



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Echinocactus grusonii* HILD.,
(CACTACEAE), ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.**

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

DIRECTOR: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

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

AGRADECIMIENTOS

- ≈ Al proyecto "CONAFOR-2003-C03:09951-Propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas y/o en peligro de extinción del Estado de Coahuila" por la beca recibida para la realización de este proyecto.
- ≈ Al Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH por proporcionarme las facilidades para hacer uso de las instalaciones para la realización del proyecto.
- ≈ Al Dr. Salvador Arias por la donación de semillas de la colección del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.
- ≈ A Dios por darme vida, salud, una familia y permitirme finalizar un proyecto y avanzar hacia nuevos horizontes...
- ≈ A mi familia (Soledad, Carlos, Sergio, Ángeles, Carlos) por ser el motor de mi vida, por brindarme su apoyo, confianza y por estar siempre conmigo. Los amo!!.
- ≈ A mi hermana Ángeles, por ser mi amiga y confidente, y por su aportación a este proyecto...
- ≈ A la gran familia González por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, durante mi preparación profesional e inigualables reuniones sabatinas.
- ≈ A mis amigos y compañeros de Licenciatura: Marlene, Ayde y Fermín por el apoyo, compañía, impulso, largas pláticas y aventuras vividas a lo largo de la carrera. Gracias amigos los quiero mucho!!!...
- ≈ A Miriam y Su-Lin por su amistad, apoyo en este trabajo y gratos momentos dentro del laboratorio...
- ≈ Al Biol. Daniela Soria Campos por sus comentarios y aportaciones a este trabajo... Gracias.
- ≈ A todos mis compañeros del Laboratorio de Morfofisiología Vegetal (Miriam, Su-Lin, Nely, Claudia L., Brenda, Daniela, Alejandra, Claudia, Dulce, Gil y Beto) por su compañía y buenos momentos.
- ≈ A todos los profesores que formaron parte importante durante mi preparación y en la culminación de esta gran profesión.
- ≈ A los profesores: Dra. Ana Laura López Escamilla, M. en C. Leticia Romero Bautista, Dra. Maritza López Herrera, Dr. Otilio Acevedo Sandoval, M. en C. Manuel González Ledesma, Dr. Numa Pavón Hernández y Dr. Arturo Silva Montellano, por sus correcciones y tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.
- ≈ A la doctora Ana Laura López-Escamilla por dirigir y asesorar este proyecto, por su confianza, apoyo, esfuerzo, conocimientos y tiempo otorgado a mi persona y a este proyecto. Gracias!! Por eso es La doctor@!..

DEDICATORIA

A MI FAMILIA, EN ESPECIAL A MI MADRE **MARÍA SOLEDAD GONZÁLEZ VALDIVIA** POR EL INMENZO APOYO A LO LARGO DE MI VIDA Y PREPARACIÓN PROESIONAL, POR LA CONFIANZA PUESTA EN MI, POR LA LIBERTAD PARA DIRIGIR MI VIDA, POR EXISTIR, POR EL AMOR QUE ME DAS, POR DARMER LA VIDA Y SER EL MOTOR DE ELLA... **TE AMO MAMÁ!**

A **VICTOR HUGO MONTIEL A.** POR TU APOYO, CONFIANZA, COMPAÑÍA Y AMOR...
TIMO!!

En memoria:

† **Guadalupe Valdivia Escalante**

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| 2, 4-D | Ácido 2, 4- diclorofenoxiacético |
| 2iP | N ⁶ - 2, isopentenil adenina |
| AIA | Ácido indolacético |
| AIB | Ácido indol butírico |
| ANA | Ácido α naftalenacético |
| BA ó BAP | N ⁶ benciladenina o Becilaminopurina |
| CAM | Metabolismo Ácido de las Crasuláceas por sus siglas en inglés |
| CITES | Convention on Internacional Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre) |
| CTV | Cultivo de Tejidos Vegetales |
| IUCN | International Union Conservation of Nature (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) |
| K | Kinetina |
| MS | Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962 |
| NOM | Norma Oficial Mexicana-059-ECOL-2001, SEMARNAT, 2002 |
| RCV | Reguladores de Crecimiento Vegetal |
| Z | Zeatina |

RESUMEN

Echinocactus grusonii especie endémica de México en la región de Zimapán, Hidalgo, se encuentra en seria amenaza de desaparecer debido a su sobrecolecta y comercialización internacional por su gran valor ornamental.

Explantos longitudinales de *Echinocactus grusonii* se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con tres diferentes citocininas, N⁶ benciladenina (BA), N⁶-2, isopentenil adenina (2iP) y kinetina (K) a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 mg/l) y un tratamiento control. Los explantes en medio suplementado con BA presentaron la mayor producción de brotes, seguidos por 2iP y K. Sin embargo, los tratamientos de BA obtuvieron cerca del 50% de brotes con alguna anomalía. Se estableció que la concentración y la citocinina más adecuada fue 2iP 3 mg/l, al obtener 280 brotes en total y 3.11 brotes por explante. Los brotes obtenidos se enraizaron en medio MS basal (sin reguladores de crecimiento), observando el desarrollo de raíces después de 15 días. Los brotes enraizados se aclimatizaron por dos vías: 1) Aclimatización previa *in vitro* y 2) Aclimatización directa a sustrato (aclimatización *ex vitro*). La aclimatización *ex vitro* fue más efectiva para el desarrollo y crecimiento en diámetro y altura de los brotes. Sin embargo, los brotes que primero pasaron por una fase de aclimatización previa *in vitro* obtuvieron mayor porcentaje de sobrevivencia que aquellos en el tratamiento de sustrato.

Finalmente se logró realizar la micropropagación de ***E. grusonii*** y se establecieron los brotes obtenidos *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

ÍNDICE

| | PAG. |
|---|------|
| ABREVIATURAS | iv |
| RESUMEN | v |
| ÍNDICE | vi |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 2 |
| 1. Generalidades de cactáceas | 2 |
| 2. Problemas de conservación | 3 |
| 3. Propagación convencional | 6 |
| 4. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como estrategia de conservación | 7 |
| 4.1 Reguladores de crecimiento Vegetal (RCV) | 9 |
| 4.2 Respuestas morfogénicas | 11 |
| 4.3 Micropropagación | 13 |
| 4.4 Cultivo de tejidos en cactáceas | 16 |
| 5. Género <i>Echinocactus</i> | 18 |
| 5.1 <i>Echinocactus grusonii</i> | 19 |
| 5.2 Uso y problemática | 20 |
| 5.3 Cultivo de tejidos en <i>E. grusonii</i> | 23 |
| | |
| III. JUSTIFICACIÓN | 24 |
| IV. OBJETIVOS | 25 |
| 1. Objetivo general | 25 |
| 2. Objetivos particulares | 25 |
| | |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 1. Escarificación y desinfección de semillas | 26 |
| 2. Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> | 26 |
| 3. Obtención de explantes | 26 |
| 4. Siembra de explantes | 27 |
| 5. Análisis estadístico | 27 |
| 6. Individualización y enraizamiento de brotes | 28 |
| 7. Aclimatización | 28 |
| 7.1 Aclimatización previa <i>in vitro</i> | 28 |
| 7.2 Aclimatización directa a sustrato (<i>ex vitro</i>) | 29 |
| 8. Condiciones de incubación | 29 |
| 9. Condiciones de invernadero | 29 |

| | PAG. |
|---|-------------|
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 1. Germinación <i>in vitro</i> | 31 |
| a. Plántulas en agua con agar | 33 |
| b. Plántulas en MS 100% | 33 |
| c. Plántulas en MS 50% | 34 |
| 2. Siembra de explantes | 34 |
| 3. Respuestas morfogénicas | 35 |
| 3.1 Organogénesis directa por activación areolar | 35 |
| 3.2 Regeneración apical | 37 |
| 3.3 Rizogénesis | 39 |
| 4. Hiperhidratación | 40 |
| 5. Proliferación de brotes | 42 |
| 5.1 Tratamientos con BA | 42 |
| 5.2 Tratamientos con Kinetina | 45 |
| 5.3 Tratamientos con 2iP | 47 |
| 6. Individualización y enraizamiento de brotes | 51 |
| 7. Aclimatización | 52 |
| 8. Supervivencia | 57 |
| | |
| VII. CONCLUSIONES | 61 |
| | |
| VIII. ANEXOS | 66 |
| | |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 68 |

I. INTRODUCCIÓN

Las zonas áridas y semiáridas de la República Mexicana, se encuentran habitadas en gran parte por la familia Cactaceae, la cual actualmente en México está compuesta por 74 géneros y 946 especies, teniendo aproximadamente 239 subespecies, con un nivel de endemismo del 82.6% (Villaseñor, 2003). Sin embargo, se ha presentado la desaparición de muchas cactáceas debido a su distribución restringida, destrucción o fragmentación de sus poblaciones y ambientes naturales, así como a la excesiva colecta de ejemplares por coleccionistas y cactófilos, que buscan estas extraordinarias plantas por su gran valor comercial (Becerra, 2000). Por lo que algunos de los integrantes de esta gran familia (285 especies) se incluyen dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) (SEMARNAT, 2002).

Echinocactus grusonii, cactácea endémica de México está en la categoría de peligro de extinción "P", según la NOM debido principalmente a la sobrecolecta y destrucción de su hábitat; por lo anterior es necesario desarrollar estrategias para su conservación. Las Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), son una opción viable de conservación *ex situ* y se han venido trabajando desde la década de los setentas y en la actualidad con ellas se han logrado resultados favorables.

Los trabajos reportados sobre la propagación *in vitro* de *E. grusonii* son pocos y en algunos de ellos no se llegó al establecimiento *ex vitro* e incluso no se logró la micropropagación. Por lo que en el presente trabajo se aplicó la metodología desarrollada por Rosas-López (2002) y Saby *et al.* (2004) para el establecimiento y propagación *in vitro* de *Echinocactus platyacanthus*, para determinar si miembros del mismo género pueden responder de manera similar ante las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento, al emplear y evaluar tres reguladores de crecimiento pertenecientes al grupo de las citocininas (BA, K y 2iP), en la obtención de regenerantes para lograr la micropropagación de *E. grusonii*.

II. ANTECEDENTES

1. Generalidades de cactáceas

Las cactáceas son plantas que han desarrollado adaptaciones, las cuales les permiten enfrentar las adversas condiciones climáticas de las zonas áridas y semiáridas donde cerca del 70% de los cactus se distribuyen; siendo los elementos dominantes de la vegetación (Becerra, 2000).

A lo largo de su evolución y adaptación a las condiciones climáticas, las cactáceas transformaron su morfología y fisiología, perdieron sus hojas (excepto Pereskioideae) mostrando grandes modificaciones de estas en forma de espinas, las cuales al igual que los pelos refrigerantes ayudan a desalentar a los herbívoros, además de ayudar a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares. Los cactus presentan varios tipos de tallos suculentos (globoso o columnar, grandes o pequeños), que les permite almacenar y conservar grandes cantidades de agua, con el gran desarrollo de los parénquimas responsables de la succulencia y con la existencia de una cutícula gruesa impermeable se evita la pérdida de agua por evapotranspiración. Sus flores son pequeñas o grandes, de diversos colores y sus raíces largas, ramificadas y superficiales les ayudan en la captación de agua en las ocasionales lluvias o de la condensación de la humedad atmosférica que ocurre por las noches. Presentan un metabolismo conocido como Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM por sus siglas en inglés); realizan los procesos fotosintéticos durante la noche cuando la temperatura es menor, evitando así la desecación (Bravo-Hollis, 1978; Cházaro *et al.*, 2001; Anderson, 2001; Landrum, 2002, Hernández, 2006).

Por todas estas características las cactáceas son un grupo de plantas con un gran valor ornamental, haciendo de ellas hoy en día, las plantas más codiciadas del planeta (Becerra, 2000).

Las cactáceas endémicas de América, se encuentran principalmente en zonas áridas y semiáridas; se distribuyen desde Peace River en el norte de Canadá, a 59º de Latitud Norte, hasta la Patagonia en Argentina, a 52º de Latitud

Sur (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Esta gran familia se ha adaptado a los diversos tipos de vegetación excepto a la acuática; alcanzando su máximo desarrollo en los matorrales xerófilos (Fitz y Anderson, 1997), donde las condiciones de aridez son más o menos extremas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

Hernández y Godínez (1994) reportan que México concentra dentro de su territorio 48 géneros y 563 especies de cactáceas, presentando un elevado endemismo a nivel genérico y específico (73 y 78% respectivamente). Recientemente, Villaseñor (2003) reportó que ésta familia mundialmente registra alrededor de 100 géneros de los cuales 74 se presentan en México, por lo que del total de especies, del 50 al 70% se localizan en nuestro país (946 de 1,500 especies a nivel mundial), además de tener 239 variedades o subespecies. La familia Cactaceae es la quinta familia con el mayor número de especies nativas en la flora de México, con un endemismo del 82.6%. Las principales regiones desérticas donde este grupo se distribuye en México son: Desierto Chihuahuense (subregion principal, meridional y este), Desierto Sonorense y Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Fitz y Anderson, 1997; Hernández, 2006).

2. Problemas de conservación

La problemática de la protección y conservación de las cactáceas es muy compleja, ya que la mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida; o son especies recientemente descubiertas por la ciencia, por lo que se conoce muy poco de su biología. Aunado a esto, la cactofilia se ha convertido en una seria amenaza para la familia; el saqueo indiscriminado de especies cada vez se hace más intenso, lo que aumenta la vulnerabilidad de las especies y el riesgo de extinción.

Las grandes amenazas en las poblaciones de plantas generalmente se dan por cambio de uso del suelo con fines urbanos o agrícolas. Fitz y Anderson (1997) señalan como ejemplo a *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *A. agavoides* cuyos hábitats (San Luís Potosí y Tula Tamaulipas respectivamente) se han visto amenazados por la conversión de la tierra a uso agrícola y por la expansión de un

tiradero municipal. Otro ejemplo es la construcción de una autopista que abarca desde la ciudad de México hasta Oaxaca y atraviesa por el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), con la que se destruyó parte del hábitat de algunas suculentas (*Cephalocereus columna trajani*, *Agave titanota* y *Fouquieria purpussi*). Así mismo las cactáceas se ven amenazadas por los problemas que acompañan al desarrollo económico tales como la contaminación industrial, residencial, vehicular, la desviación del agua natural y la erosión del suelo (Fitz y Anderson, 1997).

Recientemente Pulido (2006) integrante de la Sociedad Mexicana de Cactología, AC, denunció la destrucción de una extensa zona de cactáceas endémicas oaxaqueñas en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, encontrando la pérdida de grandes cantidades de cactáceas columnares y globosas (p.ej. *Mammillaria huitzilopochtli*), debido a la introducción de maquinaria pesada y dinamita, eliminando peñascos completos, tan sólo por la ampliación de la carretera que va desde San Juan Bautista Cuicatlán a la población de Concepción Pápalo. Dejando ver la falta de respeto de las autoridades y constructores hacia los ecosistemas protegidos.

Hernández y Godínez (1994) señalan que en México hay zonas donde se encuentran un gran número de cactáceas amenazadas, entre ellas el Desierto Chihuahuense y la zona Árida Queretano-Hidalguense, particularmente en los estados de Coahuila con 29 especies amenazadas, San Luís Potosí con 26 spp, Tamaulipas con 25 spp, Nuevo León con 24 spp, Querétaro con 20 spp e Hidalgo con 18 spp amenazadas. Esto quizá debido al continuo empleo de las cactáceas ya sea como alimento, medicinal, forraje, combustible, construcción, ornamental, entre otros, lo cual dará como resultado la declinación dramática de la densidad poblacional de estas especies (Fitz y Anderson, 1997).

Colecta y comercio legal e ilegal

El uso de las cactáceas como plantas de ornato se debe a la gran rareza y particular belleza que presentan los miembros de esta familia. Esto por el hecho de que las cactáceas se hibridizan fácilmente, lo cual ha introducido una gran

variabilidad morfológica (Domínguez y Domínguez, 1976), y pese a esta ventaja, se ha generado para el grupo una gran demanda de propagación, importación y comercio de especies de manera legal e ilegal.

Benítez y Dávila (2002) señalan que el saqueo de plantas y semillas en cactáceas, está principalmente encaminado a satisfacer la demanda del mercado internacional especialmente de Estados Unidos, Japón y varios países europeos. Challenger (1998) reportó que tan sólo de los ecosistemas áridos del norte de México, por año se extraen 100,000 ejemplares que son enviados a Estados Unidos. También comenta que en 1989, se exportaron a este país 75,183 cactus vivos, de los cuales 35,000 eran especies consideradas en peligro de extinción, raras o sobreexplotadas (Fisher y Campbell, 1990, citados por Challenger, 1998). No obstante entre 1990 y 1991, la aduana de México evitó la exportación ilegal de 700,000 cactus, confiscando 30,000 de ellos en tan sólo un día (Aridjis, 1991, citado por Challenger, 1998). Becerra (2000), menciona que compradores japoneses en el año 1994 pagaron precios muy elevados por cactus como *Geohintonia mexicana* o *Aztekium hintonii*, al ofrecer 2,000 dólares por tan sólo un ejemplar.

Andrew (2002) señaló que cerca del 38% de las 1,500 cactáceas conocidas en la actualidad se encuentran amenazadas, principalmente por la sobreexplotación; además menciona que el mercado internacional de plantas ornamentales es desarrollado a partir de plantas propagadas, exportando México más de 50,000 cactáceas anualmente; aunque la mayoría de ellas son colectadas en su medio natural y exportadas ilegalmente. En 1997 Fitz y Anderson reportaron que *Astrophytum asterias* y *Mammillaria herrerae* son un ejemplo de la sobrecolecta a la que son sometidas las especies de esta familia, donde en las poblaciones rurales locales se realiza la venta de plantas a los extranjeros, extrayéndolas en cantidades excesivas, sin destinar parte de las ganancias a su conservación, propagación o restauración en su ambiente natural.

Por si fuera poco con el avance de la tecnología la venta de cactáceas también se realiza vía internet; como lo explican Benítez y Dávila (2002), que

durante una investigación por esta vía realizada por la autoridad científica mexicana, se encontró la existencia de 19 proveedores internacionales provenientes de 8 países, los cuales realizaban la venta de al menos 531 especies de cactáceas mexicanas pertenecientes a géneros como: *Acanthocereus*, *Acharagma*, *Ancistrocactus*, *Aporocactus*, *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Carnegiea*, *Cephalocereus*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epiphyllum*, *Ferocactus*, *Leuchtenbergia*, *Lophophora*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Opuntia*, *Pachycereus*, *Pereskia*, *Polaskia*, *Rhipsalis*, *Stenocereus* y *Turbinicarpus*, entre otros.

En la actualidad en el comercio internacional de cactáceas México ocupa el quinto lugar, ya que de las 329 especies de cactus encontrados tan solo en el Desierto Chihuahuense, más de 300 son comercializadas legalmente fuera del país, principalmente en Estados Unidos, el Reino Unido, Alemania y Suecia. Mientras que México sólo comercializa el 27.7% de las especies encontradas en esta región (Bárceñas, 2006).

3. Propagación convencional

Por el creciente deterioro del que han venido siendo objeto las cactáceas (extracción ilegal, uso irracional, destrucción de su hábitat, enfermedades y depredación, entre otros), surge la necesidad de crear estrategias enfocadas a la conservación, protección y recuperación de estas especies.

Una estrategia es la propagación convencional, *vía sexual* (semilla): la cual implica la recombinación genética proporcionando variabilidad fenotípica. Para algunas cactáceas este método es poco satisfactorio ya que presentan una baja producción de semillas, además de que cierto porcentaje pueden no ser viables; y *vía asexual*: en la cual no existe la recombinación genética existiendo la desventaja de perder la diversidad genética. Este tipo de propagación puede ser mediante esquejes, vástagos e injertos. El método de esquejes es útil en nopales, órganos y epífitas, y el de vástagos es muy común en plantas globosas que forman clones, como *Mammillaria*, *Coryphantha*, *Notocactus*, etc. En ambos

casos la propagación se realiza fragmentando las plantas (esquejes) o separando los brotes (vástagos), dejando que cicatricen para posteriormente sembrarse.

En el caso de los injertos esta técnica se emplea para acelerar el crecimiento de las especies y salvar plantas que han perdido su sistema radicular; primero se toma la planta patrón y se corta transversalmente su tallo. La planta a injertar se corta transversalmente por la parte inferior y esta última se coloca sobre el cilindro central de la planta patrón presionando ligeramente, de manera que el mucílago de ambos los pegue (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Sin embargo, cabe mencionar que la propagación de cactáceas por medio de estas técnicas convencionales presenta desventajas al requerir de labores intensivas de trabajo y al obtener una productividad limitada, muchas veces controlada por la época o estación (Collin y Edwards, 1998). Aunado a esto, la conservación de las cactáceas se ve limitada por factores como un crecimiento extremadamente lento, baja capacidad de recuperación de las poblaciones naturales, deficiencia en los sistemas de multiplicación por semilla en su ambiente natural y su susceptibilidad a la depedración (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Becerra, 2000).

Además de que en etapas tempranas del desarrollo es necesario el cobijo de una planta nodriza que les proporcione sombra, atenuando la radiación solar contribuyendo a su establecimiento y reduciendo la mortalidad (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Peters y Martorell, 1999). Por lo anterior una estrategia importante y necesaria para la conservación de cactáceas, es lograr la reproducción de especies de manera segura, mediante el uso del Cultivo de Tejidos Vegetales.

4. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como estrategia de conservación

Inicialmente las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales se desarrollaron como un medio rápido y exitoso para propagar asexualmente especies de interés hortícola, agrícola, forestal (Collin y Edwards, 1998) o especies con fines ornamentales como las orquídeas (Mauseth, 1977), sin embargo, en la actualidad se emplea para una gran cantidad de especies ya sea para su comercio, conservación o investigación.

El CTV permite el establecimiento, regeneración y desarrollo de cualquier parte de una planta a partir de una simple célula hasta un órgano completo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999), ya sea de ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen, cultivando el tejido en condiciones asépticas, controladas y en medios nutritivos adecuados (Evans, 1990; Merino, 1991; Doods y Roberts, 1995; Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

En el siglo XIX, Haberlandt (1902) cultivó células aisladas de plantas y postuló el principio de la "Totipotencialidad celular", donde a cualquier célula si se le provee de las condiciones nutricionales adecuadas es capaz de regenerar una planta completa (Brown y Charlwood, 1990; Doods y Roberts, 1995); siendo esto la base teórica de los métodos y técnicas de cultivo actuales (Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). En el proceso de regeneración se ven implicados factores genéticos, fisiológicos y bioquímicos; además de requerimientos nutritivos como sales orgánicas ya sean macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento principalmente auxinas y citocininas. En las técnicas del cultivo de tejidos se han empleado diversos medios de cultivo para la propagación de muchas especies, siendo algunos de ellos el medio Knudson C, White, Vacyntz Went, Murashige y Skoog, entre otros (Starling y Dodds, 1983).

Este último, fue formulado en 1962 por Murashige y Skoog y con el cual fue posible establecer el cultivo y obtener un rápido crecimiento de células de Tabaco (*Nicotina tabacum*) (Murashige y Skoog, 1962). Este medio es conocido como "MS" (por las iniciales de los investigadores) y consiste en una solución de sales minerales (alta concentración de nitrógeno), vitaminas, fuente de carbono, y hormonas (Murashige y Skoog, 1962; Starling y Dodds, 1983; Merino, 1991; Debergh *et al.*, 1994). Estos nutrientes minerales son los esenciales que permiten el crecimiento y desarrollo de una planta *in vivo* y por lo tanto cumple con las características apropiadas para que en él se germinen y cultiven una gran

cantidad de tejidos de diferente especies (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Anicua y Rivas, 2000).

En la actualidad el medio MS es el más usado y se le atribuye un gran potencial para soportar todas las fases de la organogénesis en algunas cactáceas (Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979). Para el CTV es importante la fuente de material vegetal o explante a utilizar (Collin y Edwards, 1998). Un explante es todo aquel órgano, tejido o segmento (semilla, embrión, hoja, tallo, cotiledón, raíz u órgano reproductor), que es utilizado para el inicio del cultivo (Chávez, 1997, citado por Anicua y Rivas, 2000; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

4.1. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)

Un elemento importante en el CTV son los “Reguladores de Crecimiento Vegetal”, estos se definen como compuestos sintéticos que actúan como hormona vegetal natural. Las hormonas vegetales son un grupo de compuestos orgánicos vegetales naturales, que actúan en pequeñas cantidades y que estimulan, inhiben o modifican diversos procesos fisiológicos de las plantas (Hill, 1977; Davies, 1990; Gaspar *et al.*, 1996).

Existen 5 clases de hormonas vegetales reconocidas: Auxinas, Ácido abscísico, Citocininas, Etileno y Giberelinas (Gaspar *et al.*, 1996). Los reguladores de crecimiento más usados en el CTV son las Auxinas y las Citocininas (Hu y Wang, 1983; Brown y Charlwood, 1990; Fakhrai y Fakhrai, 1990; Gratton y Fay, 1990; Stepan-Sarkissian, 1990; Barba, 1991a).

Auxinas

Las auxinas principalmente estimulan el alargamiento celular y el crecimiento en espesor de los tallos, la diferenciación de las raíces (rizogénesis) (Olguín, 1994), la diferenciación del tejido vascular (xilema y floema), el desarrollo de las partes florales, retardan la senescencia de las hojas y suprimen el crecimiento de las yemas laterales (Bidwell, 1990). Sin embargo, cuando se combinan con citocininas estimulan la división celular (Davies, 1990). Se sintetizan y localizan principalmente en los meristemas apicales y se transportan generalmente hacia su base (transporte basipétalo) (Bidwell, 1990; Olguín, 1994). La principal auxina

natural presente en muchas plantas es el Ácido Indolacético (AIA). (Hill, 1977; Barba, 1991a; Gaspar *et al.*, 1996; Pospíšilová, 2003).

Los tipos de auxinas más comunes y de mayor uso que podemos encontrar en el cultivo de tejidos son AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético), ANA (ácido α naftalenacético) y 2,4-D (2, 4- diclorofenoxiacético) (Hu y Wang, 1983; Davies, 1990). De acuerdo con George y Sherrington (1984) y Gaspar *et al.* (1996) este último se ha empleado para la inoculación de callos, cultivos en suspensión y principalmente para la embriogénesis somática, mientras que AIA y ANA se utilizan con mayor frecuencia para la inducción de raíces en plántulas generadas *in vitro*. Aunque para la obtención de una respuesta morfogénica dentro del cultivo *in vitro* las auxinas pueden ser necesarias en muy bajas concentraciones o bien, la proliferación de brotes puede proceder en ausencia de ellas (Olguín, 1994).

Citocininas

Las citocininas son derivados de la adenina y su biosíntesis ocurre en la punta de la raíz; siendo la Zeatina (Z) la principal citocinina en las plantas, seguida por la IPA (isopentenil adenina) que se forma naturalmente en las plantas aunque es menos abundante (Bidwell, 1990; Burch y McGaw, 2000; Pospíšilová, 2003). Las citocininas se liberan a partir de su lugar de síntesis (ápices de las raíces) y se transportan vía xilema (transporte acropétalo) a través de los brotes hacia las hojas donde se produce una rápida absorción. Estas hormonas se caracterizan principalmente por la habilidad para promover la división celular, además de otros efectos como el alargamiento celular, previenen o retardan la senescencia de los órganos como las hojas, contrarrestan el letargo y se ha demostrado que estimulan la formación del xilema. Así mismo hay evidencia de que las citocininas se pueden encontrar en tejidos de crecimiento activo, como las hojas jóvenes, yemas apicales y semillas en desarrollo, aunque predominan en las raíces (Bidwell, 1990; Davies, 1990; Olguín, 1994; Gaspar *et al.*, 1996; Burch y McGaw, 2000; Pospíšilová, 2003).

A pesar de que las auxinas suprimen el crecimiento de las yemas laterales (Bidwell, 1990), las citocininas producen el crecimiento de yemas laterales liberando a estas de la dominancia apical. Incluso en algunas especies, las citocininas pueden aumentar la abertura estomática ayudando al desarrollo de cloroplastos (Davies, 1990). Incluso cuando se aplica exógenamente puede producir el reverdecimiento de las hojas cuando están amarillentas (Burch y McGaw, 2000). Dentro de este grupo encontramos citocininas como: Zeatina (Z), N⁶- 2 isopentenil adenina (2iP), N⁶ Benciladenina (BA ó BAP) y Kinetina (K). De las cuales según Burch y McGaw (2000) el 2iP y BA son citocininas muy activas cuando se aplican exógenamente (Pospíšilová, 2003).

En el cultivo de tejidos la aplicación de citocininas al medio de cultivo induce la división celular, además de promover la morfogénesis formando brotes o yemas (Davies, 1990; Burch y McGaw, 2000). Aunque la incapacidad de un brote para formar raíces (enraizar) en un medio carente de hormonas, quizá se deba a un efecto inhibitorio, inducido por la elevada concentración de citocininas (Schmulling *et al.*, 1989, citados por Burch y McGaw, 2000). Así mismo las citocininas combinadas con auxinas en concentraciones muy bajas permiten activar las yemas axilares. Cabe mencionar que los niveles tanto de auxinas como de citocininas son de suma importancia en el proceso de crecimiento u obtención de resultados y pueden ser específicos dependiendo de la especie con la que se trabaje (Starling y Dodds, 1983; Fakhrai y Fakhrai, 1990; Olguín, 1994). Por otra parte Gaspar *et al.* (1996), señalan que los efectos que presentan tanto los reguladores de crecimiento vegetal naturales como los sintéticos, son raramente específicos, e influyen en el desarrollo y crecimiento. Sin embargo, en cultivo *in vitro* la respuesta de las células, tejidos y órganos, puede variar con las condiciones del cultivo, tipo de explante y genotipo.

4.2. Respuestas morfogénicas

Los tejidos vegetales *in vitro* pueden producir diversas respuestas morfogénicas, dependiendo del tipo y edad del explante utilizado, el medio de cultivo y los RCV adicionados. Las principales rutas son: organogénesis y embriogénesis (Jiménez, 1998; Segura, 2000).

Organogénesis

Se refiere a la génesis *de novo* de un órgano vegetal, a partir de tejido meristemático o no meristemático (Schwarz y Beaty, 2000). Es un evento caracterizado por un desarrollo de un primordio unipolar (tallo o raíz), a partir de una yema, con su continuo desarrollo formando un brote, existiendo siempre la conexión entre este y el tejido paterno (Jiménez, 1998; Segura, 2000). Cuando los brotes obtenidos se forman directamente del explante, se dice que se desarrollaron vía organogénesis directa y se llama organogénesis indirecta cuando los brotes se obtienen a través de una etapa intermedia de callo (Jiménez, 1998; Schwarz y Beaty, 2000). El callo es un tejido determinado y diferenciado, el cual se desdiferencia ante la presencia de reguladores en el medio de cultivo, presentando una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos (Barba, 1991b; Gómez, 1998a).

Embriogénesis

En la embriogénesis somática los embriones no son el producto de la fusión de gametos, pero son estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical (brote y raíz), aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno (Jiménez, 1998; Segura, 2000). Estos embriones deben ser capaces de crecer y formar plantas normales. Al igual que la organogénesis, la embriogénesis somática puede formarse vía directa o indirecta, es decir por ausencia o presencia de una etapa intermedia de callo, respectivamente (Gómez, 1998b). Aunque la expresión de una determinada respuesta *in vitro* (regeneración de raíces, tallos o embriogénesis) está dada por la interacción de numerosos factores, tales como el genotipo de la planta donadora, tipo de explante y estado fisiológico, composición química del medio nutritivo y ambiente del cultivo (Ammirato, 1986; Brown y Thorpe, 1986, citados por Segura, 2000). Sin embargo, los reguladores de crecimiento desempeñan un papel fundamental en el control de la morfogénesis, y generalmente una concentración alta de auxinas en relación a las citocininas promueven la formación de callo y raíces, y una concentración alta de citocininas respecto a las auxinas induce la formación de brotes, aunque el desarrollo de callo puede ocurrir en un amplio rango de concentraciones de RCV (George y Sherrington, 1984).

De manera general estas técnicas presentan una herramienta para estudios sobre fisiología, bioquímica, mejoramiento genético e ingeniería genética, obteniendo plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma y la producción de metabolitos secundarios (Strauch, 1989; Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Además de permitir una multiplicación rápida y eficaz de las plantas haciendo posible disponer de ellas en cualquier momento (Jiménez, 1998).

4.3. Micropropagación

La micropropagación es quizá la técnica dentro CTV más empleada para plantas de interés hortícola, ornamental, entre otros (Hu y Wang, 1983; Debergh, 1987; Evans, 1990). Este método se basa en la obtención del mayor número de plantas posibles, con características uniformes, libres de enfermedades, en cualquier época del año y a partir de tan sólo una pequeña porción de tejido (explante inicial), principalmente si se trata de una especie rara o amenazada (Hu y Wang, 1983; Collin y Edwards, 1998). El proceso de micropropagación consta de 5 etapas:

- ***Etapas 0: Selección y preparación de la planta madre.***

En esta etapa se selecciona la planta madre adecuada que será utilizada como fuente de explante, la cual debe cumplir con condiciones fitosanitarias y fisiológicas óptimas, para reducir la probabilidad de enfermedades o algún tipo de contaminación (Debergh, 1987; Kane, 2000).

- ***Etapas I: Establecimiento de cultivos asépticos***

Se requiere establecer un cultivo libre de contaminación microbiana, bacterial o viral siendo esta la base para la etapa II de Multiplicación. En esta etapa se realiza la desinfección del material vegetal, lo cual permite el establecimiento del cultivo e inicio de la propagación, contrarrestando o eliminando la contaminación, principalmente por bacterias. Este paso permite evitar la pérdida no sólo de una sino de muchas plantas (Debergh, 1987; Collin y Edwards, 1998). Una vez desinfectado el material inicial se cultiva y mantiene en condiciones de asepsia.

Dentro del cultivo de tejidos en cactáceas se han empleado diferentes tipos de explantes provenientes de tallo o cuerpo de la planta ya sea *in vivo* o *in vitro*, disectando de diferentes maneras posibles para obtener explantes longitudinales (Machado y Prioli, 1996; Mata *et al.*, 2001), laterales (Frías, 1989; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Santos-Díaz *et al.*, 2003), apicales (Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), basales (Papafotiou *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002), transversales (Castro-Gallo *et al.*, 2002) o tubérculos (Escobedo *et al.*, 2002), aréolas (Anicua y Rivas, 2000; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002) o médula (Kólar *et al.*, 1976 citado por Olguín, 1994).

- **Etapa II: Multiplicación de brotes**

Esta etapa requiere la adición de reguladores de crecimiento. Gratton y Fay (1990), mencionan que el principio básico en el cual el método de la propagación se basa, es la inducción de la formación de brotes, usando medios que contengan reguladores que promueven el crecimiento tales como las auxinas y citocininas (Hu y Wang, 1983; Starling y Dodds, 1983; Brown y Charlwood, 1990; Olguín, 1994; Gaspar *et al.*, 1996; Orellana, 1998; Kane, 2000).

Considerando que estos dos reguladores y la interacción de ambos son de suma importancia para regular el incremento y crecimiento organizado en el cultivo de células y órganos vegetales (Gaspar *et al.*, 1996). Como sucedió con la propagación de *Epithelantha micromeris*, donde Velázquez y Soltero (2001) emplearon la combinación de citocininas y auxinas como: 2iP 4 mg/l con 0.20 mg/l de ANA y lograron obtener 14.75 brotes por explante, en *Astrophytum myrriotigma* y *Mammillaria uncinata* Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) obtuvieron 9.23 y 17.50 brotes por explante al emplear BA 1 mg/l con ANA 0.01 mg/l. aunque para especies como *Echinofossulocactus sp.*, *M. candida* y *Stenocactus coptonogonus* el empleo de citocininas en ausencia de auxinas (BA 1 mg/l) resultó favorable para la producción de brotes formando 12.05, 13.25 y 16.75 respectivamente. Cabe mencionar que en esta etapa la tasa de multiplicación de brotes es progresiva obteniendo “n” número de brotes a partir de un sólo explante (Kane, 2000).

- **Etapa III: Enraizamiento de los brotes obtenidos**

Los brotes obtenidos se individualizan y colocan en medio para promover su elongación y desarrollo de raíces (enraizamiento). La etapa de enraizamiento puede hacerse en ausencia de Auxinas (George y Sherrington, 1984) empleando medio MS completo o al 50% de sus componentes como en el caso de *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003) y *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1998); aunque para algunas especies como *Pelecocyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002) y *Cephalocereus senilis*, *Echinocactus platyacanthus* *Ferocactus hamatacanthus*, *Mammillaria craigii*, entre otras (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998) se ha reportado el uso de AIA y AIB. Hu y Wang (1983), señalan que después del enraizamiento las plantas regeneradas *in vitro* están listas y pueden transferirse a sustrato.

- **Etapa IV: Aclimatización**

En la propagación *in vitro*, la aclimatización es muy importante ya que las condiciones dentro del frasco de cultivo son diferentes al medio ambiente, y la pérdida de propágulos al ser transplantados a suelo es muy frecuente, lo que hace necesario realizar la aclimatización *in vitro* y/o *ex vitro* de plantas micropropagadas, con la cual se garantice su establecimiento a las nuevas condiciones (Agramonte *et al.*, 1998; Fuentes y Martínez, 2001). La aclimatización implica acostumar las plantas a condiciones significativas de humedad relativa baja y alta intensidad luminosa (Agramonte *et al.*, 1998; Kane, 2000).

Las plántulas cultivadas *in vitro* crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa (Hu y Wang, 1983; Agramonte *et al.*, 1998). Cabe mencionar que todas estas condiciones alteran o inducen cambios fenotípicos en las plántulas ahí desarrolladas, razón por la cual es necesario aplicar una etapa de aclimatización, con lo cual las plántulas podrán gradualmente adquirir sus características morfológicas normales. Sin embargo, la fase más importante de la

micropropagación es el establecimiento de las plantas en condiciones *ex vitro*, donde las plántulas se desarrollen bajo condiciones autótroficas y continúen su crecimiento en condiciones de invernadero o ambiente natural.

Algunas cactáceas que han logrado establecerse a condiciones *ex vitro* son: *Epithelantha micromeris* (Velázquez y Soltero, 2001), *Astrophytum ornatum*, *Coryphantha elephantidens*, *Ferocactus flavovirens*, *Mammillaria bocasana*, *Pachycereus schottii*, *Stenocereus stellatus* (Castro-Gallo *et al.*, 2002), entre otras.

Ventajas y desventajas de la propagación

Finalmente se deduce que el uso de métodos tradicionales para propagar cierto número de plantas tomaría un tiempo considerable, mismo que se reduce con el empleo del cultivo de tejidos. Además de que se cuenta con material vegetal libre de patógenos y propagación en menor tiempo, en cualquier época del año. Con la ventaja de que para el establecimiento e inicio del cultivo sólo es necesario una pequeña porción de tejido, logrando obtener en definitiva la regeneración de millones de plantas (Hu y Wang, 1983).

4.4. Cultivo de Tejidos en Cactáceas

Se han obtenido resultados satisfactorios en la micropropagación de algunas especies de la familia Cactaceae (Tabla 1).

Fay *et al.* (1995) publican un listado donde señalan que para esta familia hay 25 trabajos de propagación para 22 especies. Siendo 17 encontrados en el año 1994. Entre la lista de especies se encuentran géneros como *Echinocactus*, *Astrophytum*, *Mammillaria*, entre otros. Finalmente en la tabla 1 y de acuerdo con Fay *et al.* (1995), se observa que la concentración de auxinas y citocininas y la combinación entre ambas, empleadas para la propagación, es específica para cada una de las especies. Así mismo, el éxito del cultivo de tejidos en cactáceas da la posibilidad de realizar un comercio legal y sustentable siempre que estos procesos se puedan comercializar.

Tabla 1.- Especies de la familia Cactaceae que se han propagado por medio del cultivo de tejidos vegetales

| Especie | Explante | Medio | Hormonas (mg/l) | Respuesta morfogén. | Brotos (B/E) | Otros | Autor |
|-----------------------------------|----------|----------------|---|------------------------------|-----------------|--|--|
| <i>Mammillaria elongata</i> | T | MS | 2iP/AIB 10 / 1 | callo, raíces y brotos | n.e | E y Ac | Johnson y Emino, 1979 |
| <i>Leuchtenbergia principis</i> | A | MS | BA/ANA 10/0.1 | brotos | 25 | n.e | Starling, 1985 |
| <i>Cereus peruvianus</i> | A y La | MS + B5 | BA y K + AIA y ANA: 0, 0.01, 0.1 y 1 | brotos | | n.e | Machado y Prioli, 1996 |
| <i>Mammillaria candida</i> | L | MS | K 5 + 1% Carbon activado | brotos | 2 | n.e | Elías-Rocha <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Coryphantha clavata</i> | A y B | MS | BA/ANA 1/ 0.01 | brotos | 4.73 | E y Ac | Pérez-Molphe- Balch <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | | | | | 9 | | |
| <i>Echinofossulocactus sp</i> | | | | | 12.05 | | |
| <i>Nyctocereus serpentinus</i> | | | | | 2.15 | | |
| <i>Astrophytum myriscostigma</i> | | | | | 9.23 | | |
| <i>Mammillaria sphaelata</i> | | | | | 17.5 | | |
| <i>Stenocactus coptonogonus</i> | | | | | 16.75 | | |
| <i>Ferocactus hamatacanthus</i> | | | | | 5.83 | | |
| <i>Mammillaria formosa</i> | | | | | 4.42 | | |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | L | MS | 2,4-D/K - ANA/BA | callo y brotos | n.e | n.e | Martínez <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Turbincarpus laui</i> | L | MS | BA 1.98 | brotos por Org. ind. | 269.8 | E y Ac (94-100% sobre- vivencia) | Mata <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Epithelantha micromeris</i> | A y B | MS | 2iP/ANA 4 / 0.20 K 8 | brotos | 14.75 17.25 | 84% de éxito en Ac | Velázquez y Soltero, 2001 |
| <i>Acharagma aguirreana</i> | A y Ta | MS | 2iP 2 BA 3 BA 3 2iP 4 BA 2 2iP 4 BA 1 | brotos | 5.8 | Ac con 90-100% de sobre- vivencia | Castro-Gallo <i>et al.</i> ,2002 |
| <i>Coryphantha elephantidens</i> | | | | | 2.4 | | |
| <i>Pachycereus schottii</i> | | | | | 4.3 | | |
| <i>Pilosocereus chrysacanthus</i> | | | | | 3 | | |
| <i>Stenocereus stellatus</i> | | | | | 3.3 2.8 7 | | |
| <i>Opuntia erinacea</i> | n.e | MS y Robert | (BA/ANA) 1 / 0.1 6 / 0.1 10 / 0.01 | brotos | 12.5 | n.e | Ramírez <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Mammillaria obscura</i> | | | | | 9.6 | | |
| <i>Duvalia sulcata</i> | | | | | 10 | | |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | | | | | 1.5 | | |

A: apical, B: basal, La: lateral, L: longitudinal, T: tubérculos, Ta: transversal, n.e: no especificado, E: enraizamiento, Ac: aclimatación, Org. Ind.: organogénesis directa B/E: brotos por explante.

5. Género *Echinocactus*

El género *Echinocactus* se subdivide en dos subgéneros *Homalocephala* y *Echinocactus* y comprende plantas grandes y pequeñas, simples (ramificadas cuando sufren lesiones), con aréolas grandes y muy espinosas. Flores amarillas y rosas, dispuestas cerca del ápice. Frutos secos y carnosos con semillas lisas o arrugadas y brillantes o parduscas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). El género está constituido por 6 especies: *E. horizonthalonius*, *E. texensis* (*Homalocephala*), *E. polycephalus*, *E. parryi*, *E. platyacanthus* y *E. grusonii* (*Echinocactus*). De las cuales las tres últimas son endémicas de México (Guzmán *et al.*, 2003).

E. horizonthalonius (Lem. 1839) conocido como “biznaga meloncillo” se distribuye en varios estados de la República (Sonora, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, Tamaulipas, Guanajuato, Aguascalientes, S. L. P. y Zacatecas) y en E.U. Es un ejemplar pequeño de hasta 30 cm de altura y 15 de diámetro. Sus espinas son gruesas, cubren densamente el cuerpo y presentan colores variados, desde rojizo hasta grisáceo y a veces negro. Sus flores de color rosa, brotan del ápice de la planta.

E. texensis (Hopffer, 1842), conocido vulgarmente como “mancacaballo”, es una planta pequeña de 15 cm de altura y 30 cm de diámetro. Presenta espinas fuertes, gruesas y largas de color rojo con la base más clara. Esta planta se distribuye en Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas y en E.U.

E. polycephalus (Engelmann & Bigelow, 1856) se distribuye en Sonora, México y en E.U. Esta planta es poco ramificada y forma clones de hasta 30 ramificaciones. Puede medir de 15 a 70 cm de altura y de 20 a 30 cm de diámetro. Las espinas son rojas o grisáceas y cubren el tallo.

E. parryi (Engelmann, 1856) es un cacto pequeño de 16 a 25 cm de altura y 21 a 30 cm de diámetro. Las espinas son blanquecinas, robustas y no cubren el tallo. El ápice es algo hundido, con lana blanca. Es una especie endémica de

México y sólo se distribuye en el estado de Chihuahua y es señalada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) como especie Amenazada (A).

E. platycanthus (Link & Otto, 1827) conocido comúnmente como “biznaga dulce” es una especie que llega a medir de 50 cm a 2 m de altura y 40 a 80 cm de diámetro. Presenta ápice hundido, espinas grandes y gruesas, amarillentas hasta con tintes rojizos; flores de color amarillo intenso. Estas plantas crecen lentamente y pasan muchos años para adquirir su forma columnar o tonel, llegando a alcanzar hasta 3 m de altura y a pesar varias toneladas. Es una especie sujeta a protección especial (Pr) (NOM-059-ECOL-2001) y endémica de México, distribuyéndose en los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

5.1. *Echinocactus grusonii* (Anexo 1)

El nombre genérico se refiere a un cacto espinoso y el nombre específico recuerda a H. Gruson dueño de una gran colección (Glass, 1998). Esta especie se caracteriza por presentar tallos de color verde claro, grandes, de 20 a 130 cm de altura y 40 a 80 cm de diámetro, ápice con lana amarillenta, numerosas espinas largas de color amarillo oro y flores de color amarillo cadmio que se desarrollan en el ápice lanoso. Es una planta muy ornamental por el color amarillo de las espinas y se ubica dentro de la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) como especie en Peligro de Extinción (**P**). *E. grusonii* al igual que *E. platycanthus* son las especies dentro de su género que alcanzan el mayor desarrollo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Guzmán *et al.*, 2003).

Echinocactus grusonii presenta una distribución restringida en los estados de Querétaro (Cañón del Río Moctezuma) e Hidalgo (algunas localidades en la región de Zimapán) (Fig. 1) (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991; Glass, 1998; Guzmán *et al.*, 2003), formando parte de la Subregión Meridional del Desierto Chihuahuense (Zona Árida Queretano-Hidalgense) la cual se caracteriza por presentar un clima semiárido poco extremoso, y su biota comprende un gran número de especies endémicas de cactáceas y otras familias de plantas (Hernández, 2006).

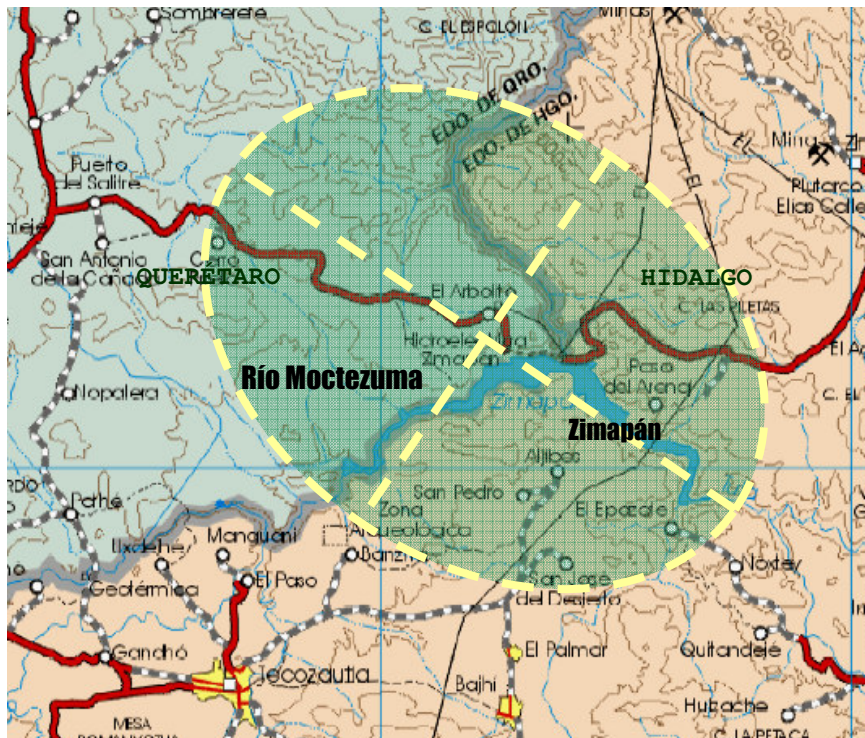


Fig. 1.- *Echinocactus grusonii*, se distribuye en el Cañón del Río Moctezuma, Qro. y localidades de Zimapán, Hgo (Tomado y modificado de <http://mapserver.inegi.gob.mx>).

Hernández y Godínez (1994), presentan un listado de especies de cactáceas mexicanas donde incluyen cuatro categorías de distribución basadas en el número de localidades conocidas por cada taxón; *E. grusonii* se ubica en la categoría 2, que incluye especies con distribuciones muy restringidas pero que son conocida en otras áreas además de su localidad tipo en un máximo de cinco localidades y que generalmente las poblaciones se encuentran disjuntas dentro de una porción de un estado o de dos estados contiguos.

5.2. Uso y problemática

El género *Echinocactus* es utilizado en la elaboración de “frutos cristalizados”, como alimento para el ganado y debido a la gran cantidad de celulosa que presenta también es usado para la fabricación de papel (UNAM, 1989 citado por Anicua y Rivas, 2000; Fitz y Anderson, 1997; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999; Becerra, 2000).

La pulpa de *Echinocactus grusonii* y *E. platyacanthus* (principalmente) es útil para la preparación del tradicional acitrón, el cual es un dulce cristalizado que se elabora con trozos del tallo, hervidos en agua de cal, escurridos y cocidos con azúcar (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999; Cházaro *et al.*, 2001).

Actualmente *E. grusonii* es la especie más atractiva y ampliamente cultivada por su gran belleza y gran valor ornamental, debido principalmente al color amarillo oro de sus espinas, lo cual, la convierte en la planta ornamental ideal (Hernández, 2006). Esto a lo largo de los años ha ocasionado el intenso saqueo de la especie de su hábitat natural.

Wagner (1971 citado por Anicua y Rivas, 2000), mencionó que antes de la segunda guerra mundial, gran cantidad de ejemplares de *E. grusonii* se exportaron a Europa con fines ornamentales y para colecciones.

La pérdida de especies vegetales inicia con la destrucción de sus hábitats, debido a la expansión de las áreas urbanas, desarrollo industrial, etc. En el caso de *E. grusonii*, la construcción en 1995 de la presa hidroeléctrica Zimapán en el Cañón del Río Moctezuma entre los Estados de Querétaro e Hidalgo, destruyó gran parte de la población por la inundación de la mayor parte de su hábitat, en adición, a la expansión de la agricultura de riego y desarrollo del turismo (Fitz y Anderson, 1997; Hernández, 2006). Hoy en día además de ser una planta ornamental, también forma parte de las grandes colecciones de cactáceas en Jardines Botánicos a lo largo de todo el mundo.

En una búsqueda vía Internet, referente a los jardines Botánicos de diferentes lugares del mundo, fue posible encontrar que *E. grusonii* forma parte de la colección de cactáceas en lugares como Estados Unidos, España, Perú, Finlandia, Francia, Suecia y Japón, entre otros. Encontrando que los Jardines Botánicos de Estados Unidos son los que presentan con mayor frecuencia ejemplares de esta especie. Lo que la ha colocado en una situación crítica.

Así mismo su venta por esta vía es amplia y diversos sitios de comercialización de cactáceas cuentan con ejemplares de *E. grusonii* (Tabla 2), cotizando las plantas en diferentes precios que van desde \$40 hasta más de tres mil pesos mexicanos.

Tabla 2.- Comercialización de ejemplares de *Echinocactus grusonii* en diferentes sitios de Internet.

| EJEMPLAR | PRECIO € | PRECIO \$ | REFERENCIA |
|--------------------------|--------------|------------------|--|
| semillas (25) | 3 | 42.64 | www.baobabs.com |
| 12 cm longitud | 17.95 | 112.99 | www.henkhallo.nl |
| 19 cm longitud | 34.95 | 496.71 | www.henkhallo.nl |
| diferentes tamaños (n.e) | 0.99 y 249.0 | 14.07 y 3,538.81 | www.cactuswereld.nl |

n.e: no especificado, €: precio en Euros, \$: precio en Pesos Mexicanos.

La Norma Oficial Mexicana (NOM- ECOL-059-2001) coloca a *E. grusonii* en la categoría de especie en Peligro de Extinción (P), y en la lista roja de la IUCN (International Union Conservation of Nature ó Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales) como en Peligro Critico (Critically Endangered, CR). Arias *et al.* (2005) señalan que la categoría de peligro de extinción de la NOM, es equivalente a la de peligro crítico de la IUCN.

Ambos listados coinciden parcialmente que esta situación es dada principalmente por ser una especie cuya área de distribución ha disminuido drásticamente, poniendo en riesgo su viabilidad biológica natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación de su hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros, además de la reducción en el tamaño de la población en aproximadamente el ochenta por ciento. Arias *et al.* (2005) también señalan que *E. grusonii* podría ubicarse en la apéndice II de la CITES (Convention on Internacional Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora ó Convención sobre el Comercio Internacional de especies amenazadas de Flora y Fauna silvestre), la cual incluye especies que pueden o

no estar en peligro de extinción, pero que su comercio debe ser evitado para evitar una utilización incompatible con su supervivencia.

5.3. Cultivo de Tejidos en *E. grusonii*

Algunos trabajos donde se emplea el cultivo de tejidos para la propagación de especies pertenecientes al género *Echinocactus* se muestran en la tabla 3:

Tabla 3.- Trabajos de cultivo de tejidos realizados en diferentes especies del género *Echinocactus*

| Especie | Explante | Medio | Hormonas mg/l | Respuesta morfo-gen. | Brotes (B/E) | Enraiza- miento | Establecimiento <i>ex vitro</i> | Autor |
|--|----------|-------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------------|---|
| <i>E. grusonii</i> y <i>E. grandis</i> | S | MS | n.e | n.e | n.e | n.e | plántulas n.e | Corona y Chávez-Ávila, 1982 |
| <i>E. grusonii</i> | L | MS | K 4.3 | Brotes (B/t) | 9 | n.e | n.e | Frías, 1989 |
| | | | 2iP/AIA 6.7/0.2 | | 10 | | | |
| <i>E. platyacanthus</i> | L | MS | BA 1 | brotes | 9 | AIA 0.5 (95%) | 90% de sobre- vivencia | Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>E. platyacanthus</i> | 0.5 cm | MS | 2,4D/K - ANA/BA | callo y brotes | n.e | n.e | n.e | Martínez <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>E. grusonii</i> | Ar | MS | BA, K: 0.5, 1, 5 y 10 | callo | n.e | n.e | n.e | Anicua y Rivas, 2000 |
| <i>E. grusonii</i> | Ar | MS | BA n.e | brotes | n.e | n.e | n.e | Martínez <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>E. grusonii</i> | PI | MS | BA 2 | brotes | 4.1 | MS+AIB | n.e | Lizalde-Viramontes <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>E. platyacanthus</i> | PI | MS | K /AIA 3/4 | brotes | 5.6 | n.e | n.e | Ramírez <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>E. platyacanthus</i> | L | MS | BA 1, 2 y 3 | brotes y pseudo- brotes | 4 | si | n.e | Saby <i>et al.</i> , 2004 |
| | | | K 1, 2 y 3 | | 5 | | | |

Ar: aréolas, L: longitudinal, PI: plántulas, S: semillas, MS: Murashige y Skoog, B/t: brotes por tratamiento, B/E: brotes por explante, n.e: no especificado.

En los diversos trabajos realizados con algunos miembros del género *Echinocactus* se han utilizado diferentes tipos de explantes desde aréolas hasta fragmentos de plántulas disectadas de diferentes formas, se han sembrado en medio MS, adicionado con diferentes citocininas, experimentando con una o dos

de ellas, solas o en combinación de auxinas, en concentraciones que van desde 0.5 hasta 10 mg/l.

Cabe mencionar que de los 9 trabajos enlistados solo 5 muestran los resultados sobre el número de brotes obtenidos y solo uno realizado con *E. platyacanthus* logró la aclimatización y sobrevivencia de las plantas regeneradas. Sin embargo, aunque existen trabajos anteriores en los que se trató de propagar la especie de estudio mediante estas técnicas, ninguno de ellos contempla un muestreo exhaustivo en la etapa de multiplicación, ni dan a conocer el método por el cual se llegaron a establecer las plantas a condiciones de invernadero. Es por ello que en el presente trabajo con base en los resultados obtenidos de la literatura, así como del trabajo de Saby *et al.* (2004), se pretende definir una metodología para los miembros de este género.

Cabe señalar que trabajos como el de Rosas-López (2002) que explica la metodología a seguir para el establecimiento *in vitro* de *E. platyacanthus*, fueron la base para lograr la germinación de semillas de *E. grusonii* mediante los tratamientos previos de escarificación y desinfección, logrando el exitoso establecimiento de la especie.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Echinocactus grusonii* es una especie endémica de México, en peligro de extinción, de distribución restringida y sometida a una fuerte presión de colecta, además de la inminente destrucción del hábitat, es prioritario implementar por medio del Cultivo de Tejidos Vegetales, la metodología adecuada para la propagación y conservación de esta especie, por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

- Establecer la técnica de propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii*, Hildman (Cactaceae).

2. Objetivos particulares.

- Aplicar en *Echinocactus grusonii* las mejores concentraciones de Kinetina (k) y N⁶ benciladenina (BA) utilizadas para *Echinocactus platyacanthus*.
- Examinar el efecto de la N⁶- 2, isopentenil adenina (2iP) y determinar la concentración óptima para la obtención de brotes.
- Comprobar que el sistema de propagación *in vitro* establecido en otro miembro del género, es eficiente para *Echinocactus grusonii*, Hildman (Cactaceae).
- Realizar la aclimatización *in vitro* y establecimiento *ex vitro* de los brotes obtenidos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Doce frutos de *Echinocactus grusonii* donados por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), se abrieron para obtener las semillas; las cuales se lavaron con agua corriente, se secaron y guardaron en bolsas de papel de estraza, y se almacenaron a temperatura ambiente.

1. Escarificación y desinfección de semillas

Las semillas se seleccionaron y se escarificaron en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 15 segundos. Inmediatamente, se desinfectaron en: 50 ml de agua destilada adicionada con 3 gotas de Tween 80 durante 30 minutos, seguido de 50 ml de agua destilada con 3 gotas de Microdyn, durante 15 minutos. Posteriormente se transfirieron a 50 ml de alcohol al 70% (v/v) por 2 minutos y finalmente en 50 ml de blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio (NaOCl) 6% de cloro activo) al 20% (v/v) durante 15 minutos. Todos estos enjuagues se realizaron en agitación continua (Rosas-López, 2002).

2. Establecimiento y germinación *in vitro*

En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, semillas de *E. grusonii* escarificadas y desinfectadas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada esterilizada, y se sembraron en tres medios de cultivo diferentes: medio Murashige y Skoog, 1962 (MS 100%), medio MS al 50% de sus componentes (MS 50%) y Agua con agar bacteriológico 8 g/l (A/A) (Anexo 2). En frascos de vidrio de 120 ml de capacidad se colocaron 30 ml de medio de cultivo y se sembraron 5 semillas por frasco, cada uno con 10 repeticiones, obteniendo un lote de 50 semillas para cada medio de cultivo. Finalmente los frascos se cubrieron con tapas de polipropileno y se sellaron con plástico adherible Ega-pack.

3. Obtención de explantes

Plántulas de 1.0 a 1.5 cm de longitud (2-3 meses de edad) se utilizaron como fuente de explantes, se les realizó un corte transversal en la base (Fig. 2A) para eliminar las raíces y posteriormente un corte longitudinal (Fig. 2B). Se obtuvieron

dos explantes longitudinales por plántula para utilizarse posteriormente en las diferentes concentraciones.

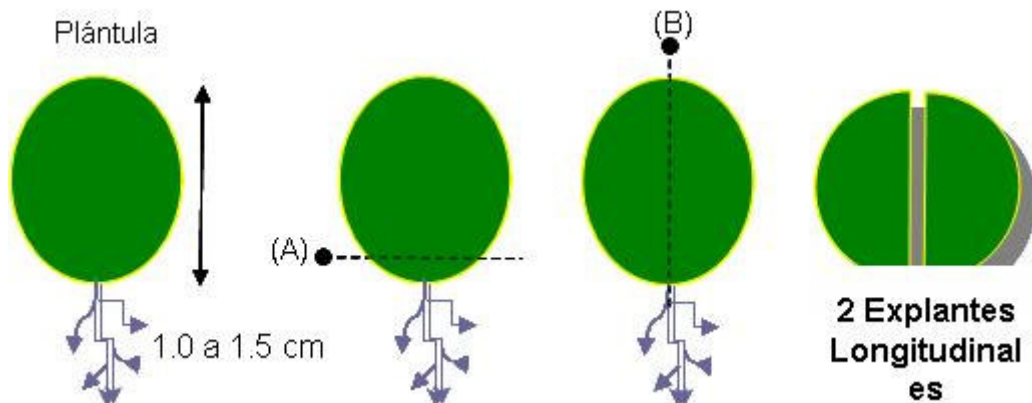


Figura 2.- Obtención de explantes longitudinales a partir de plántulas germinadas *in vitro* de *Echinocactus grusonii*.

4. Siembra de explantes.

Se sembraron 3 explantes longitudinales en cada frasco de cultivo conteniendo 30 ml de medio MS adicionado con K, BA (Saby *et al.*, 2004) y 2iP en concentraciones de 1, 2 y 3 mg/l, además de un grupo control (medio de inducción). Cada uno de los 10 tratamientos tuvo 30 repeticiones (90 explantes) y los explantes se colocaron exponiendo el tejido vascular en contacto con el medio, evaluando los cultivos cada 7 ó 15 días.

5. Análisis estadístico

Las curvas de germinación se ajustaron mediante modelos polinomiales para representar matemáticamente los resultados y así poder realizar predicciones sobre un tiempo de germinación determinado con los modelos obtenidos. Los ajustes fueron realizados usando el paquete estadístico JMP v. 4.0. Se realizaron análisis de varianza para determinar las posibles diferencias entre hormonas y concentraciones tanto para la formación de brotes como para el crecimiento de los brotes en las dos vías de Aclimatización. En los casos donde se registraron diferencias se usaron comparaciones múltiples de media (LSD) de Tukey para

distinguir entre hormonas y concentraciones que difirieran significativamente entre si. Estos análisis se realizaron con Systat 10.0.

6. Individualización y enraizamiento de brotes.

Después de dos meses de incubación, los brotes regenerados de 1 a 4 cm de longitud se individualizaron del explante con ayuda de unas pinzas. Se sembraron de 3 a 5 brotes por frasco en medio MS para promover la formación de raíces, donde permanecieron por más de un mes (Fig. 3).

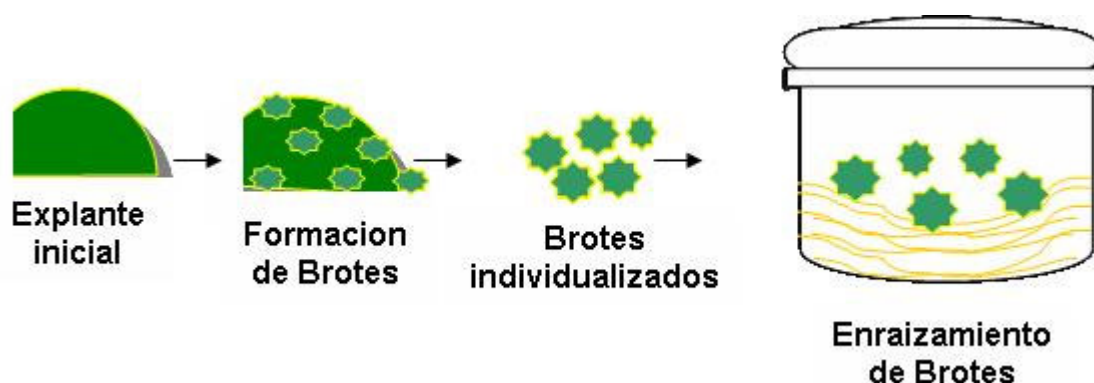


Figura 3.- Individualización y enraizamiento de brotes generados *in vitro*, provenientes de explantes longitudinales de *Echinocactus grusonii*.

7. Aclimatización

Los brotes enraizados se aclimatizaron durante seis meses, siguiendo dos vías de aclimatización: 1. Aclimatización previa *in vitro* y 2. Aclimatización directa a sustrato (*ex vitro*).

7.1. Aclimatización previa *in vitro*

A brotes enraizados de 1.5 a 2.3 cm de longitud, con 40 a 50 días de edad se les eliminó el exceso de agar de las raíces y se subcultivaron en medio MS con la concentración de sacarosa al 50%, durante 3 meses. Después de este tiempo se transfirieron a contenedores con sustrato (ver *ex vitro*) donde permanecieron 3 meses en condiciones de invernadero, completando los 6 meses de aclimatización. Con un vernier digital se tomaron los datos de altura y diámetro de

cada brote al momento de su subcultivo a MS sacarosa al 50%, de su traspaso a sustrato y al fin de 3 meses en el invernadero.

7.2. Aclimatización directa a sustrato (*ex vitro*)

Brotos enraizados de 1.5 a 2.3 cm de longitud, (40 a 50 días de edad) se tomaron directamente del frasco de cultivo y se sembraron en charolas de plástico con sustrato. Previo a esto, se enjuagaron las raíces con agua de la llave para quitar el agar, se colocaron sobre papel de estraza durante 12 horas para eliminar el exceso de agua en las raíces. Posteriormente, se aplicó un enraizador comercial (RADIX 1500) en la raíz y base de los brotes y se sembraron en charolas con tapas de plástico transparente con sustrato estéril mezcla de tierra de hoja de *Liquidambar* spp. y piedra pómez molida en proporción (1:1), el cual se asperjó con una solución de Captán (1 g/l). Las charolas con brotes enraizados permanecieron cerradas, durante una semana en el cuarto de incubación para posteriormente colocarlas durante 6 meses en el invernadero. En el invernadero, las charolas fueron cubiertas por un cubo de madera de 60 x 120 cm, forrado por malla de sombra para reducir la intensidad luminosa. Los primeros tres meses, los brotes enraizados se regaron cada tercer día de manera moderada con agua de la llave y en los siguientes meses una vez por semana. Con un vernier digital se tomaron los datos de longitud y diámetro de cada brote al momento de su subcultivo en sustrato, después de 3 y 6 meses en condiciones de invernadero.

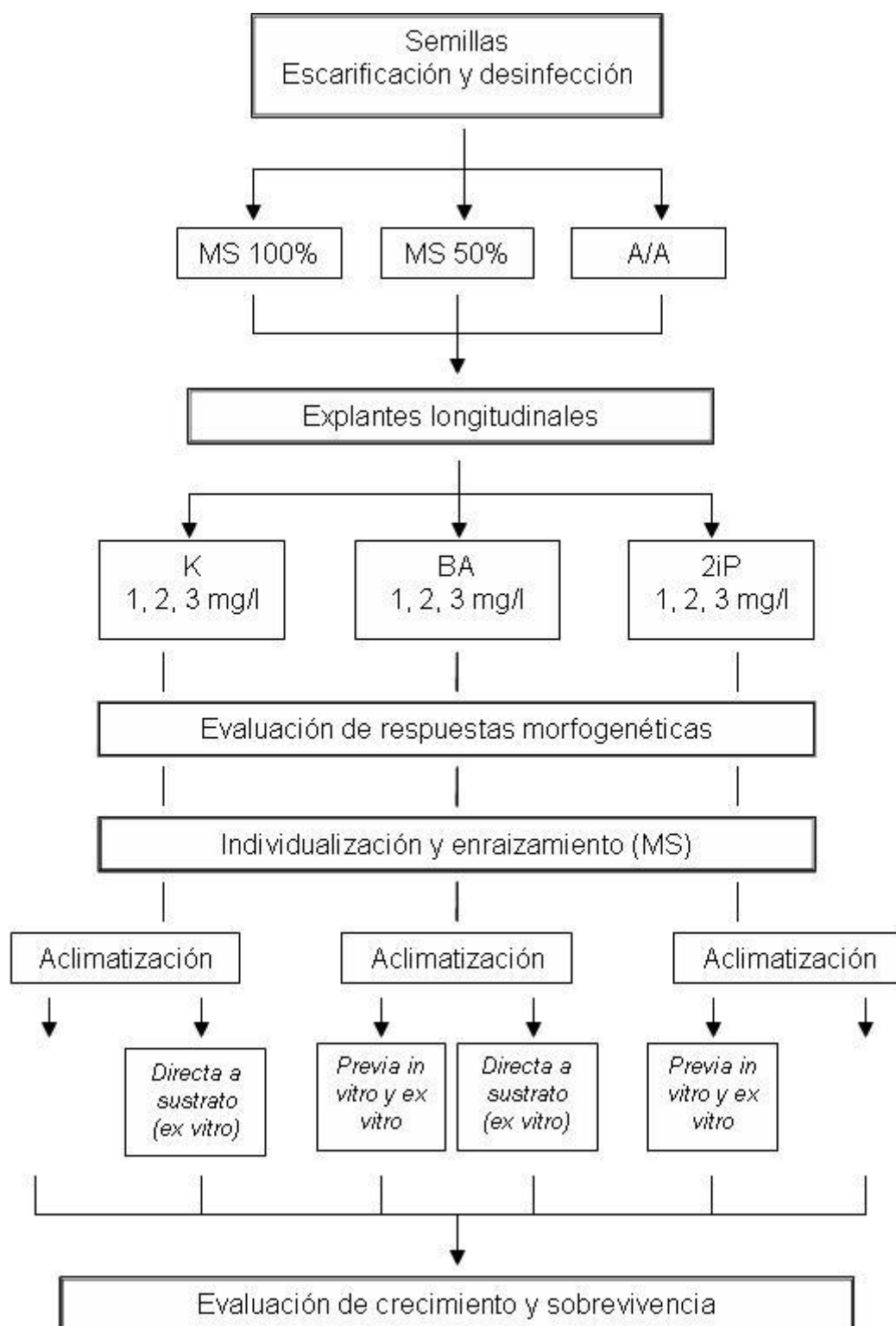
8. Condiciones de incubación

Para todos los ensayos *in vitro* y las plantas en aclimatización, las condiciones de cultivo fueron 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa.

9. Condiciones de invernadero

Todas las charolas con plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero, con una temperatura promedio en los meses de Febrero a Abril de 40.61 °C con una mínima y máxima de 1.20 y 44.73 °C respectivamente, un porcentaje de humedad relativa promedio (HR) del 14.87% con una mínima de 13% y máxima de 82.06%.

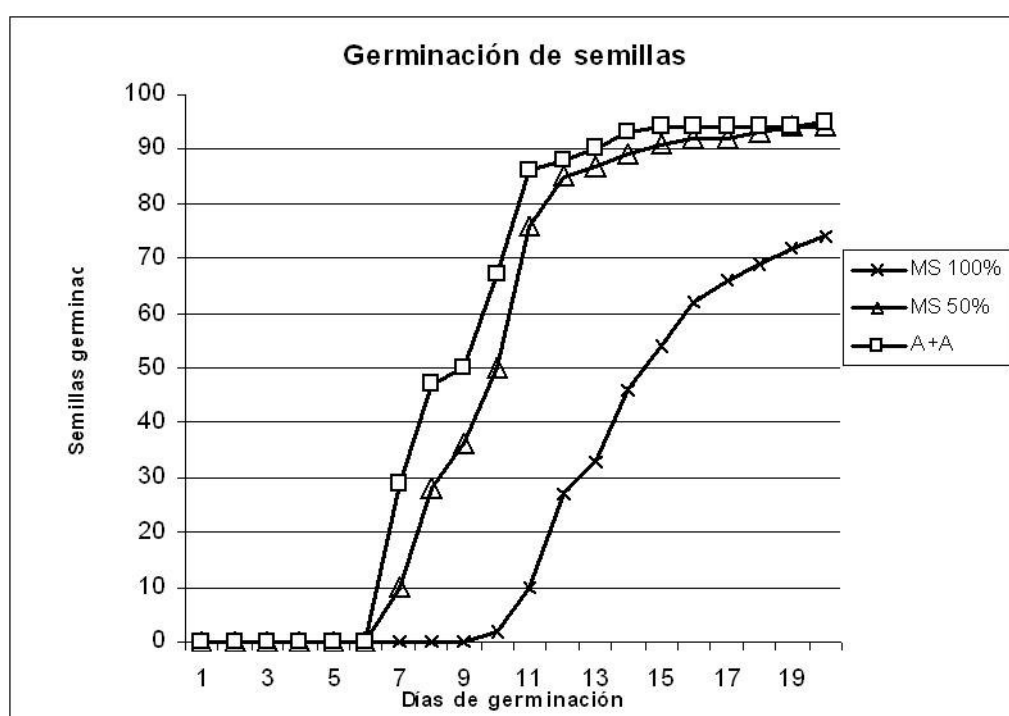
Figura 4.- Diagrama de flujo de la metodología empleada para la propagación de *E. grusonii*.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Germinación *in vitro*

De los ensayos de germinación realizados en los tres medios de cultivo (MS 100%, MS 50% y A/A), el inicio de la germinación se observó al sexto día en el medio MS 50% y A/A, y al día 9 en MS 100%. El máximo porcentaje de germinación se obtuvo a los 19 días de iniciado el cultivo con el 95% para A/A, seguido del 94% en MS 50% y para el medio MS 100% se obtuvo el 74% de germinación (Gráfica 1). Se consideró que una semilla germinó cuando la radícula emergió.



Grafica 1. Ensayos de germinación *in vitro* de *E. grusonii*. Medio agua + agar (A/A) y MS 50% obtuvieron los porcentajes más altos (95 y 94% respectivamente), lectura a los 22 días de iniciado el cultivo.

En la tabla 4 se muestran los ajustes a las curvas de germinación y se representan los modelos matemáticos obtenidos, los cuales permiten realizar a futuro predicciones sobre el tiempo de germinación de semillas en cualquiera de los medios ensayados.

Tabla 4.- Ajuste de las curvas de germinación mediante modelos polinomiales.

| Medio | Modelo | R ² | F | P |
|---------|---|----------------|----------|---------|
| A/A | $A/A = 3.0039502 + 6.5496241 \text{ Column 4} - 0.2849738 (\text{Column 4} - 9.5)^2$ | 0.9 | 84.3278 | < .0001 |
| MS 50% | $MS 50 = -7.349621 + 6.6368421 \text{ Column 4} - 0.1458761 (\text{Column 4} - 9.5)^2$ | 0.89 | 75.9215 | < .0001 |
| MS 100% | $MS 100 = -28.91769 + 4.7120301 \text{ Column 4} + 0.2978469 (\text{Column 4} - 9.5)^2$ | 0.94 | 139.9791 | < .0001 |

Column 4: germinación en días, variable sustituible.

Resultados similares obtuvo Rosas-López (2002) con *E. platyacanthus*, al lograr un porcentaje del 100% en Agua+Agar a los 19 días y un 88% en medio MS 50% en 34 días. Lo anterior se puede atribuir a que las semillas de *E. grusonii* en A/A presentaron el mayor porcentaje de germinación porque este medio no tiene solutos disueltos, lo que hace que el potencial hídrico sea mayor y por tanto, las semillas tengan mayor disponibilidad de agua y germinen. Mientras que en el medio MS 50% la presencia de solutos en el medio disminuye el potencial hídrico y restringe la disponibilidad de agua; para el medio MS 100%, debido a la gran cantidad de solutos se disminuyó aún más la disponibilidad de las semillas a tomar el agua presente en el medio y por tanto retarda la germinación (Rosas-López, 2002). Para otras especies como *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora aselliformis* y *Escobaria minima*, en medio MS se obtienen bajos porcentajes de germinación registrando el 23, 46 y 69% respectivamente (Giusti *et al.*, 2002). Sin embargo, para *M. candida*, Elías-Rocha *et al.* (1998) reportaron que el medio MS completo proporciona óptimos resultados de germinación, lo cual en *E. grusonii* comparado con los otros dos medios no fue tan eficaz.

Por otro lado, el tratamiento de escarificación y desinfección definido por Rosas-López (2002) para *E. platyacanthus* y empleado para *E. grusonii* resultó eficiente, ya que permitió la germinación de las semillas sin causar daño alguno en el embrión por la escarificación con ácido y sin problemas de contaminación. Para otras especies como *Turbinicarpus laui* (Mata *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003) y *Polaskia chichipe* (Rosas-López, 2002), el empleo de tratamientos de desinfección y escarificación no fueron benéficos, ya que dañaron al embrión y redujeron la viabilidad de las semillas.

Desarrollo y crecimiento de plántulas

A pesar de que la germinación en los medios MS 50% y A/A fue similar en tiempo y porcentaje; el desarrollo y crecimiento de las plántulas no fue igual. Sin embargo, en todas las plántulas la estructura que surgió primero fue la radícula, seguida por el hipocótilo y los cotiledones. A continuación se describe la morfología de las plántulas de acuerdo al medio en el que germinaron, después de 58 días de incubación (Imagen 1).

a. Plántulas en agua con agar

Después de 58 días de incubación, las plántulas alcanzaron una longitud de entre 0.5 a 0.7 cm, presentaron la formación de hipocótilo de color verde claro tendiendo al amarillo, los cotiledones de color verde claro y el epicótilo fue poco diferenciado aunque algunas presentaron pequeñas espinas en la parte apical (Figura 5a, Imagen 1).

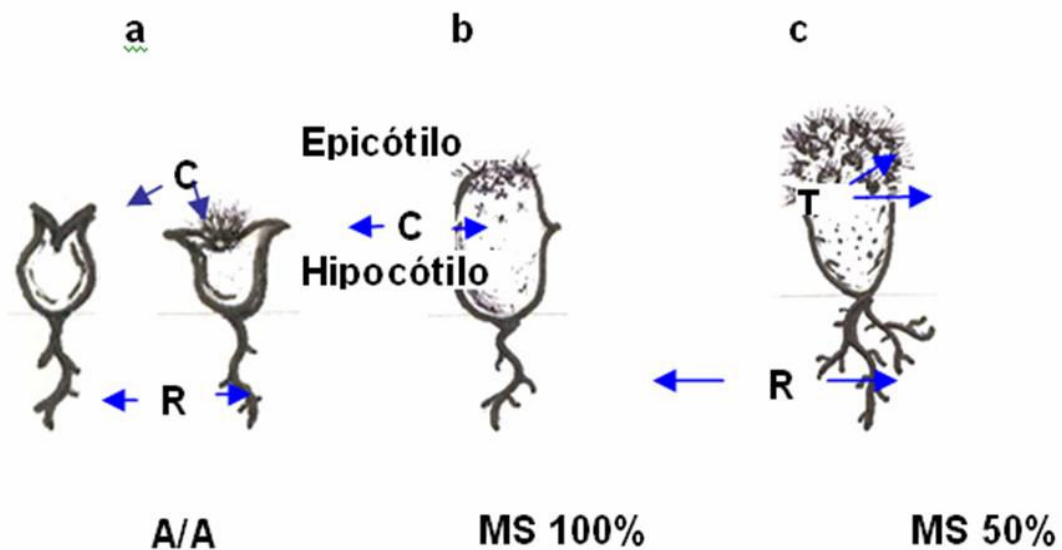


Figura 5.- Desarrollo y crecimiento diferencial de plántulas de *Echinocactus grusonii* en los diferentes medios de germinación *in vitro*, a los 58 días de incubación. C: cotiledones, R: raíz, T: tubérculos, A/A: agua con agar.

b. Plántulas en MS 100%

Las plántulas presentaron una longitud de 0.9 a 1.2 cm, el hipocótilo mostró un color verde con zonas de tonalidad más clara. El epicótilo de color verde presentó aréolas muy juntas entre si, de apariencia plana, con espinas cortas y traslúcidas. (Fig. 5b, Imagen 1).

c. Plántulas en MS 50%

Las plántulas alcanzaron una longitud de entre 1.3 a 1.6 cm, los cotiledones se reabsorbieron en el tejido quedando prolongaciones a manera de diminutas agujas. El tallo exhibió un color verde con tonalidad amarilla hacia la base y verde uniforme más intenso en la parte apical. Presentó numerosas aréolas, definidas, en forma de pequeños tubérculos, con distribución uniforme y espinas fuertes, engrosadas y largas de color blanco brillante (Fig. 5c, Imagen 1).

De acuerdo a lo anterior, para *E. grusonii* el mejor medio para la germinación y óptimo desarrollo morfológico en las plántulas fue el medio MS 50%.

Las diferencias en el crecimiento mostrado entre las plántulas germinadas en los diferentes medios se pueden atribuir en el caso del medio A/A, que el déficit de nutrientes no favorece el crecimiento, para el medio MS 50% se favoreció el crecimiento de las plántulas por la presencia de nutrientes, lo mismo para el medio MS 100%, aunque la gran porción de solutos en el medio retrasó o detuvo el crecimiento (Rosas-López, 2002).

2. Siembra de explantes

Durante el tiempo de inducción de brotes (2 meses), en todos los tratamientos se observó la oxidación del explante, generalmente en el área donde se realizó el corte transversal, presentándose de color café-rojizo. Con menor frecuencia la oxidación abarcó la mitad del explante y las raíces, e incluso el medio de cultivo se oscureció presentando una coloración gris claro, café o vino. Hu y Wang (1983) y Collin y Edwards, (1998) argumentan que las plantas contienen compuestos fenólicos, que se producen como una respuesta al estrés, provocando la oxidación y que en el cultivo *in vitro* se distingue por la coloración café del explante y del medio de cultivo. En el presente trabajo la presencia de la oxidación en los explantes de *E. grusonii* no fue un factor limitante o perjudicial para que se iniciara la morfogénesis, debido a esto, no fue necesario adicionar antioxidantes al medio, utilizar medio fresco o la incubación a baja intensidad luminosa o en completa oscuridad (Hu y Wang, 1983; Fakhrai y Fakhrai, 1990).

3. Respuestas morfogénicas

Después de 15 días en el medio de inducción, algunos de los explantes tomaron una forma curva convexa con respecto a la superficie del medio, incrementaron su volumen y longitud (1 a 2 cm); y la mayoría originaron raíces adventicias a partir del centro o parte inferior en la zona del corte. Así mismo, se presentó la formación de brotes por activación de las aréolas. En la mayoría de los tratamientos se observaron las siguientes respuestas morfogénicas:

3.1. Organogénesis directa por activación areolar: Al inicio de la fase de inducción las aréolas presentaron escasas espinas traslúcidas (Imagen 2a). Después de 18 a 20 días el desarrollo de las espinas y tricomas, se intensificó (Imagen 2b). Subsecuentemente las aréolas incrementaron su volumen y los tricomas tomaron un aspecto algodonoso de forma redonda u ovalada (Imagen 2c), este aspecto fue evidente previo al desarrollo de los brotes principalmente con BA y 2iP, en K y el grupo control este proceso se manifestó posteriormente entre 5 y 10 días más tarde (Imagen 2d).

Jiménez (1998) explica que en la morfogénesis por activación areolar se forma un primordio unipolar a partir de una yema (aréola), con continuo desarrollo hasta formar un brote, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. En *E. grusonii* macroscópicamente se observó que el explante y los brotes estaban unidos aparentemente por el mismo tejido, diferenciando claramente la parte basal del tallo del brote con el explante.

El proceso de formación de brotes concuerda con lo observado por Frías (1989), sin embargo, el autor reportó que el desarrollo de los brotes inició entre los 10 y 15 días de cultivo a partir de la activación de aréolas, con la formación de nuevas espinas, crecimiento del tejido y consideró un brote cuando tenía una dimensión de 1 mm de largo por 1 mm de ancho.

De acuerdo a la apariencia y desarrollo que presentaron los brotes obtenidos a lo largo del periodo de cultivo, estos se clasificaron en: brotes de apariencia normal (con calidad) y brotes de apariencia anormal (sin calidad).

- **Brotos de apariencia normal:** Son brotes que a lo largo de su desarrollo presentaron un aspecto y morfología semejante al de una planta adulta, con un tallo globoso de color verde ligeramente oscuro, con tubérculos bien definidos cubiertos por tricomas blancos y espinas de color amarillo, la base del brote se constriñó y diferenció del explante, lo que facilitó su individualización. Los brotes con estas características y superiores a 0.7 cm se consideraron de calidad (Imagen 3a, b, c).
- **Brotos de apariencia anormal:** Son brotes que a lo largo de su desarrollo cambió su aspecto, crecieron aglomerados sobre el explante, tallos desde 1 a 4 cm de longitud, de color verde claro u oscuro con tubérculos grandes; sus aréolas presentaron tricomas blanquecinos o café claro y de apariencia gelatinosa o en forma de telarañas cubriendo el tallo (Imagen 4a). La base del brote fue ancha y no se distinguía o diferenciaba del explante. A pesar del gran tamaño de estos brotes la morfología no fue la representativa de *E. grusonii*, por lo que estos brotes no se consideraron de calidad.

Frías (1989), con la misma especie observó la formación de brotes a partir de masas amorfas sin tratarse de la formación de callo. La autora señaló que las masas amorfas quizás pueden ser un tejido potencial para formar un gran número de brotes con calidad. Esto coincide con lo observado en este trabajo, sin embargo, se observó que cuando se desarrollaron simultáneamente brotes normales y brotes anormales, los primeros fueron de menor tamaño (Imagen 4b), con base a esto se considera que para generar brotes de calidad a partir de brotes anormales se requiere de mayor tiempo, más periodos de cultivo y manipulación, lo cual podría generar problemas de contaminación.

En *Peleciphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera* Giusti *et al.* (2002), obtuvieron la formación de brotes con alguna anomalía en proporciones de 0.5 y 1% respectivamente. Para *E. grusonii* se obtuvo la formación de un 50.25% de brotes anormales para los tratamientos con BA.

Algunos brotes anormales además de presentar dimensiones mayores y su morfología distinta, desarrollaron de un brote dos o más zonas apicales claramente separadas, pero el resto del brote se fusionaba formando una sola estructura, en otros casos el desarrollo de los ápices fue mayor y se presentaron formas crestadas (Imagen 5a, b). En los brotes crestados se observó la formación de brotes secundarios a partir de la activación de las aréolas apicales (Imagen 5c). Los brotes secundarios presentaron una morfología similar al de los brotes normales, con diferentes tamaños desde 0.5 hasta 1.5 cm de longitud, algunos de ellos fueron de menor tamaño en comparación con el brote del cual se originaron.

Esto es similar a lo reportado por Anicua y Rivas (2000) y Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) que señalan en *Mammillaria bocasana*, *M. carmenae*, *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* la proliferación continua de brotes secundarios y terciarios a partir de un explante inicial, los cuales fueron de menor tamaño en comparación con los brotes primarios.

Una probable causa de lo anterior es que la adición de grandes dosis de reguladores de crecimiento al medio de cultivo da como resultado la formación de plántulas con fisiología, anatomía y morfología anormal (Pospíšilová *et al.*, 1999). Por su parte Jain y De klerk, 1998 (citado por Kane, 2000) dicen que la formación de brotes anormales se atribuye generalmente a la producción de brotes adventicios a través de una etapa intermedia de callo; sin embargo, esta etapa no se presentó en el presente trabajo. Por lo tanto, los brotes anormales de *E. grusonii* al no formarse a partir de una etapa de callo, tienen su origen directo de las aréolas presentes en los explantes (Schwarz y Beaty, 2000).

3.2. Regeneración apical: se observó en aquellos explantes donde el corte longitudinal no fue equitativo y se dejó la mayor parte apical de la plántula, incrementando el meristemo apical su tamaño. Esta respuesta se observó a los 25 días de inducción en todos los tratamientos incluyendo el control. Los mayores porcentajes de regeneración apical se presentaron en K y 2iP 3 mg/l, 54.44% y 52.22% respectivamente, control 52.22% y en BA 1 mg/l con 34.44% (Tabla 5).

Tabla 5.- Explantes longitudinales de *E. grusonii* que regeneraron la parte apical durante dos meses de inducción en tres citocininas a diferentes concentraciones.

| Tratamiento (mg/l) | Regeneración Apical/ Explante (RA/90) | % |
|--------------------|---------------------------------------|--------------|
| control | 47/90 | 52.22 |
| K | 1 | 46/90 |
| | 2 | 38/90 |
| | 3 | 49/90 |
| BA | 1 | 31/90 |
| | 2 | 23/90 |
| | 3 | 25/90 |
| 2iP | 1 | 43/90 |
| | 2 | 41/90 |
| | 3 | 47/90 |

El desarrollo de la parte apical en explantes de *E. grusonii* algunas veces ocurrió con la generación de brotes. Cuando se presentó el desarrollo del ápice y la formación de brotes en el mismo explante, el primero fue doblemente mayor en longitud y diámetro en comparación con los brotes formados en el dorso del explante (Imagen 6a). En aquellos explantes donde se regeneró la parte apical sin formación de brotes, quizá se debió a que el crecimiento apical dominó sobre el crecimiento de yemas laterales, inhibiendo el desarrollo de los brotes en esa zona del explante (Imagen 6b). Sin embargo, la adición de citocininas al medio rompió la dominancia de la yema apical logrando producir brotes axilares (Collin y Edwards, 1998).

Esta respuesta también se observó en *Cephalocereus senilis* (Tapia, 2006), generalmente en ausencia de BA y presencia de ANA. Sin embargo, el tratamiento control presentó la mayor respuesta con el 65%. Así mismo para *Mammillaria schiedeana* subsp. *schiedeana* Soria (2006) reportó un 25% de explantes con esta respuesta.

En la mayoría de los explantes de *E. grusonii* que regeneraron su parte apical, se observó la formación de raíces durante la etapa de inducción de brotes, las cuales en el medio MS basal continuaron su desarrollo.

3.3. Rizogénesis: A partir de 20 días de inducción se observó la formación de raíces vía directa y de manera espontánea en la parte media y/o basal del explante, los cuales presentaron generalmente una raíz principal engrosada con raíces secundarias delgadas y pelos radicales (Imagen 7); en algunos casos las raíces fueron delgadas sin un eje principal.

En los diferentes tratamientos se observó la formación de raíces adventicias en los explantes y con mayor frecuencia en el tratamiento control (84.44 %), seguido por K 2 mg/l (70 %), BA 1 y 2 mg/l (54.44 %) y finalmente 2iP 1 mg/l (51.11) (Tabla 6).

Tabla 6.- Porcentaje de rizogénesis en explantes de *E. grusonii* sometidos a diferentes tratamientos de citocininas y tratamiento control. Datos tomados después de dos meses en tratamiento de inducción.

| Tratamiento (mg/l) | Rizogénesis/ Explante (R/90) | % |
|--------------------|---------------------------------|--------------|
| control | 70/90 | 84.44 |
| K | 1 | 54/90 |
| | 2 | 63/90 |
| | 3 | 59/90 |
| 2iP | 1 | 46/90 |
| | 2 | 35/90 |
| | 3 | 34/90 |
| BA | 1 | 49/90 |
| | 2 | 49/90 |
| | 3 | 38/90 |

Con esto se concluye que la formación de raíces fue indistinta sin presentar tendencia hacia alguna citocinina, indicando que posiblemente las auxinas endógenas presentes en los explantes se activaron e indujeron la formación de raíces (Davies, 1990; Gaspar *et al.*, 1996, Pospíšilová, 2003).

Olguín (1994), para *Ariocarpus retusus* reporta la formación de raíces (sólo una a partir de la base del explante, vía directa e indirecta), así como Tapia (2006) para *Cephalocereus senilis* explica que la rizogénesis ocurrió en tratamientos de BA/ANA a partir de callo o de las aréolas del explante, como una respuesta ante la presencia de auxinas.

4. Hiperhidratación

La hiperhidratación es un desorden fisiológico que frecuentemente afecta a las plantas propagadas *in vitro*, y es considerada una respuesta morfológica al estrés por agua o por la excesiva presencia de BA (Kevers *et al.*, 1984; Ziv, 1991). Debergh *et al.* (1992) explican que en los tejidos hiperhidratados se observa un exceso de agua, apariencia traslúcida y coloración anormal además de que la conexión del tallo con la raíz puede presentar imperfecciones.

Para *E. grusonii* el fenómeno de la hiperhidratación se presentó durante la fase de inducción en los explantes cuyas aréolas quedaron en contacto directo con el medio de cultivo, los brotes desarrollados presentaron un aspecto acuoso o cristalino de color verde-amarillento, aréolas con tricomas de color amarillo y espinas blancas (Imagen 8). Algunos de estos brotes presentaron mayor tamaño (2 a 4 cm) y en ocasiones se fragmentaron y formaron grietas en el tejido en donde se observó el desarrollo de tejido desdiferenciado con apariencia desmenuzable como si se tratase de callo. Estas observaciones concuerdan con las de Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) quienes explican que los brotes hiperhidratados presentan apariencia cristalina color verde con número de espinas reducido.

Los brotes hiperhidratados se observaron con baja frecuencia en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento y nula para el tratamiento control,

aunque BA presentó el mayor número (3.6 %) en comparación con 2iP y K (1.9 y 1.5 %) respectivamente. Kane (2000) señala que el empleo de altas concentraciones de citocininas produce brotes pequeños con síntomas de hiperhidratación. Sin embargo, los brotes hiperhidratados de *E. grusonii* presentaron mayor tamaño que los brotes normales. En *Mammillaria carmenae*, Anicua y Rivas (2000) obtuvieron 20% de brotes vitrificados (hiperhidratados) con apariencia acuosa-cristalina, frágiles y con malformaciones al emplear BA 5 mg/l y al parecer se cree que hay una estrecha relación entre BA y la hiperhidratación (Elías-Rocha *et al.*, 1998). Para *M. schiedeana* subsp. *schiedeana* Soria (2006) en los diferentes tratamientos donde empleo BA/ANA obtuvo un 40% de brotes con hiperhidratación.

Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002), para *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* del total de brotes generados solo obtuvieron el 5% de hiperhidratación, en *Mammillaria elongata* con el empleo de BA 0.2 mg/l se obtuvo el 50% de hiperhidratación (Papafotiou *et al.*, 2001), lo cual es muy elevado si se compara con el 3.6% obtenido en *E. grusonii* en los tratamientos de BA. Para *Mammillaria candida* también se ha presentado la hiperhidratación en baja frecuencia con 2.67% (Elías-Rocha, 1998). Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) observaron una alta hiperhidratación en 4 de la 6 especies de *Mammillaria* durante su cultivo *in vitro* en medio suplementado con BA 1 mg/l. Por lo contrario Giusti *et al.* (2002) encontraron que para *Escobaria minima*, al emplear BA 0.09 mg/l y *Pelecyphora aselliformis* con K 5 mg/l adicionado con ANA 0.01 mg/l no se presentó o fue muy baja la hiperhidratación respectivamente.

En el presente trabajo se observó que para *E. grusonii* la ocurrencia de brotes hiperhidratados se puede disminuir si se evita el contacto directo de las aréolas y brotes con el medio de cultivo, evitando el desarrollo de brotes con posibles anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas; características por las cuales difícilmente estos brotes llegan a transferirse con éxito a suelo (Majada *et al.*, 2000). Sin embargo, Elías-Rocha *et al.* (1998) y Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) concuerdan que para el cultivo de tejidos en cactáceas, la

hiperhidratación de los brotes se puede reducir empleando altas concentraciones de agar y bajas concentraciones de reguladores de crecimiento.

5. Proliferación de brotes

En el tratamiento control se obtuvo un total de 107 brotes por tratamiento lo que corresponde a 1.19 brotes por explante, el tamaño de la mayoría de estos fue de 0.5 cm aproximadamente, esto se atribuye a que los tejidos posiblemente contienen hormonas endógenas que permitieron su desarrollo, pero no fueron suficientes para que los brotes lo continuaran.

En reportes como el de Frías (1989), Machado y Prioli (1996), Anicua y Rivas (2000) y Mata *et al.* (2001), también se observó la formación de brotes en ausencia de reguladores de crecimiento. Anicua y Rivas (2000) encontraron en *Mammillaria carmenae* que el grupo control presentó el mayor número de brotes (8.95 brotes por explante), sin embargo, estos no presentaron características tan similares a la planta madre.

De acuerdo con George y Sherrington, (1984) al utilizar un medio sin reguladores de crecimiento se puede demostrar la habilidad que presentan los tejidos para responder a la inducción morfogénica, la cual es dada por el empleo de los reguladores de crecimiento. Además, explica que para que la morfogénesis sea posible, las células deben ser capaces de responder a los reguladores de crecimiento, es decir, deben ser competentes y tener la habilidad para responder a la inducción morfogénica (estímulos del medio, químicos o reguladores de crecimiento), logrando su desarrollo.

Con esto se confirmó que las plántulas de *E. grusonii* usadas como fuente de explantes fueron competentes y respondieron ante la inducción de los reguladores de crecimiento.

5.1. Tratamientos con BA

El mayor número de brotes se obtuvo en los tres tratamientos con BA, donde la concentración de 3 mg/l fue la más favorable con 659, seguida de 2 y 1 mg/l con 528 y 393 brotes respectivamente, generando de 4 a 7 brotes por explante.

De manera general esta citocinina ha sido utilizada sola o en combinación con auxinas en la propagación de cactáceas con resultados favorables (Tabla 7), se le considera el más efectivo para el control y crecimiento de yemas y meristemos por ser un compuesto muy activo (Hu y Wang, 1983; Krikorian, 1985; Kane, 2000).

Tabla 7.- Trabajos donde se ha utilizado BA para la formación de brotes, en diferentes especies de cactáceas.

| Especie | Reguladores de crecimiento (mg/l) | Respuesta <i>in vitro</i> (B/E) | Referencia |
|--|-----------------------------------|--|--|
| <i>Cereus peruvianus</i> | BA (1)/ANA (1) | Brotes | Machado y Prioli, 1996 |
| <i>Corypahnta radians</i> <i>Echinocactus platyacanthus</i> <i>Echinofossulocactus sp.</i> <i>Mammillaria candida</i> <i>M. craigii</i> <i>M. uncinata</i> <i>Stenocactus coptonogonus</i> | BA (1) | 4.15 9 12.05 13.25 4.65 5.25 16.75 | Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Astrophytum myriostigma</i> | BA (2) | Brotes | Villavicencio <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Echinocactus grusonii</i> <i>Mammillaria bocasana</i> <i>M. carmenae</i> | BA (5) | Callo y brotes | Anicua y Rivas, 2000 |
| <i>Turbincarpus laui</i> | BA 1.98 | 269 | Mata <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Mammillaria elongata</i> | BA (5)/ANA (0.19) | Brotes | Papafotiou <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Pelecyphora aselliformis</i> <i>P. strobiliformis</i> | 0.9 1.98 | 13.2 12.4 | Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002 |
| <i>Acharagama aguirreana</i> <i>Astrophytum ornatum</i> <i>Ferocactus flavovirens</i> <i>Pachycereus schottii</i> <i>Pilosocereus chrysacanthus</i> <i>Stenocereus stellatus</i> | 1 2 1 3 2 1 | 7 11 4.8 4.3 9.6 7 | Casto-Gallo <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Coryphanta werdermanii</i> <i>Echinocereus delaetii</i> <i>Echinocactus grusonii</i> | 1.5 1 2 | 2.9 4.1 4.1 | Lizalde-Viramontes <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>M. shiedeana</i> Subs. <i>shiedeana</i> | BA (1)/ANA (0.1) | 22.4 | Soria, 2006 |

B/E: brotes por explante, BA: N⁶ benciladenina, ANA: ácido naftalenacético.

Las concentraciones empleadas varían de 0.9 a 5 mg/l y su efecto primordial es el desarrollo de brotes, el número que se puede obtener variará en función del tipo de explante y la especie utilizada, como en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* que al emplear concentraciones de 0.9 y 1.98 mg/l los autores obtuvieron entre 12 y 13 brotes por explante, su aplicación sin la combinación de una auxina parece ser más efectiva como se observa en los resultados obtenidos por Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1998; Villavicencio *et al.* 1999; Mata *et al.* 2001; Castro-Gallo *et al.* 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Lizalde-Viramontes *et al.* 2004 (Tabla 7).

De los escasos reportes sobre la propagación *in vitro* para *E. grusonii* están el de Frías (1989) y el de Lizalde-Viramonte *et al.*, 2004, en el primero se empleó BA 4.5 mg/l sola o en combinación con auxinas y el autor señala que la combinación de ambas hormonas da como resultado una baja producción de brotes (2) y que el empleo de BA en ausencia de la auxina incrementó el número de brotes por tratamiento (5), el segundo reporte señala que empleando BA 2 mg/l obtuvieron 4.10 brotes por explante por activación areolar. El número de brotes obtenidos en el presente trabajo es de 5 a 7 brotes por explante en concentraciones similares empleadas en los reportes previos.

Para *E. grusonii* la presencia de BA fue aparentemente favorable en la cantidad de brotes obtenidos (1,580 brotes) pero no en su formación, debido a que el desarrollo de los mismos no fue el adecuado por la serie de anomalías que presentaron y por lo tanto con pocas posibilidades de enraizar y establecerse en condiciones *ex vitro*.

Este mismo fenómeno lo observaron Starling (1985) en *Ariocarpus trigonus*, *Obregonia denegrii* y *Astrophytum asterias* y Elías-Rocha *et al.* (1998) en *Mammillaria candida* con buenos resultados en el número de brotes por explante (7), pero los brotes obtenidos no presentaron características morfológicas bien definidas, por lo cual su sobrevivencia al momento de trasladarse a suelo no fue posible. Frías (1989) reporta igualmente que los brotes regenerados de *E. grusonii* con BA, presentaron crecimiento amorfo.

Estas anomalías presentadas son la combinación de diferentes factores. En 1998 Flinn *et al.* señalaron que la combinación entre el tipo de explante y regulador de crecimiento son necesarios para la formación de brotes, aunque también es importante el tiempo mínimo de exposición del explante con las hormonas, ya que un menor tiempo o por el contrario una exposición prolongada de las citocininas no mejorará la producción de brotes. Además de que los cambios anatómicos asociados con la organogénesis se incrementan, activan o suprimen dependiendo del regulador de crecimiento y de la concentración usada, así como del tiempo que el explante permanece en el medio (López-Escamilla, 2000). De acuerdo a lo anterior probablemente el tiempo de inducción de dos meses para los explantes de *E. grusonii* en BA, no fue el adecuado, ya que el 50.2% de los brotes obtenidos presentaron anomalías morfológicas (brotes sin calidad) situación que no se presentó en las otras dos citocininas empleadas (K y 2iP). Cabe mencionar que la mayoría de los brotes normales obtenidos no superaban los 0.7 cm de longitud por lo tanto no se consideraron como brotes de calidad.

5.2. Tratamientos con Kinetina

Con K la mejor concentración para la producción de brotes fue de 3 mg/l (244 brotes por tratamiento), seguida de 1 y 2 mg/l con 186 y 160 brotes respectivamente, generando un promedio de 1 a 2 brotes por explante.

Frías (1989) observó que el empleo de K 4.3 mg/l (20 μ M) en ausencia de auxinas en *E. grusonii* estimuló el desarrollo de brotes, obteniendo 3 por tratamiento y en combinación con AIA 0.5 mg/l se incrementó el número a 15 brotes, es importante señalar que Frías solamente utilizó 4 explantes por tratamiento, reportó un tipo de crecimiento amorfo y solo obtuvo el 57% de brotes de aspecto normal, lo cual es bajo comparado con el 84% obtenido en el presente trabajo con K 3 mg/l y a diferencia de Frías se emplearon 90 explantes por tratamiento, lo que proporciona una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos. Otro trabajo realizado con esta especie, es el de Anicua y Rivas (2000) que emplearon K 0.5, 1, 5 y 10 mg/l durante seis meses de inducción obteniendo principalmente la formación de callo, probablemente las altas concentraciones de

la citocinina así como el prolongado tiempo de exposición a la misma no permitió la formación de brotes, en cambio los mismos autores reportaron para *Mammillaria bocasana* y *M. carmenae* con K 5 y 10 mg/l respectivamente la formación de 15.1 y 30.1 brotes por explante.

El empleo de K en la propagación de cactáceas es menos empleado en comparación con BA, pero los reportes que se tienen han sido satisfactorios para algunas especies (Tabla 8), se puede observar que las concentraciones utilizadas son elevadas (10 mg/l) como en *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Mammillaria bocasana* siendo más efectiva para la primera especie, generando 25.2 brotes por explante y menos favorable para la segunda con 2.8 brotes por explante, como se observa, la misma concentración puede dar diferentes resultados.

Tabla 8.- Trabajos de propagación de cactáceas donde se ha empleado Kinetina.

| Especie | Kinetina (mg/l) | Respuesta <i>in vitro</i> (B/E) | Referencia |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Echinocactus grusonii</i> | K 4.3/AIA 0.8 | 9 (B/t) | Frías, 1989 |
| <i>Cereus peruvianus</i> | K 0.1 K 10/ANA 0.01 | 75 (B/t) 63 (B/t) | Machado y Prioli, 1996 |
| <i>Mammillaria candida</i> | 5 | 2 | Elías-Rocha <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i> | 10 | 25.24 | Bertaud de León <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>M. bocasana</i> | 5 10 | 15 12 | Anicua y Rivas, 2000 |
| <i>M. carmenae</i> | 1 10 | 23 30 | |
| <i>Epithelantha micromeris</i> | 8 | 17.25 | |
| <i>Mammillaria luethyi</i> | 1 | 1.58 | Escobedo <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Pelecypora aselliformis</i> | 5 | 10.2 | Giusti <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Mammillaria bocasana</i> | 10 | 2.8 | Ramírez <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>M. prolifera</i> | 1 | 2.5 | |
| <i>M. pectinifera</i> | K 10/AIA 4 | 4.5 | |
| <i>Echinocactus platyacanthus</i> | K 3/AIA 4 | 5.6 | |
| <i>Echinocereus schmolii</i> | K 10/AIA 1 | 2.4 | |

B/E: brotes por explante, B/t: brotes por tratamiento, K: kinetina, ANA: ácido naftalenacético, AIA: Ácido indolacético.

También en *Epithelantha micromeris* se puede observar que las altas concentraciones de K (8 mg/l) son satisfactorias en la producción de brotes,

generando 17.25 brotes por explante. Como es posible observar para *E. grusonii* en las diferentes concentraciones de Kinetina empleadas el número de brotes por tratamiento o por explante obtenidos son superiores en comparación con especies como *Mammillaria luethyi* que produjo 1.58 brotes por explante contra los 2 brotes por explante obtenidos en el presente trabajo. Así mismo se superó los 63 brotes por tratamiento obtenidos en *Cereus peruvianus* con K 10 mg/l, obteniendo 186 brotes para *E. grusonii* en K 1 mg/l.

Finalmente, en el presente trabajo al emplear K 3 mg/l y obtener un total de 244 brotes se mejoró y superó el número de nueve brotes por tratamiento obtenidos por Frías (1989) al utilizar K 4.3 mg/l.

Cabe mencionar que con esta citocinina también se presentaron brotes anormales: 1, 0.6 y 15% en K 1, 2 y 3 mg/l respectivamente.

5.3. Tratamientos con 2iP

En los ensayos realizados con 2iP se pudo observar que en las tres concentraciones ensayadas (1, 2 y 3 mg/l) el número de brotes por tratamiento fue de 221, 271 y 280 respectivamente, registrando entre 2 y 3 brotes por explante, con el 96 al 99% de brotes bien desarrollados.

El empleo de 2iP en esta especie lo reportó Frías (1989) utilizando 6 mg/l donde obtuvo 2 brotes por tratamiento y logró un incremento de 19 y 16 brotes por tratamiento al adicionar AIA 0.2 y 0.8 mg/l respectivamente. Estos resultados comparados con los reportados en el presente trabajo son bajos, debido a que Frías obtuvo 57 brotes repartidos en 6 tratamientos ya que sólo utilizó cuatro explantes por tratamiento en 2iP/AIA, en contraste a los 90 explantes por tratamiento utilizados en este trabajo, generando un total de 772 brotes en los tres tratamientos de 2iP, probablemente este número pudiera incrementarse al adicionar AIA como lo reporta Frías (1989).

En la tabla 9 se muestran algunas especies de cactáceas que han sido propagadas utilizando 2iP:

Tabla 9.- Lista de especies que se han propagado empleado 2iP en concentraciones de 1 a 10 mg/l

| Especie | 2iP (mg/l) | Respuesta <i>in vitro</i> (B/E) | Autor |
|-----------------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Mammillaria elongata</i> | 10 | n.e | Johnson y Emino, 1979 |
| <i>Echinocactus grusonii</i> | (6.78)/(AIA 0.2) | 19 (B/t) | Frías, 1989 |
| <i>Epithelanta micromeris</i> | (4)/ANA (0.2) | 14.75 | Velázquez y Soltero, 2001 |
| <i>Acharagma aguirreana</i> | 2 | 5.8 | Castro-Gallo <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Astrophytum ornatum</i> | 2 | 2.9 | |
| <i>Coryphantha elephantidens</i> | 3 | 1.8 | |
| <i>Ferocactus flavovirens</i> | 3 | 3.3 | |
| <i>Mammillaria bocasana</i> | 2 | 1.6 | |
| <i>Mammillaria oteroi</i> | 3 | 3.5 | |
| <i>Pachycereus schottii</i> | 3 | 2 | |
| <i>Pilosocereus chrysacanthus</i> | 2 | 2.2 | |
| <i>Stenocereus stellatus</i> | 3 | 3.7 | |
| <i>Thelocactus hexaedophorus</i> | 3 | 2.5 | |
| <i>Pelecyphora aselliformis</i> | 3.28 | 2.37 | |
| <i>Pelecyphora strobiliformis</i> | 3.28 | 2.26 | |

B/E: brotes por explante, B/t: brotes por tratamiento, 2iP: N⁶- 2, isopentenil adenina, ANA: ácido naftalenacético, AIA: Ácido indolacético, n.e: no especificado.

De acuerdo a estos reportes, se observa que los resultados obtenidos en el presente trabajo superan o igualan los obtenidos en otras cactáceas que se han propagado empleando las mismas concentraciones de 2iP (1, 2 y 3 mg/l), algunas de ellas son: *Astrophytum ornatum*, *Coryphantha elephantidens*, *Mammillaria bocasana*, *Pachycereus schottii*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Thelocactus hexaedophorus*, *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis* (Tabla 9).

Finalmente comparando los resultados, se observó que cada especie responde de manera diferente y requiere de niveles específicos hormonales, para obtener respuestas óptimas.

De manera general se pudo observar una relación proporcional entre el número de brotes regenerados y la concentración empleada, ya que aparentemente al incrementar la concentración aumentó el número de brotes por

explante obtenidos, registrando de 4.37, 5.87 y 7.32 brotes para BA 1, 2 y 3 mg/l y de 2.46, 3.01 y 3.11 brotes para 2iP 1, 2 y 3 mg/l respectivamente. En el caso de K esta relación no se observó, pero si se incrementó la cantidad de brotes de K 1 a 3 mg/l con 2.07 y 2.71 respectivamente.

Resultados similares reportaron Castro-Gallo *et al.* (2002) para *Astrophytum ornatum*, *Pachycereus schotti* y *Pilosocereus chrysacanthus*, observando que el número de brotes aumentaba conforme se aumentó la concentración de BA, al emplearse en concentraciones de 1 a 2 o de 1, 2 a 3 mg/l, con lo cual obtuvo de 2.7 a 3.8, de 2.5 a 4.3 y de 2.3 a 3.3 brotes para cada especie. Sin embargo, existen especies como *M. bocasana* y *Stenocereus stellatus* donde al aumentar la concentración de BA disminuye el número de brotes (Castro-Gallo *et al.*, 2002). En el mismo trabajo los autores emplearon 2iP y observaron que al aumentar la concentración de la hormona se incrementó la producción de brotes.

Por otro lado, en el presente trabajo en las concentraciones empleadas con BA desafortunadamente el desarrollo de los brotes se vio fuertemente afectado por una serie de anormalidades que dieron paso a lo que se denominó brotes anormales y al fenómeno de la hiperhidratación que no permitió su desarrollo, tan solo de los 659 brotes contabilizados para BA 3 mg/l únicamente 380 (57.6%) presentaron un buen aspecto pero su tamaño fue menor, (0.3-0.5 mm) con la base ancha y sin diferenciarse del explante, lo que dificultó su individualización. El resto de los brotes 261 (42.4%) mostraron anormalidades (Tabla 10).

Con K los brotes anormales estuvieron presentes en un 0.7 y 15.2% y la hiperhidratación entre el 0.8 y 3.8%, siendo considerablemente menor con respecto a BA, solamente K 3 mg/l presentó 37 brotes anormales (15.2%).

En presencia de 2iP las malformaciones fueron escasas (0.7%) así como el fenómeno de la hiperhidratación (0.9 – 2.9%) (Tabla 10).

Tabla 10.-Número de brotes obtenidos a partir de explantes longitudinales de *E. grusonii* después de dos meses de inducción bajo tres citocininas a diferentes concentraciones y un grupo control.

| Citocinina mg/l | Explantes con respuesta | % | Brotos por tratamiento | Brotos por explante | ± DS | Brotos normales | % | Brotos anormales | % | Brotos hiper-hidratados | % |
|-----------------|-------------------------|-------|------------------------|---------------------|------|-----------------|-----|------------------|-----|-------------------------|----|
| C | 0 | 75/90 | 83 | 107 | 1.19 | 0.09 | 107 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| K | 1 | 86/90 | 95 | 186 | 2.07 | 0.18 | 177 | 95.1 | 2 | 1.1 | 7 |
| | 2 | 81/90 | 90 | 160 | 1.78 | 0.17 | 159 | 99.3 | 1 | 0.7 | 0 |
| | 3 | 86/90 | 95 | 244 | 2.71 | 0.25 | 205 | 84 | 37 | 15.2 | 2 |
| 2iP | 1 | 86/90 | 95 | 221 | 2.46 | 0.22 | 219 | 99.1 | 0 | 0 | 2 |
| | 2 | 81/90 | 90 | 271 | 3.01 | 0.31 | 266 | 98.2 | 0 | 0 | 5 |
| | 3 | 82/90 | 91 | 280 | 3.11 | 0.28 | 270 | 96.4 | 2 | 0.7 | 8 |
| BA | 1 | 88/90 | 97 | 393 | 4.37 | 0.39 | 171 | 43.5 | 211 | 53.7 | 11 |
| | 2 | 89/90 | 98 | 528 | 5.87 | 0.44 | 177 | 33.5 | 322 | 61.0 | 29 |
| | 3 | 82/90 | 91 | 659 | 7.32 | 0.63 | 380 | 57.7 | 261 | 39.6 | 18 |

C: control, DS: error estándar

De acuerdo al análisis estadístico hubo diferencias significativas entre las hormonas en cuanto a la producción de brotes ($F=79.773$ y $P < 0.05$), encontrando que BA difiere significativamente de las otras dos citocininas ($P < 0.05$). Esto es relevante debido a que BA produjo el mayor número de brotes por explante. Así mismo, se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones empleadas ($F=7.412$, $P=0.001$), encontrando que 2 mg/l difirió estadísticamente de 1 y 3 mg/l ($P < 0.05$). De acuerdo a lo anterior la hormona y concentración ideal por el número de brotes que produce es BA 2 mg/l. Sin embargo, de acuerdo a las características o anomalías que presentaron los brotes obtenidos en BA se descarta que sea la citocinina adecuada, deduciendo que 2iP 3 mg/l es la óptima para la producción de brotes aunque 2iP da un menor número de brotes en comparación con BA y mayor que K, estos son de calidad y presentan las características distintivas de la especie desde el inicio de su formación hasta el momento de individualizarse.

De acuerdo con Hu y Wang (1983) y Kane (2000) 2iP es la citocinina usada con menor frecuencia para la propagación de especies en general, sin embargo,

suponen que su adición al medio de cultivo puede dar resultados óptimos como se observó en *E. grusonii* al formar el mayor número de brotes de calidad.

Aproximadamente el 90% (2744) de los brotes de *E. grusonii* obtenidos en la fase de inducción se individualizaron y enraizaron, y el resto no continuó con esta etapa debido a que presentaron un tamaño menor a 0.5 cm (principalmente los brotes normales obtenidos en BA) permaneciendo en el explante en medio MS basal para que continuaran con su crecimiento.

6. Individualización y enraizamiento de brotes

Brotes individualizados de 1 a 4 cm de longitud de *E. grusonii* provenientes de los diferentes tratamientos de inducción, se sembraron en medio MS y formaron raíces a partir de la zona central del brote, de manera espontánea después de 15 días de incubación (Imagen 9a).

Después de 45 días de incubación, el 100% de los brotes individualizados formaron raíces y la mayoría de estas fueron abundantes y presentaron de manera general una raíz primaria de color verde claro y raíces secundarias de color blanco o amarillo, con algunos pelos radicales café claro (Imagen 9b).

De acuerdo con Blažková *et al.* (1997) la inducción de raíces se puede presentar por la adición de auxinas, reducción de minerales o sacarosa, o modificación de la temperatura o el fotoperíodo. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se reporta el empleo de algún tipo de auxinas en el medio de cultivo para obtener la formación de raíces en los nuevos brotes, como Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), en su trabajo de propagación de 21 especies de cactáceas mexicanas obtuvo que todas respondieron y formaron raíces ante la inducción de auxinas ya sea AIB o AIA 0.5 ó 1mg/l. Papafotiou *et al.* (2001) emplearon medio con AIB para enraizar *Mammillaria elongata* y obtuvieron porcentajes del 50 a 67% de éxito.

Castro-Gallo *et al.* (2002) al agregar AIA y AIB al medio indujeron la formación de raíces en *Astrophytum ornatum*, *Mammillaria oteroi*, *Coryphantha elephantidens*, *Ferocactus flavovirens*, *M bocasana* y *Thelocactus hexaedrophorus*

con porcentajes de 73 a 96% y de 50 a 67% de éxito en el enraizamiento respectivamente. También para: *Acharagma aquirreana*, *Pachycereus schottii*, *Stenocereus stellatus* y *Pilosocereus chrysacanthus* (Castro-Gallo *et al.*, 2002), *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius *et al.*, 1999), la formación de raíces resultó ser exitosa empleando como enraizador medio adicionado con carbón activado. Sin embargo, Elías-Rocha *et al.* (1998) para *Mammillaria candida*, Mata *et al.* (2001) para *Turbiniacarpus laui* y Anicua y Rivas (2000) para *M. bocasana* y *M. carmenae*, reportaron que con el empleo de medio sin reguladores de crecimiento se obtuvo la formación de raíces.

E. grusonii después de 15 días presentó la formación de raíces vigorosas en medio MS sin reguladores de crecimiento, esto fue similar en *Turbiniacarpus laui*, que formó raíces en 2 semanas. En otras especies la formación de raíces fue tardada y tomó más de un mes para obtener su desarrollo, algunas de ellas son: *Carnegiea gigantea*, la cual tardó más de 6 semanas para obtener la formación de raíces adventicias (Baker y Marin, 1999), o *Cereus peruvianus* que después de 9 semanas formó raíces en todos los brotes (Machado y Prioli, 1996), y *Mammillaria candida* la cual tardó cerca de 4 meses para enraizar (Elías-Rocha *et al.*, 1998).

Burch y McWaw (2000) menciona que las citocininas son inhibidores del proceso de formación de raíces. Sin embargo, para ***E. grusonii*** las citocininas empleadas en el medio de inducción de brotes formaron parte importante en la formación de raíces.

7. Aclimatización

Para la propagación por medio de las técnicas de Cultivo de Tejidos, no sólo es importante la proliferación de plántulas; si no que éstas puedan adaptarse por completo al medio ambiente, es decir que tengan una transformación de la condición heterótrofa (cultivo *in vitro*) a una autótrofa (ambiente natural). Las plántulas propagadas *in vitro* se desarrollan dentro de envases con bajos niveles de luz, condiciones asépticas, en medio conteniendo nutrientes y azúcar como fuente de energía y en una atmósfera con humedad relativa elevada, por lo cual

su desarrollo es heterótrofo (Preece y Sutter, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadleček *et al.*, 2001).

Todas estas condiciones de cultivo contribuyen a anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas o a tener fenotipos con los cuales las plantas no sobreviven a las condiciones ambientales cuando se trasplantan directamente al campo o invernadero (Preece y Sutter, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1999).

Preece y Sutter (1991) explican que la aclimatación es el proceso durante el cual las plantas llegan a “acostumbrarse” a un nuevo clima o situación como resultado de un proceso natural. Aclarando que el proceso mediante el cual las plantas *in vitro* llegan a establecerse fuera del frasco de cultivo se llama **aclimatización**, el cual implica la intervención del hombre, guiando y manipulando los procesos por los que las plantas se acostumbran a las nuevas condiciones. Por lo tanto, es necesario acostumbrar a las plántulas a bajos niveles de humedad relativa, elevados niveles de luz, ambiente séptico y otras condiciones que llegan a estresar a las plantas micropropagadas (Hu y Wang, 1983; Preece y Sutter, 1991; Kane, 2000). Preece y Sutter (1991) y Pospíšilová *et al.* (1999) mencionan que las plantas tras acostumbrarse gradualmente a las nuevas condiciones, pueden incluso corregir las posibles anomalías fisiológicas y anatómicas. Lambers *et al.* (1991 citado por Rosas-López, 2002) argumentan que una planta ha sido aclimatizada por completo cuando ésta incrementa su resistencia al estrés que fue expuesta.

Las charolas con brotes enraizados de ***E. grusonii*** permanecieron 8 días bajo las condiciones de incubación, ya en condiciones de invernadero, los brotes enraizados se regaron moderadamente cada tercer día. Sin embargo, el principal problema que presentaron fue el estrés causado por la pérdida excesiva de agua. Fila *et al.* (1998 citado por Pospíšilová *et al.*, 1999) explican que en las plántulas provenientes del cultivo *in vitro*, la toma de agua se ve limitada por la poca conductividad hidráulica de la raíz y la mala conexión entre ésta y el tallo, y la poca toma de agua y la pérdida excesiva de ésta causan la desecación, la cual de acuerdo a Hu y Wang (1983) es la principal causa de muerte en esta etapa.

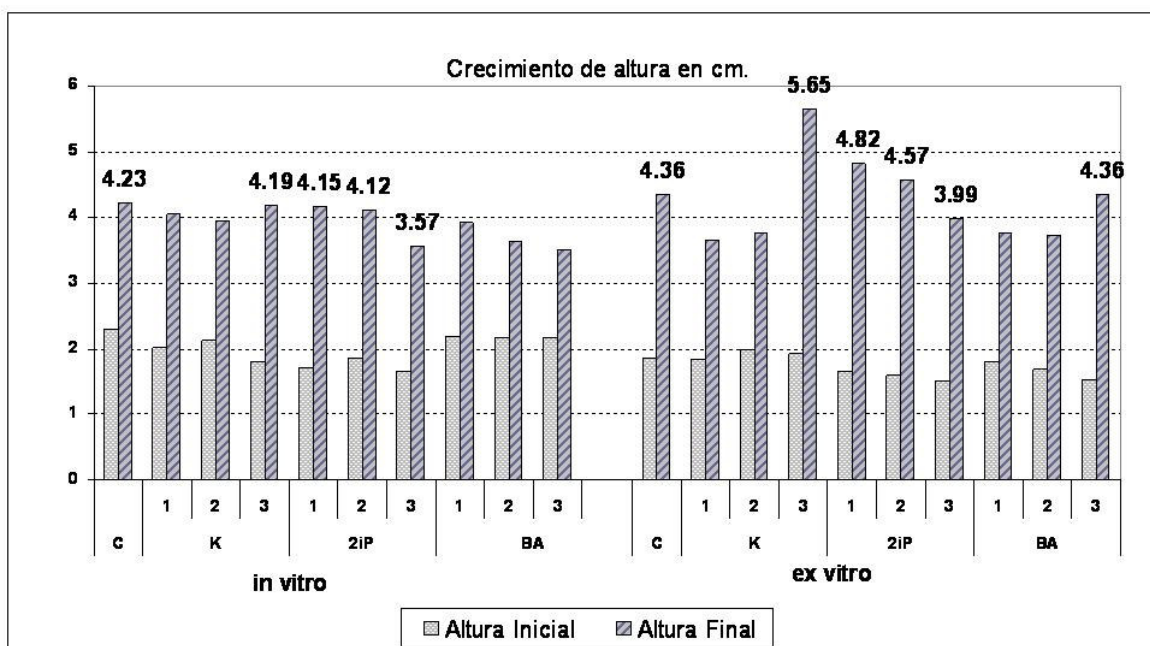
Para los brotes enraizados de *E. grusonii* el empleo de charolas con tapas de plástico transparente, ayudó a evitar o disminuir la desecación, permitiendo mantener la humedad y el agua.

Evaluación del crecimiento de los brotes

▪ Altura

Brotos con aclimatización previa in vitro

Después de 6 meses, los brotes aclimatizados incrementaron de una a dos veces su altura inicial promedio, la cual fue de 1.9 cm, al final de la evaluación los brotes provenientes de los tratamientos de inducción con K y 2iP, así como el control alcanzaron una altura promedio de 4 cm, a excepción del tratamiento de 2iP 3 mg/l (3.57 cm) así como de los brotes provenientes de los tratamientos con BA que alcanzaron una altura ligeramente menor de 3 cm en promedio (Grafica 2).



Gráfica 2.- Medidas inicial y final en cm del crecimiento de la altura en brotes de *E. grusonii* aclimatizados por dos vías (*in vitro* y *ex vitro*), provenientes de las diferentes concentraciones de citocininas. El mayor crecimiento se presentó en los brotes aclimatizados directamente en sustrato (*ex vitro*).

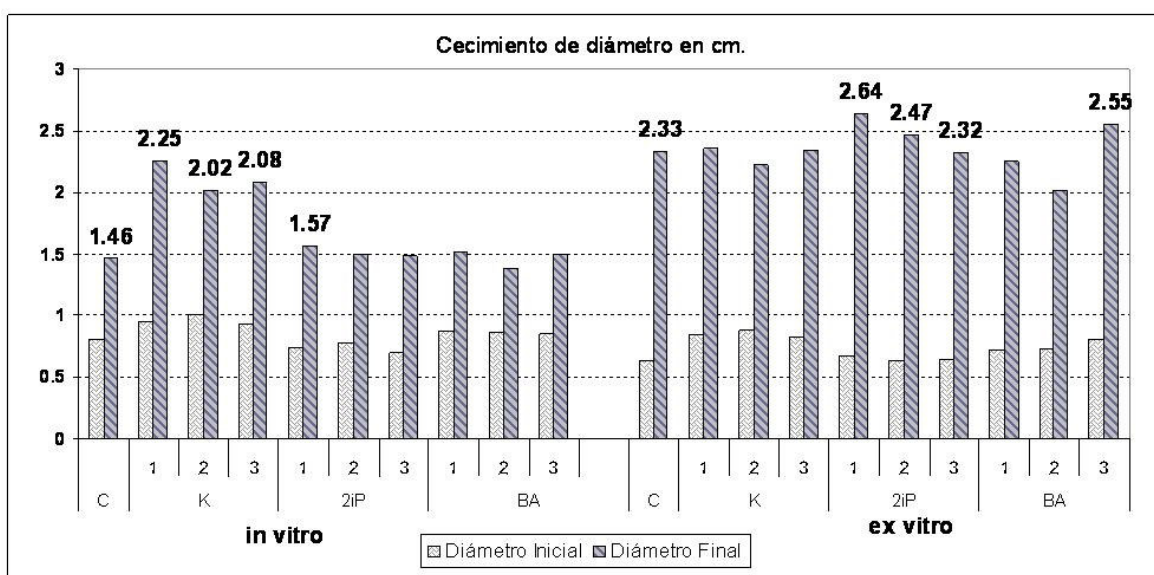
Brotos con aclimatización directa a sustrato (ex vitro)

Los brotes por esta vía de aclimatización crecieron de dos a tres veces su altura promedio inicial que fue de 1.7 cm. La mayoría de los brotes procedentes de los diferentes tratamientos ensayados alcanzaron una altura final en un rango de 3.5 a 4.8 cm, a excepción del tratamiento K 3 mg/l que registró la mayor altura promedio de 5.65 cm (Gráfica 2),

▪ **Diámetro**

Brotos con aclimatización previa in vitro

Los brotes colocados *in vitro* antes de su transferencia a suelo incrementaron cerca del doble su diámetro promedio inicial, ya que crecieron en un rango de 0.53 hasta 1.30 cm como máximo. El mayor crecimiento se registró en los tratamientos con K 1, 2 y 3 mg/l con 2.25, 2.02 y 2.08 cm de diámetro promedio final respectivamente, seguidos de 2iP y BA que presentaron un diámetro final promedio menor a 1.6 cm (Gráfica 3).



Gráfica 3.- Medidas inicial y final en cm del crecimiento de diámetro en brotes de *E. grusonii* aclimatizados por dos vías (*in vitro* y *ex vitro*), provenientes de las diferentes concentraciones de citocininas. El mayor crecimiento se presentó en los brotes aclimatizados directamente en sustrato (*ex vitro*).

Brotos con aclimatización directa a sustrato (ex vitro)

Los brotes transferidos directamente a condiciones *ex vitro* incrementaron de 3 a 4 veces su diámetro inicial promedio, principalmente aquellos provenientes de los tratamientos de 2iP 1, 2 y 3 mg/l que inicialmente midieron 0.68, 0.63 y 0.65 cm y al final presentaron un diámetro promedio de 2.64, 2.47 y 2.32 respectivamente, al igual que el grupo control. El resto de los brotes provenientes de K y BA presentaron un diámetro promedio final en un rango de 2.02 a 2.36 cm, aunque en BA 3 mg/l el diámetro promedio final fue superior ya que midió 2.55 cm (Gráfica 3).

Para los brotes provenientes del tratamiento control, el aumento en diámetro y altura se observó principalmente en la aclimatización directa a sustrato (*ex vitro*), presentando una altura y diámetro promedio final de 4.36 y 2.33 cm respectivamente.

El óptimo crecimiento de las plántulas de *E. grusonii* sin importar el medio de inducción del que provengan, de manera general se observó en la aclimatización directa a sustrato (*ex vitro*), logrando finalmente, que estas se acostumbraran y desarrollaran bajo condiciones de invernadero.

De acuerdo al análisis estadístico hubo diferencias significativas entre las hormonas en cuanto al crecimiento de los brotes con aclimatización previa *in vitro* ($F=4.571$ y $P=0.011$). Los brotes provenientes del tratamiento de inducción 2iP difieren significativamente de las otras dos citocininas en cuanto a su crecimiento ($p < 0.05$). Así mismo, de acuerdo al análisis estadístico hubo diferencias significativas entre las hormonas en cuanto al crecimiento de los brotes con aclimatización directa a sustrato (*ex vitro*) ($F= 23.89$ y $P= <0.01$). Para los brotes aclimatizados directamente en sustrato, se observó que aquellos provenientes de los tratamientos de inducción con 2iP difieren significativamente de BA y K ($P < 0.05$), en cuanto al crecimiento de los brotes. Esto es relevante debido a que los brotes aclimatizados previamente *in vitro* como *ex vitro* provenientes de los tratamientos de inducción de 2iP son los que presentaron los valores de crecimiento más altos, además de presentar desde el inicio de su formación las

características morfológicas definidas y distintivas de la especie, considerándolos brotes de calidad.

8. Sobrevivencia

En seis de los diez tratamientos ensayados, se registraron los mayores porcentajes de sobrevivencia con valores superiores al 90% y para los brotes aclimatizados directamente *ex vitro* sólo cuatro de los diez tratamientos fueron mayores al 90% (Tabla 11).

El porcentaje de sobrevivencia más bajo registrado para la aclimatización previa *in vitro* se obtuvo para los brotes enraizados de K 1 mg/l (65 %), BA 3 mg/l (74 %), BA 2 y K 3 mg/l (82 %), y el mayor éxito de sobrevivencia se obtuvo con los tres tratamientos con 2iP al obtener 100 % para 2 y 3 mg/l y 94 % para 1 mg/l.

En los brotes aclimatizados directamente en sustrato (*ex vitro*) los mayores porcentajes de sobrevivencia se presentaron en plantas provenientes de K al obtener el 100% en 1 y 3 mg/l y un 94% en K 2 mg/l. Para los brotes provenientes de 2iP se obtuvo una sobrevivencia de 80, 76 y 67% y BA 77, 68 y 92% para 1, 2 y 3 mg/l respectivamente.

Tabla 11.- Porcentaje de sobrevivencia en brotes de *E. grusonii* aclimatizados por dos vías (previa *in vitro* y directa a sustrato -*ex vitro*) y provenientes de los diferentes medios de inducción con citocininas.

| Tratamiento (mg/l) | %SOBREVIVENCIA | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | Aclimatización | |
| | <i>in vitro</i> | <i>ex vitro</i> |
| control | 100 | 83 |
| K | 1 | 65 |
| | 2 | 100 |
| | 3 | 82 |
| 2iP | 1 | 94 |
| | 2 | 100 |
| | 3 | 100 |
| BA | 1 | 96 |
| | 2 | 82 |
| | 3 | 74 |

La menor tasa de sobrevivencia reportada en los brotes aclimatizados en sustrato se debió a la muerte de las plantas durante el periodo de aclimatización en condiciones de invernadero. Ya que esta fue inevitable debido al estrés causado por la pérdida excesiva de agua, que se presentó en las primeras semanas después de colocarse en condiciones de invernadero. Roberts *et al.* (1990) y Collin y Edwards (1998) explican que cuando las plantas desarrolladas *in vitro* se traspasan a condiciones de invernadero, el agua se pierde rápidamente debido a que los estomas no responden al estímulo que normalmente induce el cierre, perdiendo el agua por la cutícula que está poco desarrollada.

Durante el establecimiento de las plántulas de *E. grusonii* a condiciones de invernadero se observó que la coloración verde del tallo cambió a un tono rojizo, debido probablemente a la incidencia solar, observando que la parte cubierta por el sustrato permaneció de color verde, mientras que la porción fuera del sustrato se enrojeció.

Con un cubo de madera cubierto por malla de sombra 70%, se ayudó a disminuir la incidencia solar ya que dentro de este fue de $95.55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y fuera de él de $435 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, por lo tanto el cambio de coloración se evitó. De acuerdo con Kadleček *et al.* (2001) el uso de sombra ayuda a reducir la irradiación durante los primeros días de la aclimatización. Pospíšilová *et al.* (1999) plantean que en el invernadero la irradiación solar es mucho más alta y la humedad es más baja que en los envases de cultivo.

Probablemente la pérdida de agua se debió a que cuando las plántulas se traspasaron a sustrato y al tratar de quitar el exceso de agar de las raíces, estas se dañaron, principalmente a nivel de los pelos radicales, con lo cual la absorción de agua y nutrientes por medio de las raíces pudo verse afectado (Roberts *et al.*, 1990; Collin y Edwards, 1998; Kadleček *et al.*, 2001; Debergh y Maene, 1981 citado por Preece y Sutter, 2001). Cabe mencionar que de acuerdo a Preece y Sutter (2001) las raíces producidas *in vitro* no son funcionales, llegando a existir una

pobre conexión de éstas con el tallo, las cuales al transferirse a suelo mueren, pero se desarrollan raíces nuevas que sí son funcionales (Collin y Edwards, 1998).

Para los brotes enraizados de *E. grusonii*, una vez colocados en sustrato, la formación de las nuevas raíces fue notorio, y se observó que éstas se desarrollaron en la base de la planta, debajo de las raíces producidas *in vitro*, las cuales conforme a su crecimiento empujaron las raíces formadas *in vitro* hasta desprenderlas por completo y finalmente se secaron y murieron. La transferencia de los brotes enraizados de *E. grusonii* provenientes de los tratamientos de inducción a sustrato fue exitosa, ya que el desarrollo y crecimiento de diámetro y altura de estos fue notorio (Imagen 10 y 11). De acuerdo con Pospíšilová *et al.* (1999) y Kadleček *et al.* (2001) el traspaso de las plántulas *in vitro* a condiciones *ex vitro* se considera exitoso cuando es notorio el incremento del desarrollo de las plantas.

Pocas son las especies en las cuales se reporta el establecimiento de plántulas en condiciones de invernadero. Algunas de ellas como: *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius *et al.*, 1999), *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003) *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1998), *Pelecypora aselliformis*, *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *Mammillaria elongata* (Papafotiou *et al.*, 2001), *Acharagma aguirreana*, *Astrophytum ornatum*, *Coryphantha elephantidens*, *Ferocactus flavovirens*, *Mammillaria bocasana*, *M. oteroi*, *Pachycereus schottii*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Stenocereus stellatus*, *Thelocactus hexaedophorus* (con 90 a 100% de sobrevivencia en sustrato) (Castro-Gallo *et al.*, 2002), entre otras.

Para Johnson y Emino (1979) la transferencia de los brotes de *Mammillaria elongata* obtenidos *in vitro* fue exitosa, ya que bajo condiciones de invernadero se enraizaron y continuaron su desarrollo. Utilizaron como sustrato vermiculita y perlita (1:1) y cubriendo con bolsas de plástico perforándolas después de dos semanas, tiempo en el cual se adaptaron al invernadero y establecieron raíces funcionales. Estos autores observaron que la transferencia de brotes pequeños no fue exitosa.

Para los trabajos realizados con *E. grusonii* como el de Frías (1989), Martínez *et al.* (2002) y Lizalde-Viramontes *et al.* (2004) no se reporta la transferencia de los brotes obtenidos a condiciones de invernadero, o como en el caso de Anicua y Rivas (2000), donde este proceso no se realizó debido a que no obtuvieron la formación de brotes.

A la fecha se tienen 2294 brotes en condiciones *in vitro* y 533 plántulas de ***E. grusonii*** en condiciones de invernadero.

VII. CONCLUSIONES

- Por medio del Cultivo de Tejidos Vegetales se logró obtener la propagación de *E. grusonii* a partir de plántulas germinadas *in vitro*.
- La germinación de semillas se logró en los tres medios ensayados, principalmente en Agua-Agar (95%) y MS 50% (94%), sin embargo, el medio MS 50% fue el óptimo en la germinación de semillas de *E. grusonii* por las características de crecimiento que presentaron las plántulas desarrolladas en este medio.
- El proceso de escarificación y desinfección fue un paso importante para el establecimiento *in vitro* de *E. grusonii*, y da la posibilidad de aplicarse en las especies de este género.
- Todos los brotes formados en el medio de inducción se obtuvieron por **organogénesis directa**.
- La regeneración apical, rizogénesis e hiperhidratación se presentaron en rangos del: 25 al 54%, 37 al 84% y 0.8 al 3.8% respectivamente de manera indistinta en todos los tratamientos ensayados.
- En el tratamiento control (sin reguladores de crecimiento) se obtuvo la proliferación de brotes, (107 brotes) y con desarrollo mínimo.
- La concentración óptima para la proliferación de brotes de *E. grusonii* fue 2iP 3 mg/l (280 brotes), presentaron morfología adecuada y tuvieron el mayor crecimiento durante la aclimatización.
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hormonas y concentraciones empleadas para la proliferación de brotes, encontrando que BA 2 mg/l fue la más representativa, sin embargo, los

brotos formados presentaron anomalías morfológicas o síntomas de hiperhidratación.

- Se observó una relación proporcional entre el número de brotes y la concentración de citocinina empleada en el caso de BA y 2iP.
- El 100% de los brotes individualizados formaron sus raíces de manera espontánea en 15 días en medio MS basal y sin la adición de auxinas.
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de los brotes aclimatizados tanto *in vitro* como *ex vitro*.
- La aclimatización directa fue la más favorable sin importar el tratamiento de inducción del que provenían registrando un 67 al 100% de sobrevivencia.
- Con los resultados obtenidos fue posible corroborar que los mejores resultados del sistema de micropropagación propuesto para *E. platyacanthus* fue eficiente para *E. grusonii* y dan la posibilidad de emplearse en la propagación de otras especies pertenecientes al mismo género.

Propuestas a futuro

- De acuerdo a ensayos posteriores, fue posible determinar que el empleo de explantes longitudinales de *E. grusonii* mayores a 2 cm pueden incrementar el número de brotes obtenidos, debido a la gran cantidad de aréolas presentes en los explantes por lo que se recomienda utilizar esta medida o realizar ensayos específicos con relación al tamaño del explante inicial, así mismo para los tratamientos con BA, es necesario realizar a futuro ensayos sobre el tiempo de inducción (menor a 2 meses) para tratar de reducir el número de brotes con anomalías, así como la hiperhidratación y de este modo favorecer la producción de brotes con características deseables debido a que esta citocinina es la que produce un mayor número de brotes por explante.

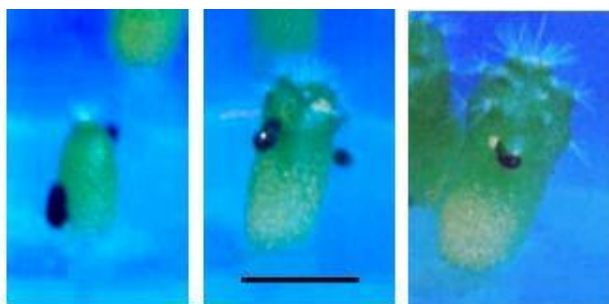


Imagen1: Germinación. Diferencias en el desarrollo morfológico entre plántulas de *E. grusonii*, cultivadas en tres medios de germinación. Izquierda medio Agua/Agar, centro MS100% y derecha MS 50% (escala: 0.6 cm).

Imagen 2: Activación areolar. a) Aréolas con espinas delgadas, escasas y traslucidas al inicio de la inducción hormonal (escala: 0.2 cm), b) intensificación y desarrollo de tricomas y espinas en las aréolas después de 18 días de inducción (escala: 0.2 cm), c) crecimiento de las aréolas con tricomas en forma de algodoncillos blancos (escala: 0.4 cm). d) Crecimiento, diferenciación y formación de brotes en explante de *E. grusonii* en medio de inducción, a partir de la activación de aréolas (escala: 0.6 cm).

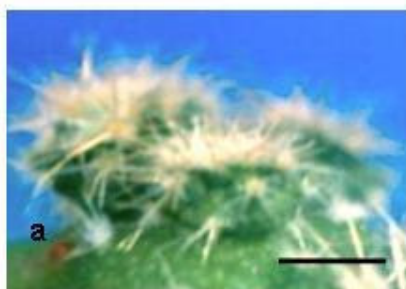
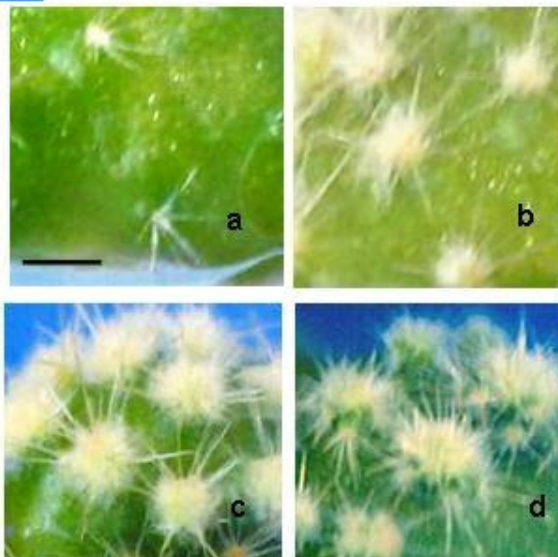


Imagen 3: Brotes normales. Brotes de calidad, formados en: a) tratamiento sin hormonas, b) tratamientos con 2iP y c) tratamientos con Kinetina (escala: 0.7 cm).

Imagen 4: Brotes anormales. a) Aglomeración de brotes anormales característico de los tratamientos con BA. b) Explante con BA 2 mg/l, formación de brotes con morfología normal (Bn) y brotes anormales (Ba) con tubérculos y tricomas blancos en forma de telaraña cubriendo el brote (escala: 1 cm).

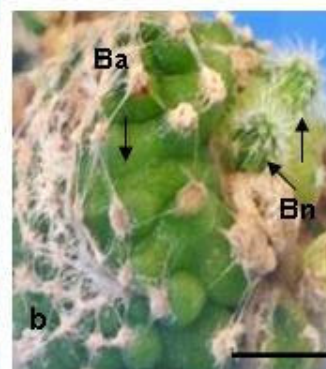


Imagen 6: Regeneración apical. a) regeneración apical del explante y formación de brotes en la parte dorsal del explante (escala 0.6 cm). b) regeneración apical del explante después de 25 días en medio de inducción (escala: 0.8 cm).

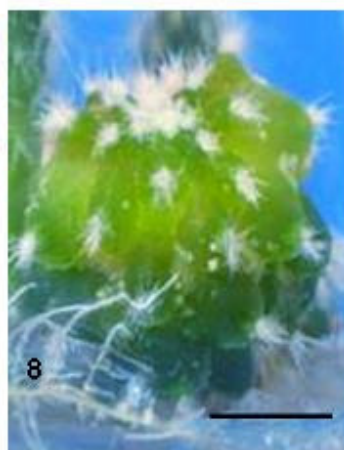
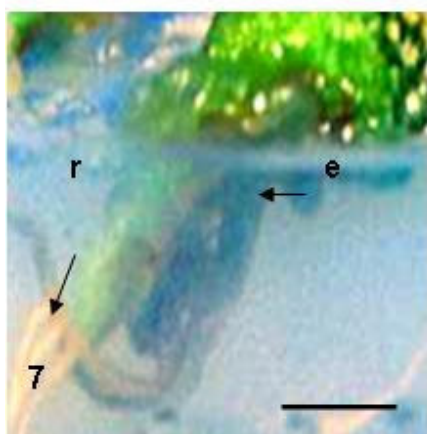
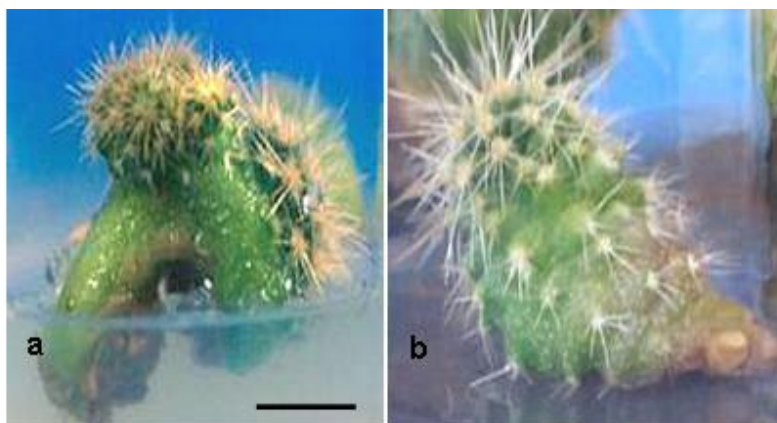


Imagen 7: Rizogénesis. Formación de raíces después de 20 días en medio de inducción. Se observa un eje principal (e) y raíces secundarias (r) (escala: 0.8 cm).

Imagen 8: Hiperhidratación. a) brote hiperhidratado con apariencia cristalina, tallo verde claro y espinas blancas (escala: 1.5 cm).

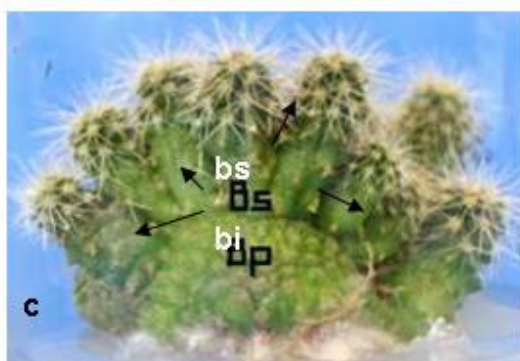


Imagen 5: Brotes anormales: a) brotes secundarios (bs) con ápice dicotómico, en medio de inducción BA, formados a partir de un brote inicial (bi) (escala: 1 cm), b) brote crestado formado en medio de inducción BA (escala: 0.5 cm) y c) brote inicial crestado (bi) que formó en la parte apical brotes secundarios (bs) de morfología normal (escala: 1 cm).

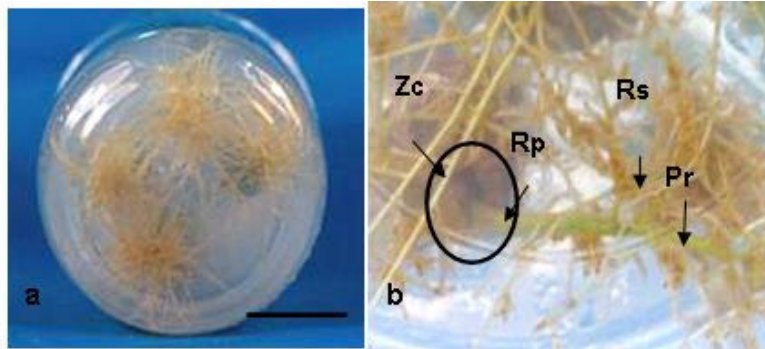


Imagen 9: Enraizamiento de brotes. a) vista inferior del frasco de cultivo, se observa el desarrollo de raíces espontáneamente en 4 brotes de *E. grusonii* a los 15 días en medio MS basal (escala: 2.8 cm). b) raíces de un brote de 40 días en medio MS basal, se observa el origen de la raíz (O) en la parte inferior central de este, formando una raíz primaria (Rp) verde claro, raíces secundarias (Rs) blancas o amarillentas y pelos radicales (Pr) abundantes de color café claro (escala: 1 cm).



Imagen 10: Plantas en condiciones de invernadero. Vista superior de una charola con plantas de *E. grusonii* aclimatizadas en condiciones de invernadero (escala: 4.5 cm).



Imagen 11: Plantas de *E. grusonii* con 22 meses en condiciones de invernadero (escala: 8.5 cm).

VIII. ANEXOS

Anexo 1.- Descripción botánica según Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991

Echinocactus grusonii conocido comúnmente como “Barril dorado o asiento de suegra” es una especie que presenta tallos grandes, simples, globosos, con el tiempo cilíndricos, a veces producen brotes en la base, de 20 a 130 cm de altura, frecuentemente de 40 a 80 cm de diámetro, de color verde claro; ápice con lana amarilla. *Costillas* 21 a 37 más bien delgadas y altas. *Aréolas* grandes, alargadas, distantes entre sí cerca de 1 cm a veces más o menos confluentes, las cercanas al ápice con lana amarillenta. *Espinas* de color amarillo oro cuando jóvenes, después más pálidas, y las viejas con algo de tinte castaño. *Espinas radiales* 8 a 10, subuladas, de 3 cm de longitud. *Espinas centrales* generalmente 4, hasta de 5 cm de longitud. *Flores* de 4 a 6 cm de longitud y 5 cm de diámetro, que no se abren ampliamente; pericarpelo esferoidal llevando escamas acuminadas que desarrollan en sus axilas abundante lana; tubo receptacular de 3 cm de diámetro, cubierto con escamas lanceoladas y largamente acuminadas; segmentos exteriores del perianto largamente acuminados, de color castaño en el envés y amarillo en el haz; segmentos interiores del perianto de color amarillo cadmio, con brillo sedoso, erectos, angostamente lanceolados, acuminados, más cortos que los exteriores; estambres numerosos, conniventes, formando un grueso cilindro en el centro, amarillos; estilo amarillo; lóbulos del estigma 12. *Fruto* oblongo hasta esférico, de 12 a 20 mm de longitud, de pared delgada, cubierta con escamas y lana blanca o desnudo hacia abajo. *Semillas* de 1.5 mm de longitud; testa brillante, de color castaño.

Anexo 2.- **Formulación del Medio Murashige & Skoog (MS), 1962.**

| Elementos | Concentración (mg/l) | |
|---|----------------------|-----------|
| | MS | MS 50% |
| MACRONUTRIENTES | | |
| NH ₄ NO ₃ | 1.65 | 0.825 |
| KNO ₃ | 1.9 | 0.95 |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 0.37 | 0.185 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.17 | 0.085 |
| CaCl ₂ | 0.44 | 0.22 |
| MICRONUTRIENTES | | |
| KI | 0.00083 | 0.000415 |
| H ₃ BO ₃ | 0.0062 | 0.0031 |
| MnSO ₄ •H ₂ O | 0.01689 | 0.008445 |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O | 0.0086 | 0.0043 |
| Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O | 0.00025 | 0.000125 |
| CUSO ₄ •5H ₂ O | 0.000025 | 0.0000125 |
| CoCl ₂ •6H ₂ O | 0.000025 | 0.0000125 |
| Sol Fe | | |
| Na ₂ EDTA | 0.0373 | 0.01865 |
| FeSO ₄ •7H ₂ O | 0.0278 | 0.0139 |
| INOSITOL | 0.1 | 0.05 |
| VITAMINAS | | |
| Ácido nicotínico | 0.0005 | 0.00025 |
| Piridoxina-HCl (B6) | 0.0005 | 0.00025 |
| Tiamina-HCl (B1) | 0.0001 | 0.00005 |
| GLICINA | 0.002 | 0.001 |
| SACAROSA | 30 | 15 |
| AGAR | 8 | 8 |
| pH | 5.7 - 5.8 | |

La esterilización del material y medio de cultivo se realizó en un autoclave a 121 °C y 1.5 kg/cm² de presión durante 18 minutos.

IX. BIBLIOGRAFIA

- **Agramonte, P. D., T. F. Jiménez y R. M. A. Dita.** 1998. Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 193-206.
- **Anderson, E. F.** 2001. The cactus family. Timber press. Portland, Oregon. 93-103.
- **Andrew, S. P.** 2002. Conservation Biology. Ed. Cambridge. Cambridge United Kingdom. 345.
- **Anicua, F. J y B. R. V. Rivas.** 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de licenciatura. Biólogo Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Arias, S., U. Guzmán, M. Mandujano, M. Soto-Galván. y J. Golubov.** 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2011 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 50(4):100-125.
- **Baker, W. P. y L. E. Marin.** 1999(8). Successful cloning of the “saguaro” (*Carnegiea gigantea*, Cactaceae). *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 31(2):97-100.
- **Barba, A. A.** 1991a. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. 232.
- **Barba, A. A.** 1991b. Cultivo de callos. En: Hurtado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. 232.
- **Bárcenas, R. T.** 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* 68:11-15.
- **Becerra, R.** 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. Año 6 Núm. 32:2-5.

- **Benítez, H. y P. Dávila.** 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas*. Año 6 Núm. 40:8-11.
- **Bertaud de León, A., B. I. Escobedo, M. R. Rojas y H. T. García-Osuna.** 1999. Propagación *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). En Resúmenes: I Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y Otras Plantas Suculentas. Oaxaca, Oax. México. 126.
- **Bidwell, R. G. S.** 1990. Fisiología Vegetal. AGT editor, S. A. México, D. F. 784.
- **Blažková, A., B. Sotta, H. Tranvan, R. Maldiney, M. Bonnet, J. Einhorn, L. Kerhoas y E. Miginiac.** 1997. Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervirens*. *Physiologia plantarum* 99: 73-80.
- **Bravo-Hollis, H.** 1978. Las cactáceas de México. UNAM. México. 743.
- **Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada.** 1991. Las cactáceas de México Vol. III. UNAM. México, D. F. 643.
- **Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar.** 1999. El interesante mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica, México. 233.
- **Brown, J. T. y B. V. Charlwood.** 1990. Organogenesis in Callus Culture. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Human press. New Jersey. 65-70.
- **Burch, L. R. y B. A. McGaw.** 2000. Citoquininas. En: Azcon-Bieto, J. y M. Talon. (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill. 319-326.
- **Castro-Gallo, I. A., E. Meza-Rangel, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Bach.** 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies Mexicanas de Cactáceas. *Scientiae Naturae*. 4 (2): 5-24.
- **Challenger, A.** 1998. Utilización y Conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO. México. 847.
- **Cházaro, M., M. P. Hernández y J. Cortés.** 2001. Las Cactáceas: Joyas de la Flora Mexicana. *Biodiversitas*. Año 11. Vol. 10. Núm. 5:19-23.
- **Collin, H. A. y G. S. Edwards.** 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157.

- **Corona, V. M. y V. M. Chávez-Ávila.** 1982. Cultivo de cactáceas en Medios Asépticos. *Cact. Suc. Mex.* XXVII. 17-23.
- **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 Publishers. 1-11.
- **Debergh, P. C.** 1987. Improving micropropagation. Newsletter IAPTC. Núm. 51:2-10.
- **Debergh, P., J. Aitken-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.
- **Debergh, P., J. De Riek y D. Mathys.** 1994. Nutrient supply and growth of plants in culture. En: Lumsden, P. J., J. R. Nicholas y W. J. Davies (eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in culture,* Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 58-68.
- **Domínguez, S. J. A. y S. J. A. Domínguez.** 1976. Aspectos químicos de las Cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* XXI. 39-47.
- **Doods, J. H. y L. W. Roberts.** 1995. Culture of plant cells, tissues, and organs. *Experiments in Plant Tissue Culture.* Cambridge University Press, USA. 3-15.
- **Elías-Rocha, M. A., M. S. Santos-Díaz y A. Arredondo-Gómez.** 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by Tissue Culture Techniques. *Haseltonia.* 6:96- 101.
- **Escobedo, B. L., O. H. T. García y M. R. Rojas.** 2002. Propagación *in Vitro* de *Mammillaria luethyi* G. S. Hinton. En: Martínez-Avalos, J. G (ed.). Resúmenes del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y Otras plantas Suculentas. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria. 69-70.
- **Evans, N. E.** 1990. Micropropagation, axillary bud multiplication. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.). *Methods in Molecular Biology, Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture.* Human press. New Jersey. 93-103.

- **Fakhrai, H. K. 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. Human press. New Jersey 49-56.
- **Fay, M. F., J. Gratton y P. J. Atkinson.** 1995. Tissue culture of succulent plants- An annotated bibliography. *Bradleya*. 13:38-42.
- **Fitz, M. W. A. y E. F. Anderson.** 1997. México. En: Oldfield, S. (ed.). Status Survey and Conservation Action Plan. Cactus and Succulent Plants. UICN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 89-99.
- **Frías, D. P. M. E.** 1989. Desarrollo morfológico para la propagación vegetativa de *Echinocactus grusonii* Hildman (Cactaceae), mediante Cultivo de Tejidos. Tesis Licenciatura. Biólogo Los Reyes Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 87.
- **Fuentes, M. V. y M. N. M. Martínez.** 2001. Micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de aréolas activadas *in vivo* por etiolación. Tesis Licenciatura. Biólogo. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- **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, Dev. Biol.-Plant*. 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. 690.
- **Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci.** 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 95: 319-332.
- **Glass, C.** 1998. Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México. Fideicomiso Fondo para la Biodiversidad. México. Vol. 1.
- **Gómez, K. R.** 1998a. Cultivo de células y tejidos. En: Pérez Ponce, J. (ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 25-44.

- **Gómez, K. R.** 1998b. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, J. (ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 57-79.
- **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. Human press. New Jersey. 219-225.
- **Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila.** 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM-CONABIO. México. 315.
- **Hernández, H. M.** 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de cultura económica. México, D. F. 188.
- **Hernández, H. M. y A. H. Godínez.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52.
- **Hill, T. A.** 1977. Cuadernos de Biología. Hormonas Reguladoras del crecimiento Vegetal. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 74.
- **Hu, C. Y. y P. J. Wang.** 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans D. F., W. R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). Basic Techniques of Plant Cell Culture. Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. 177-227.
- **Jiménez, G. E. A.** 1998. 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. 13-24.
- **Johnson, J. L. y E. R. Emino.** 1979. *In vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience*. 14 (5):605-606.
- **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.
- **Kane, M. E.** 2000. Propagation from preexisting meristems. En: Trigiano, R. N. y D. J. Gray (eds.). Plant Tissue Culture and laboratory exercises. Washington. 75-86.

- **Kevers, C., M. Coumans, M. F. Coumans-Gillés y Th. Gaspar.** 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultures *in vitro*. *Physiol. Plant.* 61: 69-74.
- **Krikorian, A. D.** 1985. Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia 42-72.
- **Landrum, J. M.** 2002. Four succulent families and 40 million year of evolution and adaptation to xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon* 51: 463-473.
- **Lizalde-Viramontes, H., Pérez-Molphe-Balch. E., Pérez, P. M. E., Dávila, F. C.** 2004. Propagación por técnicas del Cultivo de Tejidos en Cactáceas de los géneros *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*. En: Hernández, R. M. P., H. R. M. Cházaro, B. M. J. Cházaro y G. J. A. Vázquez (eds.). Resúmenes IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. Guadalajara, Jalisco, México. 268.
- **López-Escamila, A. L.** 2000. Organogénesis *in vitro* y adquisición de la competencia morfogénica a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*, Martínez (Gymnospermae) especie en Peligro de Extinción. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 130.
- **Machado, M. F. P. S. y A. J. Prioli.** 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 32: 199-203.
- **Majada, J. P., F. Tadeo, M. A. Fal y R. Sánchez-Tamés.** 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
- **Martínez, F. L. E., S. G. León, G. J. Prado, C. J. A. Lechuga, S. F. Cruz, H. Serrano y S. M. D. García.** 1999. El Cultivo de Tejidos de

Echinocactus platyacanthus Link et Otto. En Resúmenes: I Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y Otras Plantas Suculentas. Oaxaca, Oax. México. 43.

- **Martínez, M. N., Fuentes, M. V., Pérez, C. J., Medina, Q. C., Garrido, G. M., Coca, S. E., Fuentes, G. C., Flores, L. R., Ortiz, M. G.** 2002. La multiplicación *in vitro* como herramienta viable en la reproducción de cactáceas. En: Martínez-Avalos, J. G (ed.). Resúmenes del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y Otras plantas Suculentas. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria. 114-115.
- **Mata, R. M., M. A. Monroy de la Rosa, G. K. Moebius y A. V. M. Chávez.** 2001. Micropopagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an Endemic and Endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37: 400-404.
- **Mauseth, J. D.** 1977. Cactus Tissue Culture: A potential method of propagation. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)*, Vol. XLIX: 80-81.
- **Mauseth, J. D.** 1979. A new method for the propagation of cacto: Sterile culture of axillary buds. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)*, Vol. 51: 186-187.
- **Merino, M. M. E.** 1991. Medio de cultivo. En: Hurtado, M. D. V. y M. M. E. Merino (eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. 67-85.
- **Moebius, G. K., R. M. Mata y A. V. M. Chávez.** 1999. Morfogénesis *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum., Especie amenazada endémica de México. En Resúmenes: I Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y Otras Plantas Suculentas. Oaxaca, Oax. México. 45.
- **Murashige, T. y F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15: 473-497.
- **Olguín S. L. P.,** 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), Especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura,

Biólogo. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 85.

- **Orellana-Pérez, P. A.** 1998. Propagación vía Organogénesis. En: Pérez Ponce, J. (ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 151-178.
- **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.
- **Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. Morones-Ruíz y H. Lizalde-Viramontes.** 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 131-135.
- **Pérez-Molphe-Balch, E., M. R. Ramírez, P. H. G. Núñez y A. N. Ochoa.** 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 179.
- **Pérez-Molphe-Balch, E., y C. A. Dávila-Figueroa.** 2002. *In vitro* Propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 73-78.
- **Peters, E. y C. Martorell.** 1999. El nodricismo abiótico y su importancia en la conservación. En Resúmenes: I Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y Otras Plantas Suculentas. Oaxaca, Oax. México. 152.
- **Pospíšilová J., T. Tichá, P. Kadlček, D., Haisel y Š. Plzánková.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4):481-497.
- **Pospíšilová, J.** 2003. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum* 46(4):491-506.
- **Preece, J. E. y E. G. Sutter.** 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 71-93.

- **Pulido, A.** 2006. Ausencia de cultura ecológica. Milenio, 31 de Marzo de 2006, México.
- **Ramírez, M. R., H. R. Salcedo, F. M. G. Ortiz, G. J. L. Barrera, A. Borodanenko y A. N. Ochoa.** 2002. Propagación *in Vitro* de seis especies de cactáceas con diversas concentraciones de dos reguladores de crecimiento. En: Martínez-Avalos, J. G (ed.). Resúmenes del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y Otras plantas Suculentas. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria. 78.
- **Ramírez, M. R., R. I. Aguilar, F. M. G. Ortiz, A. Borodanenko, G. J. L. Barcena, H. R. Salcedo y A. N. Ochoa.** 2004. Propagación *in vitro* de *Echinocactus platyacanthus*, *Echinocereus schmolii*, *Mammillaria pectinifera*, *M. prolifera* y *M. bocasana*. En: Hernández, R. M. P., H. R. M. Cházaro, B. M. J. Cházaro y G. J. A. Vázquez (eds.). Resúmenes IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y el Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. Guadalajara, Jalisco, México. 268 p.
- **Roberts, A. V., E. F. Smith y J. Mottley.** 1990. The preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.). Methods in Molecular Biology, Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Human press. New Jersey. 227-236 p.
- **Rosas-López, U. Y.** 2002. Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias .Universidad Nacional Autónoma de México. 110.
- **Saby, V. L., A. L. López-Escamilla y G. J. Márquez.** 2004. Efecto de las citocininas-auxinas en la formación de brotes adventicios de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). En: Sosa, V. (ed.). Resúmenes XVI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxaca, Oax. México.
- **Santos-Díaz, M. S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. L. Santos-Díaz.** 2003. Clonal propagation of *Turbinicarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction. *Bradleya*. 21: 7-12.

- **Schwarz, O. J. y R. M. Beaty.** 2000. Organogénesis. En: Trigiano, R. N. y D. J. Gray (eds.). *Plant Tissue Culture and laboratory exercises*. Washington. 125-137.
- **Segura, J.** 2000. Morfogénesis *in vitro*. En: Azcon-Bieto, J. y M. Talon (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill. 381-392.
- **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: 1-85.
- **Soria, C. D.** 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subsp. *Schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztlán, Hidalgo. Tesis de Licenciatura, Biólogo. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zona Orizaba-Córdoba. Córdoba, Veracruz. 74.
- **Starling, R.** 1985. *In vitro* Propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. Suc. Journal* (U.S). 57: 114-115.
- **Starling, R. J. y J. H. Dodds.** 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1: 84-90.
- **Stepan-Sarkissian, G.** 1990. Selection of media for tissue and cell culture. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, *Plant Cell and Tissue Culture*. Human press. New Jersey. 1-12.
- **Strauch, M. M. M.** 1989. Historia de la biotecnología. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. XIV. Núm. 84. 19-32.
- **Tapia, C. D. M,** 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura, Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73.
- **Velázquez, E. L. E. y Q. R. Soltero.** 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cact. Suc. Mex.* Tomo XLVI, año 46: 56-62.

- **Villaseñor, J. L.** 2003. Diversidad y Distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*. 28(3): 1-9.
- **Villavicencio, E., MA. Villegas, O. G. Arellano y H. J. Vargas.** 1999. Desarrollo de Brotes *in vitro* de *Astrophytum miryostigma* Lem. *Cac. Suc. Mex.* Tomo XLIV: 49-57.
- **Ziv, M.** 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 45-69.