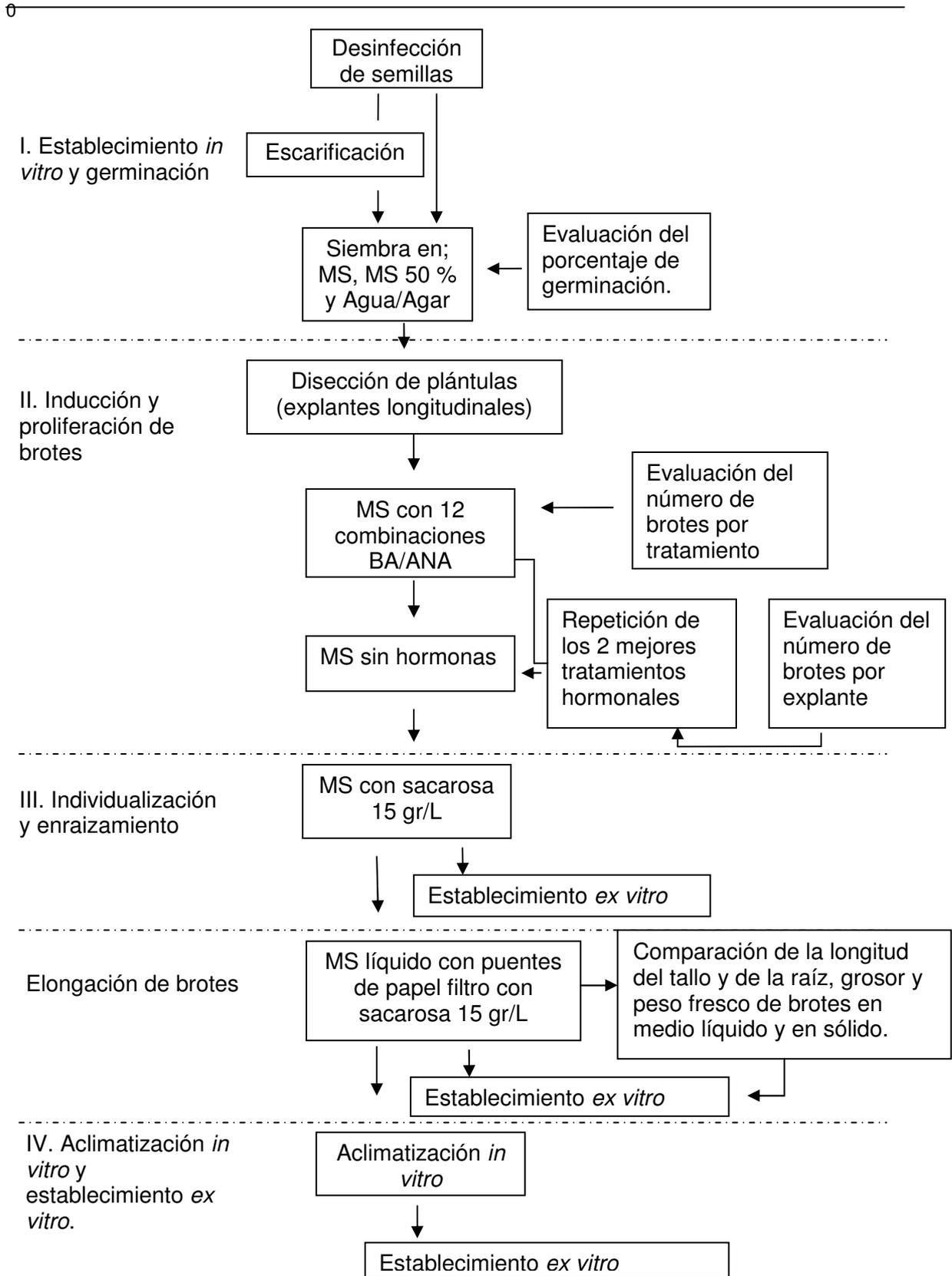


Figura 5.- Diagrama de flujo que muestra el procedimiento utilizado para la propagación *in vitro* y los diferentes ensayos realizados para el establecimiento *ex vitro* de *C. senilis*.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.- Germinación

De acuerdo a Bewley y Black (1994), el proceso de germinación involucra la reactivación del metabolismo de la semilla, que inicia con la imbibición y termina cuando emerge el eje embrionario, que usualmente es la radícula. Este es el único suceso evidente a simple vista. Por lo tanto se consideró como semilla germinada aquella cuya radícula había emergido. De acuerdo a la descripción de semillas de cactáceas que hacen Bregman y Bouman (1983), se sugiere que las semillas de *C. senilis* son del tipo operculado, con base en las observaciones realizadas la emergencia de la plántula ocurre de la siguiente manera: el crecimiento del embrión ocasiona dos fracturas en la testa; la primera, separa al opérculo del resto de la cubierta seminal (Lam 1 a) y la segunda ocurre a lo largo de la cresta dorsal de la semilla (Lam 1 b) de manera que, el paulatino crecimiento de la radícula empuja al opérculo y va extendiendo las fracturas, sin romper completamente la testa, hasta que la radícula emerge completamente (Lam 1 c y d), una vez en el exterior, empiezan a desarrollarse pelos radiculares de color blanco justo alrededor de su base (Lam 1 e y f). Simultáneamente al crecimiento y desarrollo de la radícula, el hipocótilo empieza a emerger y mantiene adosado a él al perispermo el cual se observa como una delgada membrana de color rojizo (Lam 1 d) cuando el hipocótilo ha emergido completamente la cubierta seminal continúa cubriendo a los cotiledones (Lam 1 g). Una vez que emerge la plántula completamente, los cotiledones permanecen en posición vertical y posteriormente se van abriendo hasta formar un ángulo de 45° aproximadamente dejando descubierto al meristemo apical, de donde se

0

forman diminutos tricomas que formarán las primeras cerdas del tallo de la plántula (Lam 1 h, i, j)

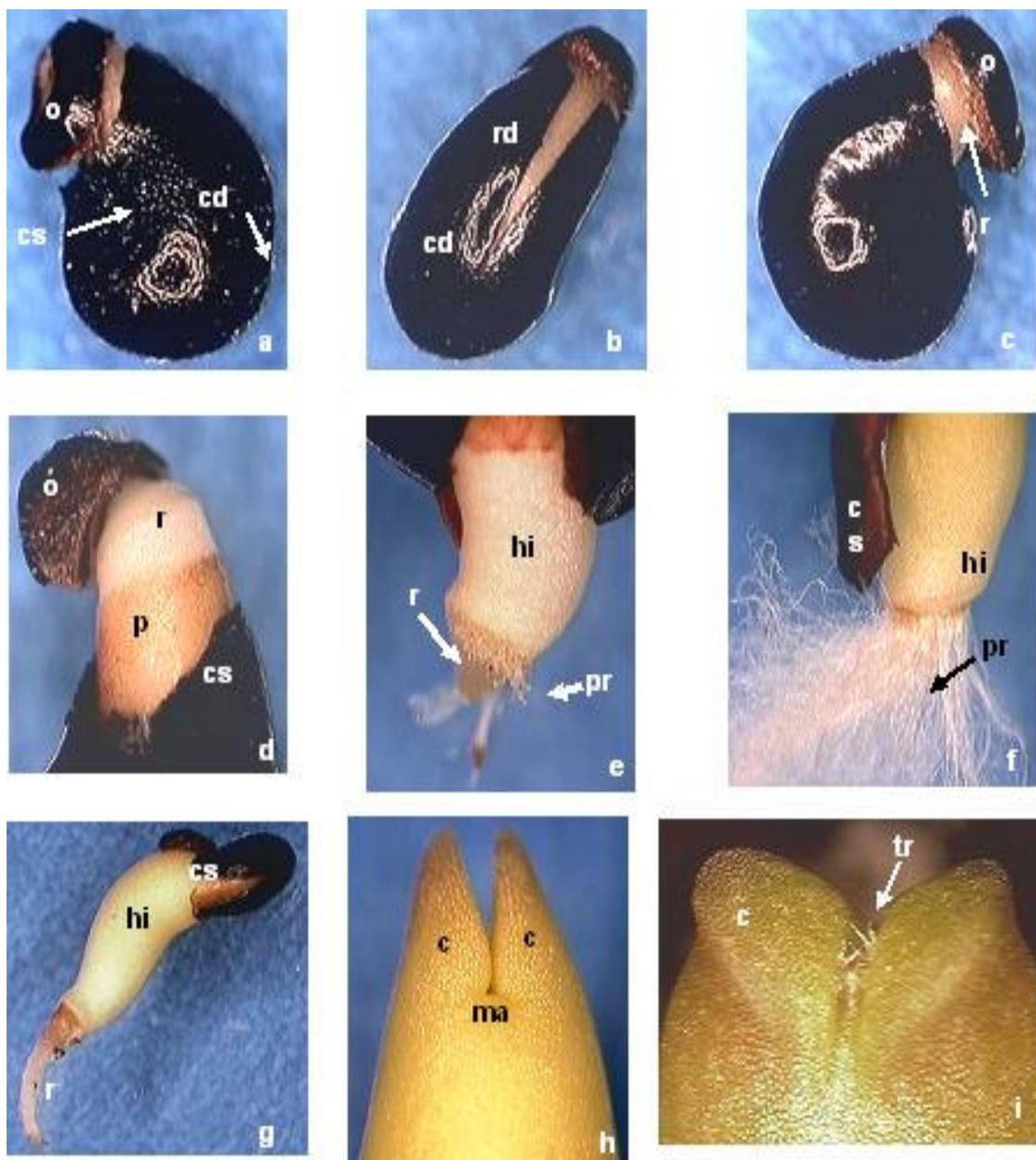


Lámina 1. a.- Opérculo separado del resto de la testa (5X). b.- Ruptura a lo largo de la cresta dorsal (6.6X). c.- Crecimiento de la radícula (6.6X). d.- Emergencia de la radícula y del hipocótilo que mantiene adosado al perispermo (5X). e.- Crecimiento de pelos radiculares (8.3X). f.- Elongación de la radícula y de los pelos radiculares (8.3X). g.- Plántula con la cubierta seminal cubriendo aún sus cotiledones (2.3X) h.- Cotiledones de una plántula después de emerger (13X). i.- Parte apical de una plántula, observar los tricomas formados a partir del meristemo apical (13X) j.- Plántula (2.3X).

Abreviaturas: c, cotiledón; cd, cresta dorsal; cs, cubierta seminal; hi, hipocótilo; ma, meristemo apical; o, opérculo; p, perispermo; pr, pelos radiculares; r, radícula; rd, ruptura dorsal; tr, tricomas.

Debido a que en todos los ensayos realizados no se presentó contaminación por agentes patógenos se considera que la técnica de desinfección fue exitosa.

En medio MS la germinación inició a los 15 días de la siembra en semillas sin escarificar (2%) y a los 20 días en las escarificadas (32%). Después de 45 días, se obtuvo el 98% de germinación en las semillas que no se escarificaron mientras que de las que se escarificaron germinó el 70%.

En medio MS 50%, la germinación inició a los 10 días (4%) y a los 15 días (2%) en semillas sin y con escarificación respectivamente. A los 25 días de la siembra se alcanzó el máximo porcentaje de germinación, registrándose el 22% para las semillas no escarificadas y el 4% para las que si se escarificaron.

En ambos medios se pudo observar que el proceso de escarificación redujo el porcentaje final de germinación, puesto que se obtuvieron los valores más bajos en comparación con las semillas no escarificadas (Tabla 3).

La escarificación se utiliza para romper la dormición de las semillas, la cual puede ser física, química, mecánica, morfológica o fisiológica (Nikolaeva, 1977). En cactáceas columnares se asume una dormición de tipo físico, puesto que la mayoría son polinizadas y dispersadas por murciélagos y en algunos casos es necesario que las semillas estén en contacto con los ácidos estomacales de estos mamíferos para que se desgaste la testa y se facilite la germinación (Álvarez-Aguirre y Montaña, 1997). Simulando estas condiciones en cultivo de tejidos se utiliza ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) para realizar la escarificación química aunque también se pueden utilizar ácido clorhídrico,

ácido nítrico, sosa y potasio, pero no se recomiendan debido a que son más peligrosos y menos efectivos (Nikolaeva, 1977).

Olguín (1994) realizó ensayos de germinación con *Ariocarpus retusus* aplicando un proceso de escarificación química a las semillas con ácido sulfúrico durante 30 segundos, observó que para esta especie la escarificación fue necesaria ya que las semillas que no se escarificaron no germinaron. Sin embargo para *C. senilis* la escarificación disminuyó el porcentaje final de germinación. Este resultado concuerda con los bajos porcentajes de germinación obtenidos por Rosas-López (2002) en *Polaskia chichipe* con semillas escarificadas químicamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HCl.

Santos-Díaz *et al.* (2003) mencionan que el bajo porcentaje de germinación *in vitro* puede ser debido a que el proceso de desinfección dañó al embrión, por latencia o porque las semillas no son viables.

En este trabajo es posible que el proceso de escarificación haya dañado al embrión, puesto que los porcentajes de germinación son bajos cuando esta se realiza, por lo tanto las semillas de *C. senilis* no requieren ser sometidas a un proceso previo de escarificación y el medio de cultivo más favorable para su germinación *in vitro* es el MS.

En agua con agar, las semillas que no fueron sometidas a la escarificación no germinaron, a diferencia de las escarificadas en donde se obtuvo el 6% a los 30 días (Tabla 3). Sin embargo los embriones no se desarrollaron en plántulas puesto que los cotiledones no lograron salir completamente de la testa, ocasionando que el hipocótilo adquiriera una forma globosa y se tornara a una coloración café-rojizo.

0

Tabla 3. Número de semillas de *C. senilis* germinadas *in vitro* y porcentaje acumulado de germinación en tres medios de cultivo con y sin escarificación química. Lecturas realizadas cada 5 días.

Días	MS		MS 50%		AGUA/AGAR	
	Número de semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)		Número de semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)		Número de semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
5	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)	0/50 (0)
10	0/50 (0)	0/50 (0)	<b>2/50 (4)</b>	0/50 (0)	0/50 (0)	<b>1/50 (2)</b>
15	<b>1/50 (2)</b>	0/50 (0)	4/50 (8)	<b>1/50 (2)</b>	0/50 (0)	1/50 (2)
20	7/50 (14)	<b>16/50 (32)</b>	10/50 (20)	1/50 (2)	0/50 (0)	2/50 (4)
25	28/50 (56)	28/50 (56)	11/50 (22)	2/50 (4)	0/50 (0)	2/50 (4)
30	45/50 (90)	32/50 (64)	11/50 (22)	2/50 (4)	0/50 (0)	3/50 (6)
35	47/50 (94)	34/50 (68)	11/50 (22)	2/50 (4)	0/50 (0)	3/50 (6)
40	48/50 (96)	34/50 (68)	11/50 (22)	2/50 (4)	0/50 (0)	3/50 (6)
45	49/50 (98)	35/50 (70)	11/50 (22)	2/50 (4)	0/50 (0)	3/50 (6)

En *C. senilis* el agua con agar no fue suficiente para obtener altos porcentajes de germinación, contrario a lo que se esperaría en un medio con alta disponibilidad de agua, sin embargo se sabe que en aquellas especies que presentan semillas fotoblásticas el proceso de imbibición por sí sólo no dispara al germinación, si no que el agua sensibiliza a la semilla para que esta pueda responder a otros factores como la luz o la temperatura.

En *Stenocereus griseus* la hidratación activa los sistemas enzimáticos preexistentes en la semilla, que de cierta manera hacen disponibles los solutos presentes en el sustrato, originando cambios tanto del potencial osmótico como del potencial de presión. De esta manera se ocasiona la ruptura de la testa para dar lugar a la emergencia de la radícula (Martínez-Holguín, 1983). En el caso de *C. senilis* es posible que el agua sensibilizó a la semilla para responder a la presencia de los solutos del medio MS (sales y sacarosa) que, al no estar presentes en el agua con agar, no se originó el cambio de los potenciales

osmótico y de presión, ocasionando que la testa no se abriera lo suficiente para permitir la emergencia de la radícula y el desarrollo de la plántula.

Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) mencionan haber obtenido aproximadamente el 50% de germinación *in vitro* de *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*, Giusti y colaboradores (2002) reportan el 23%, 46% y 69% de germinación en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora aselliformis* y *Escobaria mínima* respectivamente, todas sembradas en MS. Santos-Díaz *et al.* (2003) obtuvieron el 55% de germinación en *Pelecyphora aselliformis* en el medio MS al 50%.

Olgúin (1994) realizó ensayos de germinación de *Ariocarpus retusus* en donde evaluó el medio MS con sacarosa 30 g/L y el MS al 50% con sacarosa 15 g/L y 30 g/L. El máximo porcentaje de germinación fue de 66% en MS con sacarosa 30 g/L que corresponde al medio de cultivo con la mayor concentración de sales y de sacarosa. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, puesto que el porcentaje más alto de germinación también se obtuvo en el medio de cultivo MS. A diferencia de estos resultados Rosas-López (2002) evaluó el efecto de los medios de cultivo MS, MS 50% y agua con agar (adicionados con 10 g/L de agar bacteriológico) sobre la germinación de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* y obtuvo que el medio MS 50% fue el más favorable para la germinación y desarrollo de las plántulas en ambas especies.

Por lo tanto el comportamiento de la germinación al igual que las respuestas ante el cultivo *in vitro* son específicas para cada especie por lo que es necesario evaluar diferentes medios de cultivo y tratamientos de

escarificación con el fin de elevar los porcentajes de germinación para hacer más eficiente el sistema de micropropagación.

Fay y Gratton (1992) señalan que *in vitro* se obtienen altos porcentajes de germinación en comparación con los que se obtienen *ex vitro*, sin embargo con base en la información que se reporta sobre germinación *in vitro* de cactáceas, son necesarios más estudios sobre este tema, puesto que en la mayoría de los trabajos que se mencionaron anteriormente sólo se evalúa un medio de cultivo, ya sea agua con agar, MS o MS a la mitad de sus componentes.

Los porcentajes de germinación que se reportan para *C. senilis* en este trabajo, se obtuvieron con semillas de un fruto recolectado directamente en el año 2002, al intentar repetir los experimentos de germinación después de 12 semanas aproximadamente con las semillas del mismo fruto, estas ya no respondieron, lo mismo ocurrió con las semillas donadas por la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán en los años 2003 y 2004; finalmente, las semillas obtenidas de un fruto recolectado en 2005 germinaron después de un tratamiento de estratificación que consistió en colocar las semillas en agua a 60° C durante 5 minutos y transferirlas a agua a 40° C en donde permanecieron durante 24 horas, posteriormente se enjuagaron 3 veces y se sembraron en sustrato (piedra pómez con tierra de hoja 1:1) y en medio de cultivo MS.

Este hecho abre al posibilidad de que exista algún tipo de latencia originada por el almacenamiento de la semilla, ya que por ejemplo las semillas de *Stenocereus griseus* presentan una latencia química cuando son recién cosechadas y posteriormente pasan a una latencia fisiológica después de que se almacenan en seco (Martínez-Holguín, 1983).

En otros casos, como en el género *Opuntia* las semillas requieren de 3 años para madurar y germinar, antes, ningún tratamiento de escarificación o de estratificación permite la germinación (Mandujano *et al.*, 2005).

Es importante considerar que las plantas micropropagadas son genéticamente iguales a la plántula de la cual proviene el explante de donde se formaron y no tienen la finalidad de ser reintroducidas. La razón por la que se considera a la propagación *in vitro* una estrategia de conservación, es que las plantas obtenidas por esta vía sean las que se comercialicen y no las que provienen del hábitat natural, permitiendo así el restablecimiento de las poblaciones naturales y evitando la extracción de organismos adultos.

De acuerdo a Fay y Gratton (1992) cuando se propaga *in vitro* una especie con propósitos de conservación es muy importante mantener la diversidad genética, por lo que es preferible que los explantes provengan de plántulas germinadas *in vitro*. Se debe aclarar que la diversidad genética de una especie no está representada en las semillas de un fruto de un sólo organismo, y que para conservar realmente su diversidad genética tendrían que realizarse estudios sobre ecología y genética de las poblaciones, así como el establecimiento de métodos adecuados de muestreo para realizar la recolecta de los frutos, cuando se realizan trabajos sobre cultivo de tejidos, es frecuente enfrentarse con la limitante de la disponibilidad de material biológico (semillas) y sobre todo de aquellas especies que están en alguna categoría de riesgo.

## 2.- Respuestas morfogénéticas

### a) Formación de callo

Los explantes longitudinales después de 13 días en el medio de inducción desarrollaron callo hialino de color verde-blanquecino y semicompacto, de dos maneras: 1) a partir de la región del corte. Este callo con frecuencia presentó una coloración rojiza, debido a la oxidación

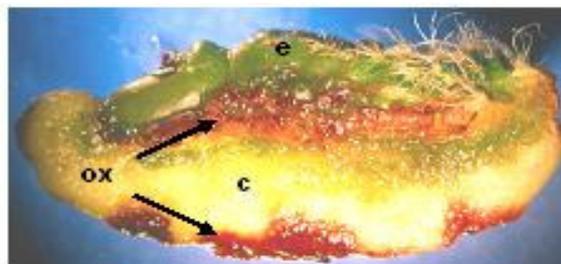


Figura 6. Formación de callo en la zona del corte en explantes longitudinales de *C. senilis* con BA/ANA 0.0.1 mg/L. ox, oxidación; c, callo; e, explante.

ocasionada por el corte y se presentó en todos los tratamientos (Figura 6). La formación de callo en la zona del corte del explante se ha reportado en otros trabajos en presencia de auxinas (Machado y Prioli, 1996; Baker y Marin, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002), de citocininas (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000; Castro-Gallo *et al.*, 2002), en combinación de ambas (Wakhlu y Bhau, 2000; Papafotiou *et al.*, 2001) e incluso en ausencia de hormonas (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000).

Conforme transcurrió el tiempo, proliferó en las combinaciones BA/ANA 1/0.1, 1/1, 2/0.01 y 2/0.1, de tal manera que invadió los bordes de los explantes hasta cubrirlos completamente, ocasionando que se adhirieran entre si y formaran una sola masa de tejido indiferenciado dentro del frasco (Figura 7) y puesto que en algunos tratamientos la formación de brotes y esta respuesta ocurrieron de manera simultánea, sólo eran visibles las cerdas de los brotes que se formaron pero ya no el tejido original del explante.

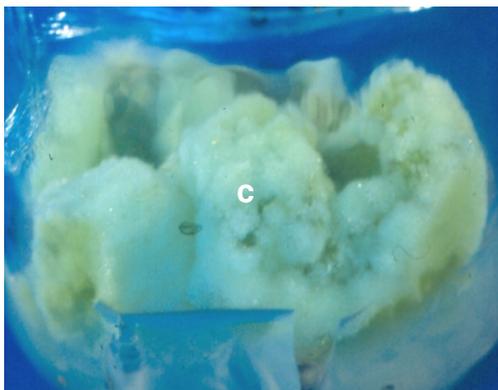


Figura 7. Callo formado a partir de explantes longitudinales de *C. senilis* después de 4 semanas en el medio de inducción con BA/ANA 1/1 mg/L. c, callo; ex. explante.

La proliferación de callo ocurrió en los tratamientos con ambas hormonas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Wakhlu y Bhau (2000) en un trabajo sobre *Coryphantha elephantidens* en donde la combinación de 2,4-D y kinetina, originó la formación de callo verde compacto, mientras

s que la auxina por si sola originó la formación de callo desmenuzable blanco traslúcido. En otro trabajo sobre *Mammillaria elongata* (Papafotiou *et al.*, 2001) la formación de callo ocurrió en concentraciones de BA desde 2.5 a 10 mg/L con ANA 0.2, 1 y 5 mg/L.

2) otra manera en la que se originó el callo

fue, sobre el explante en forma de estructuras redondeadas (Figura 8) ocurrió de manera aleatoria entre los tratamientos. Esta respuesta ya había sido observada por Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) en cultivos de *Aztekium ritteri*.

Algunas de las funciones *in vitro* de las auxinas son organizar meristemas a partir de tejido desorganizado, definir órganos, generalmente raíces y promover la diferenciación celular. Las citocininas tienen dos funciones principales estimular la división celular y activar las yemas laterales (Gaspar *et al.*, 1996).

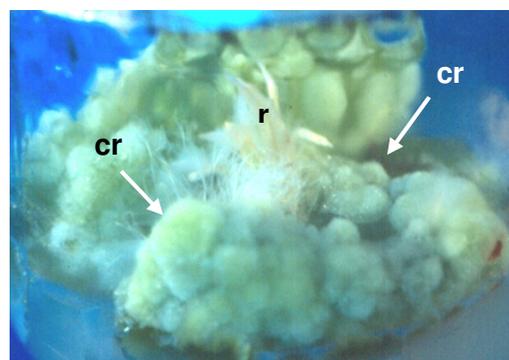


Figura 8. Formación de callo en estructuras redondeadas después de 4 semanas en el medio de inducción con BA/ANA 1/1 mg/L a partir de explantes longitudinales de *C. senilis*. r, raíz; cr, callo redondeado.

No obstante de que muchos aspectos del crecimiento, diferenciación celular y organogénesis en cultivo de tejidos esta controlada por la interacción de ambas hormonas, las auxinas pueden inhibir la acumulación de citocininas y estas a su vez pueden inhibir una o más funciones de las propias auxinas, por lo tanto en un cultivo *in vitro* debe haber un balance controlado de ambas hormonas de acuerdo con la respuesta morfogénica que se desea obtener (Gaspar *et al.*, 1996).

Haberer y Kieber (2002) mencionan que un balance de citocininas y auxinas mantiene a las células en estado indiferenciado, mientras que altas cantidades de citocininas en comparación con auxinas promueve la formación de brotes y altas concentraciones de auxinas promueve el desarrollo de raíces.

De acuerdo con lo anterior es probable que las concentraciones de auxinas y citocininas utilizadas en este trabajo en combinación con las endógenas del tejido, originaron un equilibrio entre ellas, con lo que se ocasionó la desdiferenciación del tejido y su proliferación.

## **b) Organogénesis**

### **1) Por activación areolar**

Después de 2 semanas en el medio de inducción se observó la formación de abundantes cerdas en las aréolas de los explantes del tratamiento 1/0.01mg/L y paulatinamente surgieron más y de manera asincrónica en los explantes de los demás tratamientos (Figura 9).



Figura 9. Formación asincrónica de cerdas a partir de las aréolas de *C. senilis* bajo cultivo *in vitro*.

Flores-León y Ortiz-Montiel (2000) también reportaron la formación de cerdas para esta especie a partir de las aréolas, pero en este caso después de 4 semanas en el medio de inducción con 0.1, 1 y 10 mg/L de BA.

Se observó que en los tratamientos BA/ANA 1/0, 1/0.01, 2/0.01 y 2/0.1 mg/L el desarrollo de los brotes inició a las 4 semanas de incubación (Figura 10) y en el resto de los tratamientos se presentó después de 8 semanas, este resultado coincide con el obtenido por Flores-León y Ortiz-Montiel (2000), en donde los primeros brotes de *C. senilis* se formaron también después de 8 semanas con BA 1 mg/L y de 6-7 semanas con 10 mg/L de dicha hormona.



Figura 10. Brotes de *C. senilis* regenerados por activación areolar en el tratamiento BA/ANA 2/0.01 después de 4 semanas en el medio de inducción.

En un estudio realizado por Pérez-Molphe-Balch y colaboradores (1998) sobre la micropropagación de 21 especies de cactáceas en donde incluyen a *C. senilis*, mencionan que el tiempo suficiente para promover la regeneración de brotes en el medio de inducción es de entre 8 y 12 semanas para las 21 cactáceas, pero no indican el que requirió esta especie en particular.

Por lo tanto es probable que el tiempo de inducción requerido para activar las aréolas de esta cactácea sea entre 4 y 8 semanas.

Es importante señalar que el tiempo de inducción es diferente para cada especie, así puede variar desde 1 mes como en *Coryphanta elephantides* (Wakhlu y Bhau, 2000) y *Astrophytum myriostigma* (Villavicencio-Gutierrez *et al.*, 1999), hasta 6 u 8 meses como en *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y

Rubluo, 1992), *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

Después de 36 semanas de cultivo se cuantificó el número total de brotes en cada tratamiento. El mayor número de brotes por explante se obtuvo en los tratamientos sin ANA, puesto que el promedio más alto fue de 6 y 7 brotes por explante en BA/ANA 1/0 y 2/0 mg/L respectivamente, dichos tratamientos corresponden a las concentraciones más altas de BA experimentadas (Tabla 4).

Tabla 4. Promedio de brotes por explante formados después de 36 semanas de cultivo *in vitro* de *C. senilis*.

Tratamientos BA/ANA	Número de explantes por tratamiento	Número de brotes por tratamiento	Promedio de brotes por explante
0/0	20	47	2
<b>1/0</b>	<b>16</b>	<b>94</b>	<b>6</b>
<b>2/0</b>	<b>12</b>	<b>83</b>	<b>7</b>
0/0.01	20	60	3
1/0.01	20	109	5
2/0.01	12	59	5
0/0.1	16	32	2
1/0.1	16	57	4
2/0.1	16	51	3
0/1	19	48	2
1/1	18	45	3
2/1	20	100	5
<b>Total</b>	<b>205</b>	<b>785</b>	

A diferencia de estos resultados Flores-León y Ortiz-Montiel (2000) obtuvieron como mejor respuesta la formación de 1.67 brotes por explante con BA 10 mg/L aunque reportaron problemas de hiperhidratación, mientras que Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) evaluaron únicamente la concentración hormonal BA/ANA 1/0.01 mg/L y obtuvieron 2.82 brotes por explante, estos resultados son probablemente el reflejo de la fuente de explantes utilizados en

cada trabajo ya que los explantes utilizados por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) y por Flores-León y Ortiz-Montiel (2000) provenían del tallo de plantas mayores de 3 años que habían sido recolectadas y mantenidas en condiciones de invernadero, mientras que en este trabajo los explantes provenían de plántulas germinadas *in vitro* de 3 meses de edad aproximadamente. Al respecto se sabe que los explantes provenientes de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que los tomados de plantas adultas o de yemas en reposo, a medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a utilizar, mejor será la respuesta *in vitro* (Jiménez-González, 1998b).

En otros trabajos también se han utilizado plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes, por ejemplo en un trabajo sobre cactáceas columnares (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) con este tipo de explantes la formación de brotes ocurrió después de 12 semanas en el medio de inducción en diferentes combinaciones de BA, ANA y 2ip. Siendo BA 1 mg/L la hormona que presentó el mejor resultado, ya que en *Carnegiea gigantea* se formaron 4.5 brotes de cada explante apical, en *Pachycereus pringlei* se formaron 3.8 brotes por explante y en *Stenocereus thurberi* se generaron 4.3; en las dos últimas especies los explantes transversales mostraron la mejor respuesta. En comparación con estas cactáceas columnares *C. senilis* presentó una tasa de proliferación mayor.

Aunque el promedio de brotes por explante que se obtuvo en este trabajo es aparentemente el más alto para *C. senilis*, en otras especies se han registrado porcentajes mayores, por ejemplo para *Stenocactus coptonogonus*, se reportaron 16.75 brotes por explante, para *Mammillaria sphaelata* 17.5

(Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998) y en *Thelocactus hexaedophorus* se formaron 13.6 brotes por explante (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

Sin embargo para otras especies se reporta una tasa de proliferación baja como *Nyctocereus serpentinus* y *Echinocereus pectinatus* con 2.15 y 3.86 brotes por explante respectivamente (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998) y *Coryphantha elephantidens* con 2.8 brotes por explante (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

Generalmente en la mayoría de los trabajos sobre propagación *in vitro* de cactáceas la hormona que exhibe la mejor respuesta es BA sola o en presencia de bajas concentraciones de ANA y salvo en algunos casos 2ip y kinetina. Además se utilizan explantes apicales, transversales o basales, pero hasta donde se sabe no hay trabajos donde hayan evaluado explantes longitudinales.

Esto reafirma el hecho de que cada especie tiene su propio potencial de respuesta al efecto de las hormonas exógenas.

Respecto a los tratamientos que se sometieron a la repetición, si bien los brotes se formaron durante el tiempo de inducción, fue posible observar un incremento en el número de ellos después de 8 semanas de ser transferidos al medio basal. Además el promedio de brotes por explante superó al obtenido en el primer barrido hormonal puesto que en este segundo experimento se obtuvieron 8 y 12 brotes por explante con 1 y 2 mg/L de BA respectivamente (Tabla 5).

De acuerdo a los resultados de una prueba Mann-Whitney no existen diferencias significativas entre el número de brotes obtenidos con 1 y 2 mg/L de BA ( $P > 0.05$ ).

Tabla 5. Promedio de brotes por explante de *C. senilis* obtenidos *in vitro* después de 12 semanas en el medio de inducción con BA 1 y 2 mg/L (Conteo 1) y 8 semanas después del subcultivo a MS (Conteo 2) en el experimento de la repetición de los mejores tratamientos.

BA/ANA mg/L	Explantos/ tratamiento	Conteo 1 Brotes/explante $x \pm DE$	Conteo 2 Brotes/explante $x \pm DE$
<b>1/0</b>	30	6.4 $\pm$ 3.85	7.83 $\pm$ 5.4
<b>2/0</b>	30	8.36 $\pm$ 5.35	11.9 $\pm$ 8.91

Con base a estos datos es probable que el número de brotes por explante que se forman está relacionado con la cantidad de explantes que se colocaron en cada frasco de cultivo, puesto que en los tratamientos que se repitieron, se colocó uno en cada frasco, mientras que en los tratamientos iniciales se colocaron de 3 a 4 explantes por frasco, de esta manera la disponibilidad de espacio, nutrientes y luz fueron algunos de los aspectos limitantes para el desarrollo de los brotes. Aunque no se tienen reportes sobre trabajos que apoyen esta idea.

Otra causa del incremento en el número de brotes puede deberse al tiempo que permanece el explante en el medio de inducción debido a que se promueve la activación de más aréolas o el tejido requiere de más tiempo para que las hormonas tengan un mayor efecto.

## 2) Por regeneración apical



Figura 11. Brote de *C. senilis* formado por regeneración apical con BA/ANA 0/1 mg/L. r, raíz; c, cicatrización.

Después de tres semanas en el medio de inducción en los tratamientos BA/ANA 0/0, 0/0.01, 0/0.1 y 0/1 mg/L se empezó a regenerar la parte apical. Esto consistió en que, en algunos explantes longitudinales que conservaron el meristemo apical, la zona del corte cicatrizó, de tal forma que la parte apical se elongó y la parte basal formó raíces dando lugar a una plántula (Figura 11). De manera general esta regeneración se presentó en los tratamientos con ANA en ausencia de BA. Sin embargo el porcentaje más alto de regeneración se obtuvo en el tratamiento control (sin hormonas), en el 65% de los explantes.

Por lo tanto es posible que esta respuesta se debiera al efecto de las hormonas endógenas, principalmente auxinas, ya que una de las funciones de este grupo de hormonas es reprimir el crecimiento de yemas laterales y estimular la dominancia apical (Davies, 1990; Gaspar *et al.*, 1996).

Después de 12 semanas los brotes formados por esta respuesta medían 20 mm de longitud aproximadamente y fue común observar en la base al menos otro brote secundario formado por la activación de las aréolas (Figura 12).



Figura 12. Formación de brotes secundarios (bs) de *C. senilis* por activación de las aréolas de la base de un brote obtenido por regeneración apical.

Esta respuesta ha sido observada en otras cactáceas columnares como *Carnegiea gigantea*, *Stenocereus thurberi* y *Pachycereus pringlei* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) y en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

### 3) Rizogénesis

La formación de raíces adventicias ocurrió en los tratamientos BA/ANA 0/0, 0/0.1, 0/1, 1/1 y 2/1, emergieron a partir

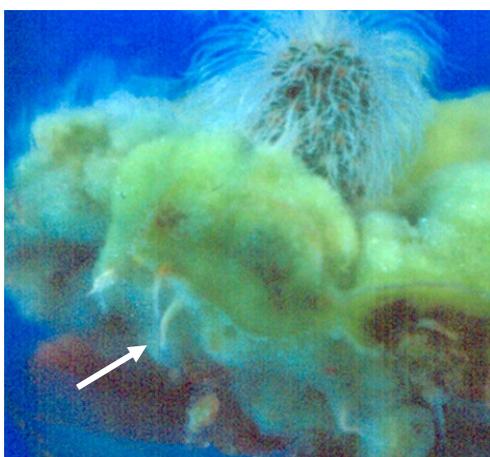


Figura 13. Rizogénesis a partir de callo de *C. senilis* en el tratamiento BA/ANA 1/1 mg/L después de 8 semanas en el medio de inducción.

del callo (Figura 13) y en algunos casos directamente a partir de las aréolas del explante (Figura 14) se desarrollaron tanto inmersas como por fuera del medio de cultivo, y presentaron abundantes pelos absorbentes de color blanco. Esta respuesta no mostró algún patrón para su

desarrollo, sin embargo se presentó en la mayoría de los tratamientos con ANA. Al igual que la regeneración apical, la rizogénesis fue una respuesta del efecto de las auxinas (Gaspar *et al.*, 1996; Pospíšilová, 2003).

Por lo tanto la formación de callo, la organogénesis por activación de aréolas y por regeneración apical así como la



Figura 14. Rizogénesis directa a partir de un explante longitudinal de *C. senilis* en BA/ANA 0/1 mg/L después de 4 semanas en el medio de inducción.

formación de raíces adventicias, son las respuestas morfogénéticas que se originaron durante la permanencia de los explantes en el medio de inducción.

### 3.- Enraizamiento de los brotes regenerados

Un total de 479 brotes de aproximadamente 10 mm de longitud procedentes de los diferentes tratamientos hormonales, se individualizaron y se colocaron en medio MS adicionado con 15 g/L de sacarosa. Después de tres semanas el 82% de los brotes presentaron al menos una raíz de 5 mm de longitud. Doce semanas después, el porcentaje aumentó sólo el 4%, por lo que fue necesario transferir los brotes que no formaron raíces a MS adicionado con 0.5 mg/L de AIB. Después de 16 semanas sólo el 13% de los brotes restantes había enraizado.

Las raíces fueron de color blanco y generalmente emergieron de un lado de la base del tallo y con poca frecuencia de la parte central (Figura 15).

En otras especies de cactáceas también se reporta la generación de raíces de manera espontánea sin la adición de hormonas, como

en *Coryphantha elephantidens* con un 100 % de eficiencia (Wakhlu y Bhau, 2000), el 95% en *C. senilis* utilizando medio MS con el doble de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y modificando la temperatura e intensidad luminosa (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000) y en *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* obtuvieron el 84 a 92 % de

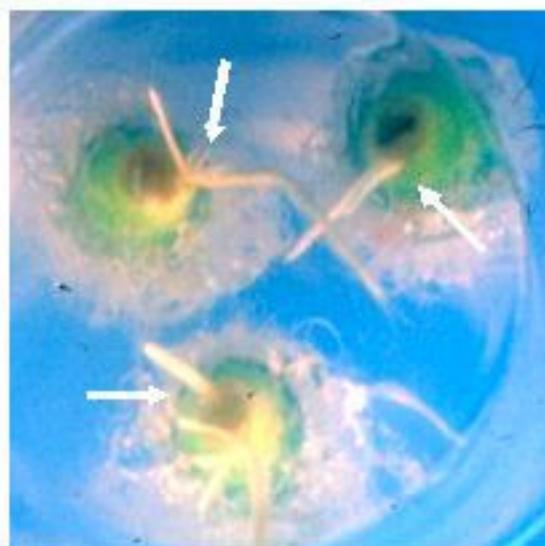


Figura 15. Formación espontánea de raíces en brotes de *C. senilis* regenerados *in vitro* después de 2 semanas de ser individualizados y transferidos a medio MS adicionado con sacarosa 15 gr/L.

éxito (Giusti *et al.*, 2002). Pérez-Molphe-Balch y colaboradores (1998) reportaron el 100% de enraizamiento de *C. senilis* en medio MS adicionado con 0.5 mg/L de AIA.

#### 4.- Elongación de los brotes

Después de 16 semanas de cultivo, los brotes individualizados y enraizados que permanecieron en el medio sin agar (Figura 16) mostraron en promedio una longitud del tallo mayor (24.9 mm) en comparación con los que permanecieron en el medio sólido (19.2 mm) mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Respecto al grosor del tallo, a la longitud de la raíz y al peso fresco de los brotes no se observaron diferencias significativas entre ambos medios de cultivo ( $P > 0.05$ ).

Las plantas se establecieron en sustrato para estimar su sobrevivencia *ex vitro*



Figura 16. Brotes de *C. senilis* regenerados *in vitro* colocados en medio MS líquido con puentes de papel filtro. pf, puentes de papel filtro, MS-I, medio MS líquido.

y después de 20 semanas, sólo sobrevivieron el 40% de las provenientes de medio sólido y el 70% de las procedentes del medio líquido.

Se ha comprobado que el crecimiento en cactáceas puede ser acelerado durante su cultivo *in vitro*. Malda *et al.* (1999b) sugieren que además de los reguladores del crecimiento que se adicionan al medio de cultivo durante la etapa de inducción de brotes, la humedad de los

contenedores y la constante fijación de  $\text{CO}_2$  tanto de día como de noche, son los factores que favorecen el crecimiento *in vitro* de las plantas con metabolismo tipo CAM.

Aunque no se tiene el reporte de trabajos previos sobre el uso de medios líquidos en cactáceas, si se ha observado la reducción del crecimiento *in vitro* por la utilización de agar en *Ranunculus* (Beruto *et al.*, 1999a).

El agar es uno de los agentes gelificantes más utilizados en cultivo de tejidos, para la elaboración de medios sólidos y semisólidos (George y Sherrington, 1984) sin embargo su uso puede disminuir la disponibilidad de agua y de minerales (Beruto *et al.*, 1999b).

Majada y colaboradores (2000) mencionan que los brotes hiperhidratados (este término se refiere al crecimiento anormal que las plantas pueden presentar en condiciones *in vitro* debido al exceso de agua en los tejidos originado por el tipo de contenedor, el explante, el medio de cultivo utilizado etc.) de *Dianthus* sp. (clavel) fueron 1.8 veces mas gruesos que los normales y que su diámetro estuvo en función del tamaño y número de células y que el incremento en el tamaño de las plantas se debió a la presencia de los grandes espacios intercelulares, la alta hidratación y expansión celular sin división.

Las plantas de *C. senilis* que crecieron en el medio líquido no mostraron apariencia de hiperhidratación de acuerdo a las características morfológicas que mencionan Debergh *et al.* (1992), sin embargo este efecto no sólo es evidente en la morfología de las plantas, si no también hay alteraciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas. En este trabajo el medio sin agar sólo favoreció uno de los cuatro parámetros morfológicos del crecimiento evaluados, la elongación de los brotes, por lo tanto es necesario realizar estudios más detallados para poder utilizar el medio de cultivo líquido asegurando un

desarrollo anatómico y fisiológico de las plantas que les permitan sobrevivir en condiciones *ex vitro*.

### 5.- Aclimatización *in vitro* y evaluación de la sobrevivencia *ex vitro*

De los lotes de brotes regenerados y enraizados que se mantuvieron durante cuatro y cinco meses en los contenedores con tapa perforada para someterlos a una fase de aclimatización *in vitro*, se obtuvo el 53 y 56% de sobrevivencia *ex vitro* respectivamente.

Aquellos brotes regenerados y enraizados que permanecieron cuatro y siete meses en la etapa de elongación y posteriormente se establecieron en condiciones *ex vitro* presentaron el 16 y 45% de sobrevivencia respectivamente.

Finalmente de los brotes que permanecieron durante 11 meses en el medio de enraizamiento y que se establecieron *ex vitro* sin pasar por una etapa de elongación ni de aclimatización *in vitro* sobrevivieron el 50% de ellos (Tabla 6).

Tabla 6.- Porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de los brotes enraizados de *C. senilis*.

	Etapa previa al establecimiento <i>ex vitro</i>				
	Enraizamiento	Elongación		Aclimatización <i>in vitro</i>	
Tiempo de permanencia (en meses)	11	4	7	4	5
Porcentaje de sobrevivencia <i>ex vitro</i> .	50	16	45	53	56

También se debe considerar que independientemente del tratamiento *in vitro* del que provengan los brotes, el manejo que reciban después y durante su aclimatización *ex vitro* es determinante en la sobrevivencia y en el éxito del



Figura 17. Brotes de *C. senilis* regenerados *in vitro* después de 12 semanas de haber sido establecidos *ex vitro*.

sistema de micropropagación, por esta razón durante las primeras 12 semanas después del establecimiento en sustrato los brotes se mantuvieron en contenedores cubiertos con tapas transparentes, para mantener humedad y permitir el paso de la luz (Figura 17).

Después de 10 meses de evaluación se observó que los porcentajes más altos de sobrevivencia se obtuvieron al utilizar la etapa de aclimatización *in vitro*, (56 y 53%) y la menor sobrevivencia se registró en los brotes que se establecieron *ex vitro* después de la etapa de elongación (16 y 45 %) Después de 7 meses de su establecimiento *ex vitro* de los brotes que siguieron la vía convencional de micropropagación solo sobrevivió la mitad, este porcentaje es similar al que se obtuvo con los contenedores ventilados (Figura 18).

Con base en los resultados se derivan tres conclusiones, la primera es que la etapa de aclimatización *in vitro* favorece la sobrevivencia,



Figura 18. Brotes de *C. senilis* regenerados *in vitro* de (a) 7 y (b) 10 meses de aclimatización *ex vitro*.

la segunda es que no es recomendable establecer *ex vitro* los brotes de *C. senilis* inmediatamente después de su permanencia en medio líquido sin una etapa de aclimatización y la tercera es que para la micropropagación de *C. senilis* se recomienda utilizar el método convencional sin las etapas de elongación y aclimatización *in vitro* puesto que los porcentajes de sobrevivencia obtenidos son similares al utilizar dichas etapas, se ahorra tiempo, insumos y no existe el riesgo de contaminar el material biológico a causa de la manipulación que involucran los subcultivos.

Se observó que las raíces que se formaron *in vitro* se secaron y se desprendieron del tallo para dar lugar a nuevas raíces. Se considera que en las plantas propagadas *in vitro* la sobrevivencia está dada por la formación de nuevos órganos, generalmente hojas y/o raíces, puesto que el desarrollo de las hojas repercute en el aumento del aparato fotosintético de la planta (Kadleček *et al.*, 2001). De manera general los porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* obtenidos en este trabajo son bajos comparados con los que Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) y Flores-León y Ortiz-Montiel (2000) han reportado para *C. senilis* puesto que obtuvieron entre 70-85% y 100% respectivamente.

En otras cactáceas cultivadas *in vitro* también se han reportado altos porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* como en *Cereus peruvianus* 70% (Oliveira *et al.*, 1995), 100% (Machado y Prioli, 1996) y en *Epithelantha micromeris* 84% (Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001), en *Mammillaria elongata* de 90 al 100% (Papafotiou *et al.*, 2001), en *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* se obtuvo el 86% (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002), en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* 88% (Pérez-

Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002) y en *Selenicereus megalanthus* 90% (Pelah *et al.*, 2002) por mencionar algunos.

Es importante mencionar que son pocos los trabajos que indican el tiempo de evaluación de la sobrevivencia y la cantidad de plantas que establecieron *ex vitro* lo cual dificulta la comparación de los resultados publicados con los obtenidos con *C. senilis*.

Los bajos porcentajes de sobrevivencia se deben a que durante el cultivo *in vitro* se altera la morfología, anatomía y fisiología de las plantas, por lo cual, necesitan un periodo de aclimatización, en el que se toman en cuenta factores ambientales como: la temperatura, la humedad relativa, el flujo de aire, el contenido de CO<sub>2</sub>, la intensidad luminosa, el contenido de carbono en forma de sacarosa y la cantidad de reguladores de crecimiento (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Existen trabajos en donde se evalúa la eficacia de utilizar contenedores ventilados durante el proceso de micropropagación, de una forma similar a la que se utilizó en *C. senilis*, con la finalidad de inducir cambios graduales en las plantas que les permitan sobrevivir a las condiciones ambientales fuera del contenedor de cultivo, por ejemplo:

Murphy y colaboradores (1998) utilizaron contenedores sellados con tapas que tenían aperturas de 78.5 mm<sup>2</sup> y 353 mm<sup>2</sup> de diámetro, las cuales cubrieron con papel filtro Whatman No. 1. Utilizaron estos contenedores para cultivar plantas de *Delphinium* y *Hosta*. Obtuvieron que el crecimiento, la proliferación de brotes y sobrevivencia de *Delphinium* incrementó en los contenedores con las aperturas pequeñas, y en *Hosta* el crecimiento estuvo ligeramente reducido por las aperturas de mayor tamaño. Cuantificaron la

humedad relativa y resultó ser de casi el 100% en contenedores con y sin ventilación.

Concluyeron que las plantas con ventilación controlaron mejor la pérdida de agua, ya que el intercambio de gases promovió el funcionamiento de los estomas y por lo tanto la transpiración y el movimiento de agua, y posiblemente de nutrimentos.

A estas conclusiones las refuerza el trabajo de Santamaría *et al.* (2000) en el que demostraron que la humedad relativa no se modifica en los contenedores ventilados y que en estos se mejora la regulación estomática, el crecimiento y sobrevivencia de *Delphinium* sp. por el incremento en el flujo de agua dentro de la planta.

En trabajos como el de Malda y colaboradores (1999a) evaluaron el efecto de los contenedores con y sin ventilación sobre el crecimiento de brotes de *Coryphantha minima* y obtuvieron que fue menor en los contenedores con ventilación.

Majada y colaboradores (2000) también evaluaron el efecto de contenedores que permitían diferentes niveles de ventilación para un cultivo de *Dianthus caryophyllus* (Caryophyllaceae) sobre el grosor de la cutícula, el número de vasos conductores secundarios, el contenido de celulosa, en la morfología de los estomas y en el desarrollo del xilema y el floema y obtuvieron diferencias entre las plantas que crecieron en contenedores con ventilación y sin ésta, favoreciendo a los brotes que crecieron en los contenedores con el nivel más alto de ventilación. Por lo tanto con este sistema obtuvieron una mejor calidad de plantas, aunque durante la etapa de inducción de brotes disminuyó la tasa de proliferación.

De acuerdo a los trabajos mencionados anteriormente, el utilizar contenedores ventilados afecta de alguna manera el desarrollo *in vitro* de las plantas tanto en su morfología como en la fisiología, al grado que favorece la sobrevivencia *ex vitro*. Lo anterior también se observó con *C. senilis* al obtener los porcentajes de sobrevivencia más altos en los tratamientos que incluyeron la etapa de aclimatización *in vitro* utilizando contenedores ventilados.

Respecto a la sacarosa, en el trabajo de Malda *et al.* (1999a) también evaluaron el efecto de diferentes concentraciones (0, 0.5, 1.5, 3.0 y 4.5%) sobre el crecimiento de *C. minima* y encontraron que 3% fue la concentración que permitió un incremento en volumen y ganancia en peso fresco mayor, mientras que la ausencia ocasionó la muerte de las plantas y el exceso un crecimiento menor. Encontraron que en esta cactácea, la sacarosa no indujo el crecimiento fotomixotrófico como en las plantas C-3, si no que por el contrario pareció estimular la captura de CO<sub>2</sub>.

En *C. senilis* desde la etapa de enraizamiento se disminuyó la sacarosa a 15 gr/L y más aún durante la etapa de aclimatización *in vitro*, puesto que se redujo a un cuarto de su concentración normal para el medio MS, es muy probable que los bajos porcentajes de sobrevivencia que se obtuvieron de manera general se haya debido a la reducción de sacarosa, sin embargo al respecto Pospíšilová *et al.* (1999) mencionan que la sacarosa disminuye considerablemente el potencial hídrico del medio de cultivo y al momento de transferir las plantas a sustrato, éste tendrá un potencial mayor y ocasionará que las plantas se marchiten rápidamente por la pérdida de agua, por lo tanto sería recomendable disminuir la cantidad en las últimas etapas del cultivo *in vitro*; también mencionan que en ausencia de sacarosa, las plantas son

capaces de desarrollar un aparato fotosintético funcional, pero requieren un aumento en la concentración de bióxido de carbono y de intensidad luminosa. En *C. senilis* no se realizó ninguna compensación ante la reducción de sacarosa por lo que se atribuye como otra causa de la baja sobrevivencia *ex vitro*.

En cuanto al uso del medio líquido se sabe que el agar disminuye la disponibilidad de nutrimentos y de agua, sin embargo el utilizar medio líquido sin un periodo de aclimatización ocasionó un bajo porcentaje de sobrevivencia, posiblemente no resistieron el cambio de un ambiente con alta humedad relativa a uno con menos humedad. Es muy importante mencionar que una vez *ex vitro* las plantas fueron muy susceptibles a los cambios ambientales, puesto que el tallo se engrosaba y/o adelgazaba, por lo que es necesario que las condiciones ambientales del lugar donde permanecen los primeros días después de su establecimiento *ex vitro* se mantengan lo más constantes posible.

Finalmente al comparar la longitud de los brotes, tomando en cuenta el tiempo total de cultivo a partir de la etapa de inducción y después de la evaluación de la sobrevivencia *ex vitro* se observa que no existen diferencias significativas entre la longitud de los brotes regenerados a pesar de que permanecieron diferentes tiempos en las distintas etapas de la micropropagación, igualmente no se encontraron diferencias significativas al comparar la longitud de los brotes de acuerdo al tratamiento hormonal en el que se formaron ( $P > 0.05$ . en ambos casos).

## VII. CONCLUSIONES

- El proceso de desinfección utilizado permitió establecer en condiciones totalmente asépticas las semillas de *C. senilis*.
- El medio MS completo fue el adecuado para promover la germinación *in vitro* de *C. senilis*.
- La escarificación química con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) disminuyó el porcentaje de germinación, por lo que no se recomienda utilizarla.
- El callo se originó en los tratamientos con BA y con ANA pero su crecimiento fue mayor en presencia de ambas hormonas.
- El mayor número de brotes por explante se obtuvo con 1 y 2 mg/L de BA en ausencia de ANA.
- La formación de brotes pareció estar relacionada con el tiempo que permanece el tejido en el medio de inducción y con el espacio disponible de cada explante dentro del contenedor de cultivo.
- El ANA estimuló la regeneración apical de los explantes de *C. senilis* después de 3 semanas en el medio con hormonas, sin embargo, al parecer las auxinas endógenas desempeñaron un papel importante en esta respuesta puesto que el porcentaje más alto de regeneración apical se obtuvo sin hormonas exógenas.
- La formación de raíces adventicias en los explantes fue una respuesta morfogénica que no estuvo relacionada con la presencia de alguna hormona, por lo que su desarrollo se atribuye al efecto de las auxinas endógenas.

- Los brotes regenerados formaron raíces sin la necesidad de agregar hormonas al medio de cultivo.
- El uso de medio de cultivo líquido incrementó la longitud del tallo sin ocasionar hiperhidratación aparentemente, sin embargo se necesitan más estudios morfológicos y fisiológicos para saber si realmente favorece la sobrevivencia.
- El usar contenedores ventilados y reducir la cantidad de nutrimentos en el medio de cultivo favoreció la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*.
- Es posible la sobrevivencia de los brotes regenerados de *C. senilis* sin que pasen por medios líquidos o por alguna etapa de aclimatización *in vitro*.
- Es necesario realizar estudios morfológicos, anatómicos, y fisiológicos del material biológico bajo cultivo *in vitro* a lo largo del proceso de micropropagación, para conocer su comportamiento y regular las variables necesarias que permitan obtener mejores resultados.

## LITERATURA CITADA

- Agramonte-Peñalver, D., F. Jiménez-Terry y M. A. Dita-Rodríguez.** 1998. Aclimatización. En: Pérez-Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 193-206.
- Álvarez-Aguirre M. G. y C. Montaña.** 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacan: Implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana* 40:43-58.
- Arias, S., U. Guzmán, M. Mandujano, M. Soto-Galván y J. Golubav.** 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50(4):100-125.
- Baker, W. P. y L. E. Marin.** 1998. Successful cloning of the "saguaro" (*Carnegiea gigantea*, Cactaceae). *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 31(2):97-100.
- Beruto, M., P. Curir y P. Debergh.** 1999a. Influence of agar on *in vitro* cultures: II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In Vitro Cell Development Biology-Plant* 35:94-101.
- Beruto, M., D. Beruto y P. Debergh.** 1999b. Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. *In Vitro Cell Development Biology* 35:86-93.
- Bewley, D. J. y M. Black.** 1994. Seeds Physiology of development and germination. Plenum Press. Nueva York. 445p.

- Bravo-Hollis, H.** 1978. Las cactáceas de México. UNAM. México. 743p.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar.** 1999. El interesante mundo de las cactáceas. UNAM. Mexico. 548 p.
- Bregman, R. y F. Bouman.** 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 86:357-378.
- Castro-Gallo, I. A., E. Meza-Rangel, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch.** 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4 (2):5-23.
- Chacón-Hernández, G.** 1984. Ecología de las poblaciones de *Cephalocereus senilis*. Tesis: Licenciatura, Biólogo. FES-Iztacala UNAM. México. 54 p.
- Challenger, A.** 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO. México. 847p.
- Collin, H. A. y G. S. Edwards.** 1998. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157p.
- CONANP-Dirección General de Manejo para la Conservación.** 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. CONANP. México. 202p.
- Davies, P. J.** 1990. The plant hormones. Their nature, occurrence, and functions. En: Davies, P. J. (ed.) Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer Academic Publisher. 1-11pp.
- Dávila-Aranda, P., S. Arias-Montes, R. Lira-Saade, J. L. Villaseñor y A. Valiente-Banuet.** 2002. Phytogeography of the Columnar Cacti (Tribe Pachycereeae) in Mexico: A Cladistic Approach. En: Fleming, T. H. y A. Valiente-Banuet. (eds.) Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology and Conservation. The University of Arizona Press. 25-41pp.

**Debergh, P., J. Aiken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R.**

**Zimmerman y M. Ziv.** 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30:135-140.

**Evans, N. E.** 1990. Micropropagation. En : Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.) *Methods in Molecular Biology*, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 93-102 pp.

**Fay, M. F. y J. Gratton.** 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.

**Flores-León, R. y G. Ortiz-Montiel.** 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia* 7: 92-96.

**Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe.** 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology* 32:272-289.

**George, E. F. y P. D. Sherrington.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Limited. Inglaterra. 690p.

**Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci.** 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 1790: 1-14.

**Gratton, J. y M. F. Fay.** 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. En: Pollard J. W. y J. M. Walker. (eds.) *Methods in*

Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press.  
New Jersey. 219-225pp.

**Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila.** 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas.  
UNAM-CONABIO. México. 315p.

**Haberer, G. y J. J. Kieber.** 2002. Cytokinins. New insights into a classic  
phytohormone. *Plant Physiology* 128:354-362.

**Hernández, H. M. y H. Godínez.** 1994. Contribución al conocimiento de las  
cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.

**Jiménez-González, E.** 1998a. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez-  
Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por  
Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-  
24pp.

**Jiménez-González, E.** 1998b. Cultivo de Ápices y Meristemos. En: Pérez-  
Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por  
Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 45-  
56pp.

**Kadleček, P., I. Tichá, D. Haisel, V. Čapková y C. Schäfer.** 2001. Importance  
of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant  
Science* 161:695-701.

**Kalilian-Fakhrai, H. y F. Fakhrai.** 1990. Hormonal control of growth and  
development. En: Pollard J. W. y J. M. Walker. (eds.) Methods in  
Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press.  
New Jersey. 49-56pp.

**Liu, Q., M. Liu, T. J. Mabry y R. A. Dixon.** 1994. Flavonol glycosides from  
*Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry* 36(1):229-231.

- 0
- Machado, M. F. P. S. y A. J. Prioli.** 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cell Development Biology* 32:199-203.
- Majada, J. P., F. Tadeo, M. A. Fal y R. Sanchez-Tamés.** 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63:207-214.
- Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus.** 1999a. *In vitro* culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.
- Malda, G., R. A. Backhaus y C. Martin.** 1999b. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58:1-9.
- Mandujano, M. C., C. Montaña y M. Rojas-Aréchiga.** 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* 62 (1):15-21.
- Martínez-Holguín, E.** 1983. Germinación de semillas de *Stenocereus griseus* (Haw) Buxbaum (Pitayo de Mayo). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 28(3):51-57.
- Murashige, T. y F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Murphy, K. P., J. M. Santamaría, W. J. Davies y P. J. Lumsden.** 1998. Ventilation of cultura vessels. I. Increased growth *in vitro* and survival

*ex vitro* of *Delphinium*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73(6):725-729.

**Nava-Esparza, V. C. y L. Yáñez.** 1984a. Estudio de dos poblaciones de *Cephalocereus senilis* en la Barranca de Metztitlán, Hgo. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 28:3-7.

**Nava-Esparza, V. C. y L. Yáñez.** 1984b. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 29:3-7.

**Nikolaeva, M. G.** 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. En: Khan, A. A. (ed.) *Physiology and Biochemistry the seed dormancy and germination*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Holanda. 50-73pp.

**Olguín-Santos, L. P.** 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis Licenciatura, Biólogo. Facultad de Ciencias-UNAM. México. 85p.

**Oliveira, S. A., M. F. P. S. Machado, A. J. Prioli y C. A. Mangolin.** 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Society for In Vitro Biology* 31:47-50.

**Orellana-Pérez, P. A.** 1998. Introducción a la propagación masiva En: Pérez-Ponce J. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 125-133pp.

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

- Pare, P. W., N. Dmitrieva y T. J. Mabry.** 1991. Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspensión culture. *Phytochemistry* 30(4): 1133-1135.
- Pelah, D., R. A. Kaushik, Y. Mizrahi y Y. Sitrit.** 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71:81-84.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. Morones-Ruíz y H. J. Lizalde-Viramontes.** 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Development Biology* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E. y C. A. Dávila-Figueroa.** 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador.** 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *HortScience* 37(4):693-696.
- Pérez-Ponce, J. N.** 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: Pérez-Ponce J. N. (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 297-324pp.
- Poder Ejecutivo-Secretaria de Gobernación.** 2002. Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de los Códigos Penal Federal y Federal de Procedimientos Penales. Diario Oficial de la Federación. México D. F. Primera sección. 2-6pp.

**Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzánková.** 1999.

Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions.  
*Biologia Plantarum* 42(4):481-497pp.

**Pospíšilová, J.** 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum* 46(4):491-506.

**PROFEPA-Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.** Delegación Hidalgo. 2004. Oficio PFPA.DH.-1541/04. Pachuca Hidalgo. 5 de octubre de 2004.

**Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo.** 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeher). *Cactus and Succulent Journal* 64:116-119.

**Rosas-López, U. Y.** 2002. Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis: Licenciatura, Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

**Rubluo, A.** 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En Y. P. S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. Berlin. 40:193-205.

**Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán.** 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95:341-349.

**Rzedowski, J.** 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) *Diversidad*

biológica de México: Orígenes y Distribución. Instituto de Biología, UNAM. 129-145pp.

- Santamaría, J. M., K. P. Murphy, C. Leifert y P. J. Lumsden.** 2000. Ventilation of culture vessels. II. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO<sub>2</sub> is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75(3):320-327.
- Santos-Díaz, M., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. Santos-Díaz.** 2003. *In vitro* organogénesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 39:480-484.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.** 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de Especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.** 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de Especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 6 marzo: 1-85pp.
- Toledo, V. M. y M. Ordóñez.** 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitat terrestres. En: Ramamoorthy T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) *Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución*. Instituto de Biología-UNAM. México. 739-757pp.

- Velásquez-Enciso, L. E. y R. Soltero-Quintana.** 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46(3):56-62.
- Villaseñor, J. L.** 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia* 28(3):1-9.
- Villavicencio-Gutiérrez, E. E., A. Villegas-Monter, G. Arellano-Ostoa y J. Vargas-Hernández.** 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44(2):56-62.
- Villavicencio-Nieto, M. A., B. E. Pérez-Escandón y A. Ramírez-Aguirre.** 1998. Lista florística del estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 147p.
- Vovides, A. P., V. Luna y G. Medina.** 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana* 39:1-42.
- Wakhlu A. K. y B. S. Bhau.** 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cell Development Biology* 36:211-214.

## **ANEXO 1. Descripción botánica de *Cephalocereus senilis***

De acuerdo a Bravo-Hollis (1978). Plantas de 6 a 10 y aún 15 m de altura, columnares, simples o rara vez con algunas ramificaciones, al principio color verde claro, después grisáceo. *Costillas* numerosas, 12 a 15 al principio, después 30 o más, poco prominentes, redondeadas, surcos angostos. *Aréolas* próximas, grandes, circulares, ligeramente prominentes, provistas cuando jóvenes de 20 a 30 cerdas blancas, de 12 a 30 cm de largo o más, que en las plantas viejas casi desaparecen. *Espinas* 1 a 5, amarillas, en las aréolas jóvenes de 1 a 2 cm de largo y en las viejas como de 5 cm. Cefalio semi-periférico y lateral, en el ápice de los tallos, con abundante lana color beige claro y espinas setosas de 4 a 6 cm de largo. *Flores* nocturnas, de 5 a 9 cm de largo y como 6 cm de ancho, parcialmente ocultas en el cefalio, de color rosa claro; podarios del pericarpelo algo numerosos, con escamas muy pequeñas que llevan algunos pelos sedosos largos; tubo receptacular con podarios escasos y escamas muy pequeñas con pelos cortos; segmentos del perianto cortos y algo carnosos, color rosa; ovario amplio con óvulos numerosos insertos en funículos ramificados; cavidad nectarial amplia, cerrada parcialmente por la curvatura de la base de los estambres primarios: estilo grueso; lóbulos del estigma cortos. *Fruto* ovoide, de 3 cm de largo y 2 a 2.5 cm de ancho, provisto de escamas distantes, diminutas, que llevan algo de lana, color rosa claro cuando fresco, después, ya seco, adquiere una coloración moreno obscura, está capitado por la base seca del perianto que queda adherida como una cúpula más clara, a veces conservando todo el perianto seco. *Semillas* muy numerosas, en forma de gorro-casco, de 2.5 mm de largo y 2 mm de ancho, testa negra, brillante con ornamentación celular y con puntuaciones.

## **ANEXO 2. Sanción legal por la sobrerrecolecta de individuos de flora o fauna silvestre**

De acuerdo al artículo 420 del Código Penal Federal publicado por el Poder Ejecutivo-Secretaría de Gobernación (2002) a través del Diario Oficial “se impondrá pena de uno a nueve años de prisión y por el equivalente de trescientos a tres mil días multa, a quien ilícitamente (en la fracción cuarta) realice cualquier actividad con fines de tráfico, o capture, posea, transporte, acopie, introduzca al país o extraiga del mismo, algún ejemplar, sus productos o subproductos y demás recursos genéticos, de una especie de flora o fauna silvestres, terrestres o acuáticas en veda, considerada endémica, amenazada, en peligro de extinción, sujeta a protección especial o regulada por algún tratado internacional del que México sea parte”. Además indica que “se aplicará una pena adicional hasta de tres años más de prisión y hasta mil días multa adicionales, cuando las conductas descritas en el presente artículo se realicen en o afecten un área natural protegida, o cuando se realicen con fines comerciales”

**ANEXO 3. Formulación de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MS 50%**

	MS	MS 50%
	g/L	g/L
<b>Macronutrientes</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	0.825
KNO <sub>3</sub>	1.90	0.95
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.37	0.185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	0.085
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.44	0.22
<b>Micronutrientes</b>		
KI	0.00083	0.000415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.0031
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.01689	0.00845
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.0086	0.0043
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.000125
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.0000125
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.0000125
<b>Solución de Hierro-EDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	0.01865
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.0139
<b>Vitaminas</b>		
Ácido nicotínico	0.0005	0.00025
Piridoxina-HCl (B6)	0.0005	0.00025
Tiamina-HCl (B <sub>1</sub> )	0.0001	0.00005
<b>Aminoácidos</b>		
Inositol	0.10	0.05
Glicina	0.002	0.001
<b>Sacarosa</b>	<b>30</b>	<b>15</b>