



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

DESARROLLO METODOLOGICO PARA LA
PROPAGACION VEGETATIVA DE Echinocactus
grusonii HILDMAN (CACTACEAE), MEDIANTE
CULTIVO DE TEJIDOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
PATRICIA MARIA EUGENIA FRIAS DIAZ

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradesco a la Subdirección de Investigación de la Comisión Nacional de Fruticultura, el haberme permitido realizar este trabajo en las instalaciones del Departamento de Fitoproducción.

De manera especial quiero agradecer a la Biol. Patricia Díaz Godínez por la dirección del trabajo - así como a el M. en C. Rafael Madrid Ríos por su valiosa colaboración en el análisis de los resultados.

CON AMOR Y RESPETO :
A MIS PADRES

MARTHA Y JAVIER

POR LA COMPRENCION Y EL APOYO QUE
SIEMPRE ME HAN BRINDADO
A QUIENES DEBO LO MAS HERMOSO QUE TENGO:

LA VIDA.

A MIS HERMANOS:

MARGARITA, MARTHA, ANGELA, JAVIER,
LOURDES Y ARTURO.

A EDGAR

CON CARÍÑO

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
1. REVISION DE LITERATURA	
1.1 LAS CACTACEAS (<u>Echinocactus grusonii</u>)	6
1.1.1 DESCRIPCION Y CLASIFICACION BOTANICA	6
1.1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA	8
1.1.3 USOS E IMPORTANCIA ECONOMICA	10
1.1.4 PROBLEMAS DE EXTINCION	12
1.1.5 METODOS DE PROPAGACION	14
1.1.5.1 PROPAGACION POR SEMILLA	14
1.1.5.2 PROPAGACION POR ESQUEJE	16
1.1.5.3 PROPAGACION POR INJERTO	16
1.2 CULTIVO DE TEJIDOS	
1.2.1 DESCRIPCION	17
1.2.2 ANTECEDENTES Y PERSPECTIVAS	18
1.2.3 RUTAS DE PROPAGACION	19
1.2.4 CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y METODOS	28
3.1 GERMINACION DE SEMILLAS	28

3.2 OBTENCION DE INOCULOS	30
3.3 Cultivo <u>in vitro</u>	30
4. RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 PRIMERA ETAPA	38
4.2 SEGUNDA ETAPA	58
4.2.1 ANALISIS ESTADISTICO	61
5. CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA CITADA	82

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. ASPECTO TIPICO DE UNA PLANTA DE <u>Echinocactus grusonii</u> ...	9
FIGURA 2. METODOS DE PROPAGACION POR ESQUEJE	16
FIGURA 3. METODOS DE PROPAGACION POR INJERTO	17
FIGURA 4. RUTAS DE PROPAGACION	21
FIGURA 5. SECUENCIA SEGUIDA PARA LA OBTENCION DE INOCULOS	31
FIGURA 6. ASPECTO DEL VIGOR DE LOS BROTES	36
a. BROTES VIGOROSOS (BV)	
b. BROTES NO VIGOROSOS (BNV)	
FIGURA 7. ASPECTO DE LA ABUNDANCIA DE ESPINAS EN LOS BROTES	37
a. BROTES CON ABUNDANTES ESPINAS	
b. BROTES CON POCAS ESPINAS.	
FIGURA 8. SECUENCIA DEL DESARROLLO DE BROTES DE MANERA DIRECTA ...	41
FIGURA 9. SECUENCIA DEL DESARROLLO DE BROTES DE MANERA INDIREC ...	42
TA (CRECIMIENTO AMORFO)	
FIGURA 10. RESPUESTA DE LOS INOCULOS A LAS 18 SEMANAS DE CULTIVO	
EN LA PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	51
FIGURA 11. RESPUESTA DE LOS INOCULOS A LAS 12 SEMANAS DE CULTIVO	
EN LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL	59

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. TRATAMIENTOS DE LA PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL FORMADOS	
A PARTIR DE REGULADORES DE CRECIMIENTO ADICIONADOS AL	
MEDIO DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE BROTES EN INOCU-	
LOS DE <u>E. grusonii</u>	29
CUADRO 2. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIA CON CONCENTRACIONES	
FIJAS DE K_n y $2iP$ PARA OPTIMIZAR LA INDUCCION DE BRO-	
TES EN INOCULOS DE <u>E. grusonii</u> CULTIVADOS in vitro	34
CUADRO 3. CARACTERISTICAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR EL TIPO DE	
VIGOR DE LOS BROTES	35

CUADRO 4. TOTAL DE BROTES, CALIDAD, PRESENCIA DE CRECIMIENTO AMORFO Y TIPO DE RAIZ PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO A LAS 12 SEMANAS DE CULTIVO, COMO CONSECUENCIA DEL EFECTO DE AUXINAS, CITOCININAS Y ACIDO GIBERELICO APLICADOS POR SEPARADO Y COMBINADOS	39
CUADRO 5. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE AIA EEN COMBINACION CON LAS CITOCININAS Kn Y 2iP PROBADAS A UNA CONCENTRACION DE 20 μ M, SOBRE EL NUMERO Y CALIDAD DE BROTES, CRECIMIENTO AMORFO Y TIPO Y ABUNDANCIA DE RAIZ, POR TRATAMIENTO A LAS 12 SEMANAS DE CULTIVO	60

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. NUMERO TOTAL DE CASOS CON PRESENCIA O AUSENCIA DE LAS CARACTERISTICAS EN ESTUDIO	53
TABLA 2. RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO PARA PROBAR LA HIPOTESIS DE INDEPENDENCIA ENTRE CARACTERISTICAS	54
TABLA 3. NUMERO TOTAL DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO CONSIDERANDO AUXINAS Y CITOCININAS EVALUADAS	55
TABLA 4. NUMERO TOTAL DE BROTES DE CALIDAD DESEADA Y NO DESEADA PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO	57
TABLA 5. NUMERO TOTAL DE CASOS CON PRESENCIA O AUSENCIA DE LAS CARACTERISTICAS EN ESTUDIO EN LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL .	61
TABLA 6. NUMERO TOTAL DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO	62
TABLA 7. RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA APLICADO AL NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO	64
TABLA 8. NUMERO TOTAL DE BROTES DE CALIDAD DESEADA PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO	66

APENDICES

APENDICE 1. NATURALEZA Y CONCENTRACIONES DE SALES MINERALES Y COMPLEMENTOS ORGANICOS (MURASHIGE - SKOOG 1962), - EMPLEADOS COMO MEDIO DE CULTIVO	72
APENDICE 2. NATURALEZA Y CONCENTRACIONES DE SALES MINERALES - Y COMPLEMENTOS ORGANICOS (R.A. DE FOSSARD 1976), EMPLEADOS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA GERMINACION DE SEMILLA	73
APENDICE 3. NUMERO DE BROTES, TIEMPO REQUERIDO (EN SEMANAS) - PARA SER CONSIDERADOS COMO TALES, TAMAÑO APROXIMA DO A LAS 12 SEMANAS DE CULTIVO, ABUNDANCIA DE ES- PINAS Y TIPO DE VIGOR DE LOS MISMOS PARA CADA TRA TAMIENTO EN LA PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	74
APENDICE 4. NUMERO DE BROTES, TIEMPO REQUERIDO (EN SEMANAS) - PARA SER CONSIDERADOS COMO TALES, TAMAÑO APROXIMA DO A LAS 12 SEMANAS DE CULTIVO, ABUNDANCIA DE ES- PINAS Y TIPO DE VIGOR DE LOS MISMOS PARA CADA TRA TAMIENTO EN LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL	76
APENDICE 5. COMPOSICION DE SOLUCIONES MADRE PARA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	80
APENDICE 6. COMPOSICION DE SOLUCIONES MADRE DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADAS A UNA CONCENTRACION DE _ 1 mM.	81

LISTA DE ABREVIATURAS.

AIA - Acido indol acético	GA ₃ Acido giberélico
IBA - Acido indol butírico	
ANA - Acido naftalen acético	
BAP - Bencil amino purina	
Kn - Cinetina	
2iP - Isopentenil adenina	
Zea - Zeatina	

RESUMEN

Las principales causas que ocasionan la pérdida y desaparición de gran número de cactáceas en México, están relacionadas con problemas económicos, políticos y sociales más que biológicos.

La cactácea Echinocactus grusonii es una de las especies que por su gran valor ornamental está en peligro de desaparecer.

Tradicionalmente se propaga por medio de semillas y algunas veces por esquejes. Sin embargo, éstos métodos son lentos y proporcionan una baja cantidad de plantas.

Considerando la urgente necesidad de propagarla es conveniente desarrollar métodos de propagación que aseguren su preservación.

En el caso de algunas cactáceas el uso del cultivo de tejidos ha permitido obtener altos rendimientos en un tiempo corto, a diferencia del requerido por los métodos tradicionales.

No existen antecedentes de éste tipo para E. grusonii, por lo que éste trabajo se dedicó a establecer las bases para lograr su propagación mediante una vía directa (evitando la formación de callo).

La primera parte del trabajo consistió en establecer el cultivo, para lo cual se pusieron a germinar asépticamente semillas de E. grusonii en medio líquido de De Fossard, para asegurar la limpieza de los inóculos cultivados.

De cada plantula desarrollada por semilla cortandolas longitudinalmente y eliminando las porciones terminales (de raíz y ápice) se obtuvieron dos inóculos.

En una primera etapa el cultivo de los inóculos en el medio de Murashige y Skoog (1962) complementado con combinaciones específicas de auxinas (IBA, AIA y ANA), citocininas (BAP, Kn, ZP y Zea) y ácido giberélico (GA_3), permitió detectar combinaciones que favorecieron el desarrollo de brotes de buena calidad, considerando la obtención directa de ellos, con un rendimiento

to de hasta 2.5 brotes de calidad deseada por plántula original, en los --
tratamientos elegidos, en un período de 3 a 4 semanas.

En una segunda etapa experimental se evaluaron los tratami~~en~~tos elegi--
dos en la primera (tratamiento 3 - AIA, tratamiento 12 - AIA / Kn y trata -
miento 17 -AIA / 2iP) logrando identificar rangos hormonales óptimos de -
AIA en combinación con Kn y 2iP que favorecieron tipos específicos de morfog
genésis, que condujeron al desarrollo de brotes, vía directa y vía formag -
ción de crecimiento amorfo, con un rendimiento de hasta 4 brotes de buena -
calidad por plántula original en la combinación de Kn (20 ~~µ~~M) con AIA ----
0.8 mg/l).

I N T R O D U C C I O N

Dada su situación geográfica, México presenta una riqueza florística que alcanza cifras de cerca de 20,000 a 30,000 especies vegetales (64), entre las que se encuentran las de la familia Cactaceae con más de 2,000 especies que caracterizan el paisaje de las zonas áridas y semiáridas de México (5, 12), las cuales ocupan aproximadamente un 65% del territorio del país (11).

Su distribución no solo se limita a éstas zonas, sino que existen algunas que se encuentran en selvas tropicales, como las cactáceas epífitas (12, 13).

Por su aspecto tan peculiar, han sido motivo de atención en nuestro país desde tiempos remotos (11, 12, 25), actualmente el interés por éste grupo se ha extendido, adquiriendo un papel muy importante como fuente de alimento (12, 25), además son importantes en la industria químico-farmacéutica y útiles para evitar la erosión del suelo (18, 25).

Desde el punto de vista ornamental, son objeto de un gran comercio. El creciente interés por algunas de sus especies incrementa su demanda y comerciantes y viveristas tanto nacionales como extranjeros, recurren a colectores comerciales para abastecerse de las especies más raras o codiciadas, mediante recolección masiva de especies en sus lugares de origen y producción provocando un comercio en la mayoría de los casos ilegal (52).

La misma ley de oferta y demanda se encarga de aumentar los precios de las especies más raras, las de crecimiento más lento o las que por alguna razón son de propagación difícil, originando un gran presión sobre las especies menos abundantes, muchas veces endémicas de áreas geográficas restringidas, poniéndolas en verdadero peligro de extinción (51). Tal es el caso de la flora cactológica de la Isla Cedros en Baja California (14) o de especies que han ido desapareciendo gradualmente de las localidades en donde antes abundaban, como Echinocactus lindsayi, Echinocactus grandis y Cephalocereus senilis, entre muchas otras (18).

Otra causa que ha contribuido al problema de la extinción de especies es la rapidéz con que está siendo destruída la naturaleza, especialmente en los países subdesarrollados, en donde la presión demográfica origina la destrucción del medio natural para fines agrícolas y ganaderos, produciendo un gran desequilibrio ecológico.

A ésta causas se debe agregar la falta de una legislación adecuada sobre la protección de ésta familia y la dificultad de aplicarla eficazmente (52) además de la escasa atención que se ha brindado a este problema.

Ya Vovides A. P. 1981 elabora una lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción, en donde se encuentran 91 especies de la familia de las cactáceas y entre las que figura Echinocactus grusonii.

Diversos son los intentos que se han desarrollado encaminados al establecimiento de tecnologías adecuadas, con el fin de propagar masivamente la vegetación de zonas áridas y asegurar su preservación.

La propagación comercial de cactáceas en México, se efectúa por métodos tradicionales, sexuales utilizando semillas (23, 28) o asexuales, como esquejes e injertos (15, 54). Los métodos asexuales (esquejes o injertos) se han utilizado para incrementar la tasa de crecimiento. Existen especies en que ninguno de éstos métodos se puede usar, entonces la propagación debe hacerse por semilla. Sin embargo, en muchos casos la obtención de semillas es difícil, debido a que algunas plantas son raras y autoestériles (45), además de que el crecimiento por éstos métodos es muy lento y proporciona una baja producción de plantas.

Otra alternativa es la micropropagación (45, 46, 57), por medio de la cual se puede lograr el desarrollo de plantas completas en un medio nutritivo artificial, complementado con vitaminas, reguladores de crecimiento y una fuente de carbono, en condiciones asépticas (17, 22) a partir de porciones vegetales pequeñas, como embriones, semillas, tallos, meristemas apicales o radicales, callos, células aisladas, granos de polen, etc. (17, 29, 34), a la vez que éste método brinda una notable disminución en el tiempo de propagación y desarrollo en algunas especies, obtención de plantas libres de enfermedades, la obtención de ejemplares todo el año, incrementando "n" veces el número de plantas, producción de fármacos y otros productos naturales, así como la preservación de germoplasma (17, 59, 60).

La propagación de cactáceas por medio de cultivo de tejidos ha sido estudiada con varios fines, como biosíntesis de alcaloides (58), estudios de morfogénesis y fisiología (30, 36, 39, 43, 44) y otros tantos referentes a la propagación masiva de algunas especies, entre los que se encuentran los trabajos de Mauseth (1979) y Corona (1982) que resaltan la importancia del

uso de la metodología de cultivo de tejidos como una alternativa para propagar cactáceas.

La gran amenaza que continuamente sufren las cactáceas del país, ha provocado la desaparición de muchas especies valiosas, además de que las técnicas convencionales, empleadas para su propagación son lentas y no proporcionan gran cantidad de ejemplares. Por éstos motivos y por las cualidades del método de propagación in vitro se planteó la elaboración del presente trabajo, aplicando la técnica de cultivo de tejidos a la cactácea - - - - Echinocactus grusonii.

Esta especie es originaria del estado de Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí, es un ejemplar muy atractivo por su flor de color amarillo y el aspecto peculiar de su tallo globoso, en los mercados se le conoce con el nombre de "Barril dorado" (11, 13).

Aunque se le encuentra con abundante frecuencia en países como Japón, Alemania (en jardines y grandes colecciones) (13, 52), actualmente en México no se le encuentra con facilidad en su hábitat natural y solo se observa en baja frecuencia en algunas colecciones y Jardines Botánicos.

Empleando para esta especie los métodos de propagación tradicionales, se obtiene a largo plazo, pocos ejemplares, por lo que es necesario y conveniente establecer una metodología por cultivo de tejidos para la obtención a corto plazo de un número mayor de plantas y contribuir de ésta manera a su preservación y a la satisfacción de su demanda, distribuyendo dichos ejemplares en viveros comerciales y Jardines Botánicos.

1. REVISION DE LITERATURA

1.1 LAS CACTACEAS (Echinocactus grusonii)

1.1.1 DESCRIPCION Y CLASIFICACION BOTANICA.

Las cactáceas a través de procesos evolutivos se han adaptado a condiciones severas, condiciones bajo las que muchas otras plantas podrían perecer (5, 9, 16). Dentro de dichas características de adaptación algunas de las más sobresalientes y por las que podemos distinguir fácilmente a esta familia son: a) alta succulencia de sus tallos, usualmente relacionada con la necesidad de almacenar agua, b) gran desarrollo de parénquima, responsable de la succulencia, c) reducción de la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas, d) atrofia hasta estados vestigiales del limbo de la hoja o su transformación en escamas, espinas y glóquidas, e) engrosamiento de la cutícula y de las membranas celulósicas de los tegumentos, f) pruinosis de las excrescencias cerosas de sus células epidérmicas, g) disminución y disposición unida de los estomas, h) gran longitud y extensión de sus raíces y conservación de agua en enormes raíces tuberosas, i) así como la presencia de areolas (al menos en estados juveniles) sobre el tallo (5, 11, 16).

Las areolas son los órganos más distintivos de esta familia, son áreas diminutas claramente definidas sobre la posición normal de las hojas. Se caracterizan por la producción de hojas (en algunos cactus primitivos del género Pereskia), por la producción de espinas, lana, pelos, flores, glóquidas, nuevos tallos y en algunos casos raíces adventicias (5, 9, 12). En muchos cactus en estado adulto, las hojas están representadas por montículos llamados tubérculos (5). Como en la mayoría de las cactáceas no hay hojas, la producción de alimento es llevada por las células verdes del tallo.

La superficie del tallo está cubierta por una capa cerosa (la epidermia) que retarda o previene la evaporación. Algunos cactus han desarrollado estructuras tuberosas subterráneas (raíces o tallos) para almacenar agua y tienen espinas dirigidas que ayudan a concentrarla y aprovecharla.

Basándose únicamente en las características de tipo morfológico, se -

han elaborado diversas clasificaciones (10, 12), pero solo el sistema de clasificación de Buxbaum está basado en estudios de anatomía comparada, por lo que es uno de los sistemas de clasificación más usados (citado por Bravo, H. 1937).

La familia se divide en tres subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cereoideae de las que la primera está representada por los miembros más primitivos de la familia (11, 12), caracterizados por la presencia permanente de hojas. En la subfamilia Opuntioideae se encuentran pocos géneros, pero algunos están representados, como Opuntia por numerosas especies. En la subfamilia Cereoideae se encuentran los miembros más evolucionados de las cactáceas que son aquellos que han adquirido tallos en forma globosa, como es el caso de los miembros del género Echinocactus. El nombre genérico de esta especie es derivado del griego "echinos" (erizo) y "Kaktos" (una planta espinosa) (13), se caracterizan por ser plantas grandes y robustas, globosas o cilíndricas, provistas de costillas más o menos numerosas, ápice no siempre cubierto con lana, areolas grandes y muy espinosas. Las flores nacen en forma de corona cerca del ápice, y regularmente son amarillas. El fruto es oblongo y las semillas negras. A las especies de éste género así como algunos Ferocactus se les llama Biznagas (8, 11, 13).

El género Echinocactus fué instituido en 1827 por Link y Otto (11, 13) se compone de 12 especies, entre las que se encuentra Echinocactus grusonii la que se ha descrito como una planta simple, globosa, con el ápice lanoso, tamaño de 1.20 a 1.30 m de altura y 40 a 80 cm de diámetro, verde claro, costillas de 20 a 37 (16) delgadas, areolas distantes entre sí 1 ó 2 cm espinas amarillo pálido a blanco cuando jóvenes, después café oscuro o moreno con la edad, espinas radiales 8 a 10, subuladas, de 3 cm de longitud, espinas centrales usualmente 4 de hasta 5 cm de longitud, anchas, flores amarillas de 4 a 6 cm de longitud, abiertas en la luz del sol más o menos 5 cm de antesis, los segmentos del perianto nunca se abren completamente, el tubo de la flor con 3 cm de ancho cubierto con escamas lanceoladas, estambres numerosos, amarillos, formando un cilindro grueso en el centro del perianto, estilo amarillo, lóbulos del estigma de 10 a 12, ovario esférico cubierto con escamas acuminadas con abundante lana en las axilas, fruto oblongo a esférico, 12 a 20 mm de longitud de pared delgada, provisto de lana blanca al

principio y más tarde desnudo, semillas lisas, de color café oscuro, de 1.5 mm de longitud (8, 11, 13, 16, 28) (FIGURA 1).

Se encuentra distribuido en San Luis Potosí e Hidalgo principalmente (5, 11, 13, 16).

Es una especie muy atractiva que se puede encontrar en algunas colecciones, aunque solo se ven plantas pequeñas.

La clasificación taxonómica de ésta especie es como sigue (11, 13):

CLASE	Dicotyledoneae
ORDEN	Cactales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cereoideae
TRIBU	Echinocactae
SUBTRIBU	Echinocactinae
GENERO	<u>Echinocactus</u>
ESPECIE	<u>grusonii</u>

1.1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

A principios del descubrimiento de América, las cactáceas fueron conocidas en Europa y causaron asombro y admiración. La primera obra que hace alusión a éstas plantas es la "Historia general y natural de las Indias" escrita en 1535 por Henandez de Oviedo y Valdez (citado por Bravo, H. 1978), entre las primeras ilustraciones están las que decoran la iglesia de Ixmiquilpan en Hidalgo, construída en 1550 (citado por Bravo, H. 1937, 1978) y ya en el siglo XVII las cactáceas principiaron a figurar en las obras de muchos botánicos (52).

Según Buxbaum 1969 (citado por Bravo, H. 1937) evolucionaron, apartir -



ASPECTO TIPICO DE UNA PLANTA DE Echinocactus _____

de sus posibles antecesores africanos, después de que el continente America no quedó separado de Africa por el océano Atlántico, lo que permitió su dispersión, establecimiento y evolución en otros continentes.

Al carecer las cactáceas de un registro fosil, no se sabe en que época se originaron y diferenciaron. Actualmente se supone que las formas ancestrales fueron plantas foliadas, extintas, que vivieron en territorios emergidos del Caribe, tal hipótesis se deduce de la distribución actual de las especies que presentan hojas, consideradas primitivas, como Pereskia cuyo origen filogenético se encuentra entre las antiguas decitiledoneas del orden Centrospermae, según algunos botánicos.

Esta opinión se ha confirmado en la actualidad por las investigaciones de Buxbaum (1950), Boke (1963) y Engelman (1960) (citados por Bravo, H. -- 1937, 1978) realizadas en flores y semillas de algunas especies y que ha permitido establecer las afinidades de éstas plantas con las de la familia Phytolacaceae.

De acuerdo con la hipótesis de Buxbaum, los géneros mexicanos muy numerosos, comprendidos taxonómicamente en las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cereioideae, tuvieron su origen, como las demás cactáceas, en las formas ancestrales del Caribe que emigraron hacia el noroeste, diferenciándose durante su trayecto en los géneros actuales que crecen en la mayoría de los tipos de vegetación de México (11, 12).

Los miembros de ésta familia son nativos del continente Americano en el que se encuentran distribuidos desde América del norte a los 52°, hasta el sur en la Patagonia y las Islas Galápagos a los 52° (16, 20). Un solo género contradice la afirmación de que todos los cactus son originarios de América, Rhipsalis, que se cree también originario de Africa y Madagascar, sin embargo, algunos científicos sostienen que en realidad procede del continente Americano y que su presencia en otras zonas obedece a la distribución que los pájaros llevaron a cabo de sus semillas en épocas remotas (11, 12).

Los cactus se encuentran en el continente Americano en zonas áridas y semiáridas, pero la gran adaptabilidad de éstas plantas ha permitido que se dispersen en una gran variedad de hábitats (11, 16).

El género Echinocactus es nativo de México y el suroeste de los Estados Unidos.

En México la especie Echinocactus grusonii es originaria de los estados de Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí (11, 12, 13) y está distribuida en zonas cactológicas definidas del estado de Hidalgo, en la Barranca del río Moctezuma, y desde los 1200 a 1800 y 1800 a 2400 msnm en Querétaro, actualmente se les encuentra en el campo en una frecuencia muy baja.

1.1.3 USOS E IMPORTANCIA ECONOMICA.

Desde los primeros albores de la historia del hombre americano en las zonas desérticas, las cactáceas al igual que las agavaceas, jugaron un papel muy importante en el sustento y la cultura de las primeras tribus nómadas que recorrían estos territorios, influyendo en forma marcada en los procesos de sedimentación y civilización de las mismas (65).

[El principal uso de las cactáceas entre los indígenas, fue como fuente de alimento, bebida y como fuente de materias primas, así como de gran ayuda en la medicina] (24, 25).

[Muchas de éstas utilidades actualmente siguen vigentes, se puede mencionar que como alimento humano, todos los órganos de las cactáceas desde los tallos, frutos, semillas y hasta flores, son comestibles] (65).

[Las pencas de nopales, los tallos de algunos órganos, cardones y algunas viznagas, son ampliamente utilizados como forraje para el ganado, así como para animales salvajes.]

Con fines medicinales se han venido usando desde la época anterior a la conquista, por sus propiedades farmacológicas (11, 24).

[Debido a que las cactáceas tienen un sistema radicular amplio y superficial, unido a la facilidad de su propagación vegetativa (en algunas especies) a la adaptabilidad a los suelos inhóspitos y a su resistencia a los factores climáticos adversos, resultan excelentes medidas para evitar la erosión del suelo] (12).

[Ya que los pelos adsorventes del sistema radicular de las cactáceas son

caducos y sonstituyen una fuente constante de materia orgánica, son usadas como fertilizante (9).

Se han utilizado para la construcción de techos y paredes de casas rústicas, así como en artesanías, para la fabricación de objetos diversos. En nuestro medio rural es frecuente su uso para formar setos vivos y delimitar propiedades.

Para la producción de azúcares, de alcohol y para la obtención de vinagre (25, 65).

Por su alto contenido de mucílago, se han venido utilizando para la preparación de pegamentos.

Entre muchas otras sustancias producidas por las cactáceas, están las pectinas, útiles en la industria alimenticia, para la preparación de mermeladas y jaleas (11).

Diversas especies de cactáceas se emplean en la obtención de fibra y pulpa para la fabricación de papel, también se han utilizado como fuente de diversas sustancias químicas, como Potasa, Amoniaco y Carbonato de Potasio, así como hule (24, 25). Las cactáceas además constituyen una importante fuente de colorantes con aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmetológica principalmente. Por su contenido de sapogeninas, han sido usadas como sustituto del jabón (11, 25).

Como vemos la gran mayoría de los órganos de las cactáceas han sido utilizados de una u otra manera, hasta las espinas, que fueron usadas como instrumento de tortura en prácticas religiosas penitenciales y de autosacrificio (11, 12).

En la actualidad las cactáceas tienen un gran valor como plantas de ornato. Este comienza a partir del siglo XVIII, con la venida a México de exploradores y naturalistas europeos que llevan a sus países varios ejemplares de cactáceas mexicanas, y a principios del siglo XIX existen numerosas e importantes colecciones de éstas, así como negocios dedicados a su importación, cultivo y venta (51, 52). Aparecen los primeros tratados sobre las cactáceas contemplando su taxonomía y cultivo, floreciendo colecciones europeas y surgiendo un sin número de clubes locales y sociedades nacionales de estudiosos y aficionados a las plantas suculentas (24). Los aficionados aumentan y su comercio alcanza volúmenes insospechados, incrementándose la

popularidad de sus especies a través del tiempo (52, 66). A la fecha han adquirido precios altos, como es el caso de Carnegia gigantea de 2 pies de alto que en 1980 se vendió a más de mil dólares (66).

Para satisfacer ésta gran demanda de cactáceas como plantas de ornato u objeto de colección, surgen multitud de establecimientos comerciales dedicados a su importación, reproducción y venta.

Según datos de la Secretaría de Comercio Exterior, en 1981 México exportó 89 769 Kg bruto de cactáceas con valor de 7,532 dólares a Alemania Occidental, Alemania Oriental, Estados Unidos y Japón. Para 1984 de enero a junio disminuyó la exportación a 53 Kg bruto ya que los cactus es esta fecha fueron considerados como producto controlable (55).

1.1.4 PROBLEMAS DE EXTINCION.

Posteriormente al descubrimiento de América, las cactáceas fueron uno de los atractivos más importantes de México (12, 24, 66) y actualmente tienen un gran valor ornamental.

Por desgracia pocos mexicanos reconocen y aprecian el calor natural de los cactus y su valor comercial además de los beneficios potenciales del comercio organizado. Por lo que el comercio es llevado por muy pocos nacionales y un grupo numeroso de extranjeros comerciantes que obtienen grandes beneficios, y que generalmente no están interesados en su conservación (51, 52). Son Japón, Alemania y otros países europeos los que han sabido apreciarlas y se las llevan de contrabando a sus países. Este contrabando suma alrededor de 25 millones de cactáceas anuales saliendo del país (65).

La demanda internacional de cactáceas es amortiguada por establecimientos comerciales dedicados a estas plantas. Los países en que ésta producción está más desarrollada son Japón, Bélgica, Inglaterra, Francia, España y Estados Unidos (52, 66).

Lamentablemente estos establecimientos la mayoría de las veces no se dan a basto para satisfacer la creciente demanda de ejemplares, dando lugar a -

que comerciantes sin escrúpulos recurran a la importación de especímenes colectados en su habitat, colectas irracionales que han puesto a muchas especies en peligro de extinción, tanto en México como en algunos países de América del Sur (51, 52, 64).

La mayor parte del comercio de cactáceas mexicanas es completamente ilegal, ya que existen leyes que prohíben su recolección (52, 51). De acuerdo con la legislación mexicana, por acuerdo del secretario de agricultura y fomento, publicado en el Diario oficial de la federación No. 21, tomo 82, del 25 de enero de 1934 se requiere permiso de la Secretaría de Agricultura para la recolección, explotación y exportación de plantas, frutos y semillas de cactáceas. Lamentablemente en los últimos 10 años, la cantidad de ejemplares amparados representa tan solo un mínimo porcentaje de los que en realidad salen del país, ya que estos permisos no especifican claramente los especímenes que se van a coleccionar (nombre de la especie, estado de las plantas, número de las mismas, etc.) además de ser autorizados por agencias o funcionarios totalmente ajenos a ésta labor (51).

Existen otras causas que amenazan la existencia de muchas especies tales como : a) industrialización y urbanización del país, b) apertura de nuevas áreas agrícolas y ganaderas, c) creación de nuevos distritos de riego , d) construcción de caminos, e) competencia de otros componentes del ecosistema, f) el tendido de líneas eléctricas, g) ataque por roedores y plagas, h) existencias raras por condiciones como son, poblaciones endémicas aisladas y de pequeño tamaño (64, 66).

Estas causas han provocado que cada día aumente el número de especies afectadas, lo que se puede apreciar en las listas elaboradas por diversos institutos, como las del Jardín Botánico de la UNAM, la realizada por Vovides en 1981, las de Sanchez Mejorada (1982, 1984) en donde se observa un número considerable de cactáceas en peligro de extinción.

1.1.5 METODOS DE PROPAGACION.

El cultivo de cactáceas no es nuevo, Hernandez de Oviedo y Valdés en 1553 escribe la obra titulada "Historia general y natural de las Indias" casi a raíz de la conquista, en la que se hace alusión al uso de las cactáceas y la importancia ornamental que desde entonces tienen estas plantas -- (citado por Bravo, H. 1937, 1978).

El historiador Fransisco del Paso y Troncoso en su artículo "La botánica entre los Nahoas" en 1883 (citado por Bravo, H. 1937) hace referencia al cultivo de algunas acatáceas (las más bellas y variadas) en jardines.

Fué desde principios del siglo pasado cuando el interés estético de las cactáceas realmente empezó a desarrollarse, cuando fueron introducidas al viejo mundo y a fines del siglo pasado surgieron clubes y sociedades, editándose revistas especializadas que difundieron el interés por coleccionarlas y cultivarlas (52).

A partir de la segunda guerra mundial en diversos países de Europa en Japón y Estados Unidos se establecen invernaderos para el cultivo y reproducción de cactáceas.

La propagación de cactáceas al igual que de muchas especies ornamentales puede ser por semilla o bien vegetativamente.

Tiscornia en 1976 reporta que especies globosas pueden ser propagadas por separación de hijuelos o por semillas. Echinocactus grusonii solo se ha propagado por semilla, por ser una especie simple que no produce brotes basales. Sin embargo, la obtención de semillas es difícil ya que su producción solo es de 1 ó 2 veces al año (13, 62), además de que actualmente se le encuentra en muy baja frecuencia en el campo, lo que hace la obtención más difícil.

1.1.5.1 PROPAGACION POR SEMILLA

El cultivo de cactáceas por semilla es frecuente, aunque las plantas -- tienen un crecimiento lento en comparación con otras especies. Se usa prefe

rentemente cuando se quiere obtener individuos con nuevas características, cuando la multiplicación asexual es lenta y cuando se trata de plantas de difícil propagación vegetativa (3, 23, 29).

Se puede propagar con semillas obtenidas directamente del campo, sin embargo, algunas especies toman mucho tiempo en florecer o nunca lo hacen, por lo que la propagación debe ser continuamente con semillas importadas (54). En el campo de una planta germinada por semilla surge una plántula extremadamente sensible, y aunque es grande la cantidad de semillas germinadas, el número de plántulas que llegan a ser una planta adulta, es reducido.

La germinación de las semillas toma lugar solo bajo condiciones óptimas de calor, luz y humedad (28, 54) y el porcentaje de germinación de las mismas depende de las especies, la edad de las semillas, la luz, las características de la testa, del embrión y la temperatura. En condiciones naturales frecuentemente vemos cactus muy grandes cerca de otros muy jóvenes, nunca estados intermedios y esto indica que hay un lapso de varios años donde las condiciones reinantes no permiten la germinación.

Para llevar a cabo la germinación de las semillas estas deben ser desinfectadas (un desinfectante muy efectivo es el Hipoclorito de calcio). Las semillas son puestas sobre la tierra húmeda y en la sombra. La temperatura requerida va de 15 a 20 °C (durante la noche) y 27.5 a 32 °C (durante el día) aunque también responden a grandes temperaturas rápidamente cuando se someten a éstas (23, 40, 54).

PROPAGACION POR METODOS VEGETATIVOS

Muchos cactus no producen semillas en cultivo o éstas son de difícil obtención, pero pueden ser propagadas por métodos vegetativos mediante esquejes o injertos.

Este tipo de propagación se refiere a la reproducción de individuos a partir del uso de partes vegetativas de las plantas como yemas, tallos, hajas y raíces, gracias a que éstos órganos tienen una alta capacidad de regeneración (29).

1.1.5.2 PROPAGACION POR ESQUEJES.

La multiplicación por esquejes puede hacerse mediante la utilización de piezas accidentalmente rotas, utilizar partes de tallos como en el caso de tallos columnares o bien enraizando tubérculos o separando hijuelos como en el caso de las especies globosas y por último enraizando las especies que - por razones patológicas hallan perdido sus raíces (28, 40) (FIGURA 2).

En este tipo de propagación se hacen cortes transversales, en forma cónica o angulares, según sea la especie. Una vez realizado el corte se recomienda se deje en un lugar sombreado al rededor de una semana, hasta que la herida seque, con el fin de evitar el ataque de insectos, hongos o bacteriad al ponerlos sobre el sustrato. una vez seco se puede espolvorear con algunas sustancias de crecimiento vegetal, pero en el caso de las cactáceas el desarrollo de raíz se da con bastante facilidad por lo que generalmente estas no se usan, y se procede a ponerlo sobre el sustrato sin undir el esqueje más de 2 a 4 cm. (28, 40, 62).

1.1.5.3 PROPAGACION POR INJERTO.

Muchos catus pueden ser injertados con gran facilidad (28), éste es un excelente método para incrementar la tasa de crecimiento de algunas especies así como para producir novedades, algunas de las cuales alcanzan precios elevados. En éste método es cortada una sección de la planta y preparada como un esqueje, pero no se deja a la luz ni al aire sino que es puesto inmediatamente sobre otra planta (patrón) (28, 40).

Al parecer dentro de la familia de los cactus no existe límite para posibles combinaciones de patrones y vástagos . Existen cuatro métodos para injertar: 1. de caras planas, 2. en cuña, 3. en cuña invertida y 4. en pivote (40), que se usan de acuerdo a la especie a injertar, el 1. para especies globosas, el 2 y 3 para especies delgadas y el 4 principalmente para especies trepadoras (FIGURA 3.)

Este tipo de propagación requiere de ciertas precauciones como: 1)el patrón deberá ser vigoroso y libre de enfermedades, 2) se deberá unir inmediatamente el injerto evitando la formación de burbujas y 3) se deberá injertar en la temporada de crecimiento (28, 40).

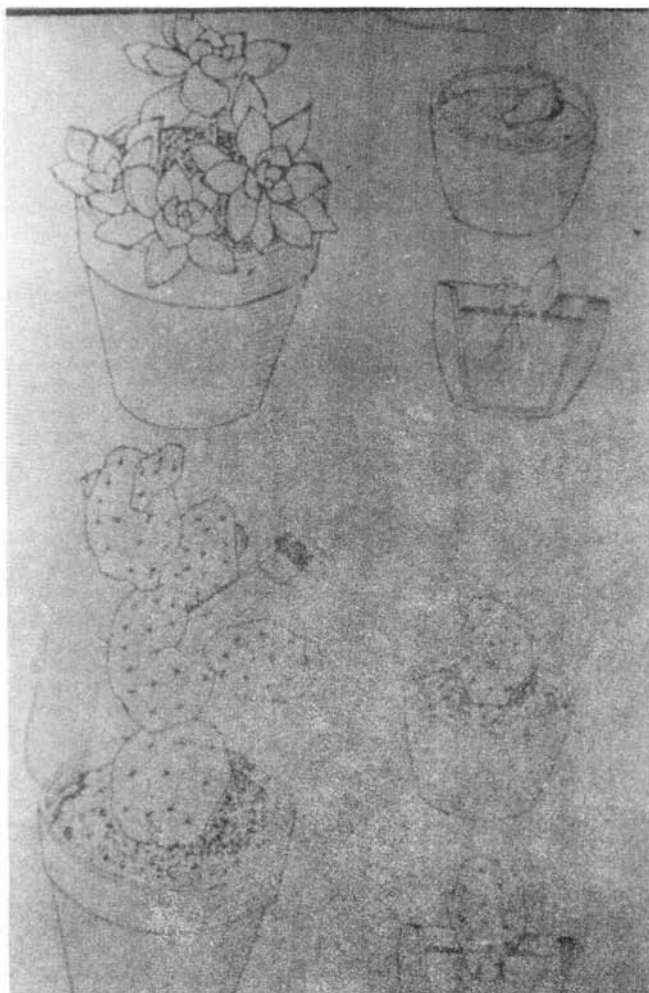


FIGURA 2. METODOS DE PROPAGACION POR ESQUEJE
TOMADO DE HAAGE, W. 1963.

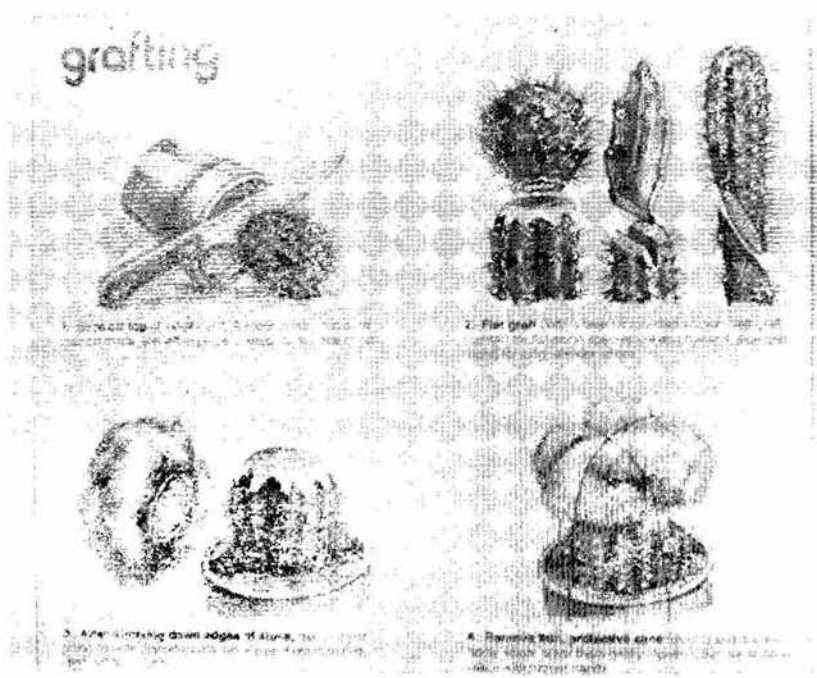


FIGURA 3, METODOS DE PROPAGACION POR INJERTO
 TOMADO DE HAAGE, W. 1963.

1.2 CULTIVO DE TEJIDOS

1.2.1 DESCRIPCION.

El término "cultivo de tejidos vegetales" se refiere al cultivo de cualquier parte de una planta: embriones, órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio artificial y en condiciones de total asepsia para lograr el desarrollo de nuevas plantas. El cultivo es establecido en un medio sólido o en un soporte inerte nutrido por medio líquido definido o indefinido químicamente, complementado con reguladores de crecimiento, vitaminas y una fuente de carbono (17, 20, 22, 41, 59).

Se plantean cuatro pasos que deben ser considerados cuando se utiliza el cultivo de tejidos para propagación: a) selección del inóculo, b) asepsia, c) medio de cultivo y d) condiciones ambientales. En cuanto a la selección del inóculo, esta es de vital importancia. Murashige en 1974 propone algunos factores que deben ser tomados en cuenta para la elección del mismo, ya que muchas veces el origen de éste es más importante que la técnica misma utilizada. Algunos de éstos factores son: tipo de órgano o tejido, edad fisiológica y ontogenética del mismo, época del año, tamaño del inóculo, y apariencia completa de la planta madre (20, 22).

Una vez seleccionado el inóculo a cultivar es una parte muy importante el mantenerlo en condiciones asépticas. Estas son dadas por la desinfección del inóculo, el medio, el material y el área de trabajo (31, 49, 60).

Del material vegetal es necesario erradicar todo tipo de microorganismos. El problema técnico de obtener inóculos sanos se reduce a: a) eliminación del tejido externo, de manera que se remuevan los microorganismos asociados y/o b) desinfección (esterilización superficial) de la porción de la planta. Una tercera elección involucra el mantenimiento del material de donde se tomarán los inóculos, bajo condiciones asépticas (17, 22, 49). Es necesario eliminar todos los microorganismos contaminantes dado que el medio de cultivo manejado es excelente para su crecimiento y su gran proliferación provocando destrucción del inóculo, alteración del medio de manera no reproducible y eliminando las ventajas del cultivo de tejidos. Para la esterilización del material se han usado diversos compuestos químicos, y el tipo de

de compuesto y de tratamiento usado depende de la sensibilidad del tejido - (17, 20, 48, 49).

Las células, tejidos y órganos solo pueden crecer cuando se les abastece de los nutrientes necesarios. Se han establecido medios de cultivo apropiados para algunas especies, pero no existe uno satisfactorio de uso común. En general pueden ser semisólidos o líquidos, conteniendo elementos inorgánicos esenciales, vitaminas, fuente de carbono y reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), dentro de los que éstos últimos sin duda son los que más influencia tienen en el establecimiento de cultivos in vitro aunque es imposible generalizar acerca de la naturaleza y concentraciones necesarias para cada cultivo (17, 22, 48, 49).

Otros factores que pueden ejercer influencia en el establecimiento y respuesta de los cultivos in vitro son el pH del medio y algunos factores físicos como la luz (fotoperíodo e intensidad lumínica) además de temperatura (48, 49).

1.2.2 ANTECEDENTES Y PERSPECTIVAS.

La técnica de cultivo de tejidos a pesar de que en los últimos años ha tomado gran impulso, tiene sus orígenes a principios de éste siglo, cuando Haberlandt en 1902 cultivó células del mesófilo, epidermis y anteras de Tradescantia, además de médula, epidermis y tricomas de otras plantas, en medio artificial, con el objeto de demostrar la totipotencialidad de las células. El no logró división celular en sus cultivos, debido a la utilización de un medio relativamente simple y a la selección como inóculo de células altamente diferenciadas (17, 22, 59, 60). A pesar de su fracaso, Haberlandt contribuyó a la especulación respecto a la presencia de una fitohormona que llamó traumatina y fué el primero en emplear el concepto de callo para definir una masa amorfa de células.

No fué sino hasta 1934 cuando P. White logró establecer y mantener en continuo crecimiento raíces de tomate. En este mismo año Gautheret, reporta la proliferación de estructuras filamentosas en sus cultivos (60). El manejo de ésta técnica guió al descubrimiento de hormonas vegetales, y a estu -

diosde diferenciación de células, crecimiento y desarrollo de órganos y otros procesos morfogénéticos. Después de los primeros trabajos, las técnicas para el cultivo de tejidos y órganos han desarrollado una amplia aplicación en laboratorios (22, 27, 29, 60).

Una importante aportación al desarrollo de ésta técnica la hicieron - Murashige y Skoog en 1962 al proponer un medio de cultivo (formulación de - sales minerales específicas para lograr una rápida proliferación de células de tabaco) que resultó efectivo para mantener el cultivo de una gran variedad de especies.

El uso de la técnica ha permitido en uno y otro caso, una gran posibilidad de clonación, esto es, la obtención de grandes cantidades de plantas -- idénticas de especímenes valiables, eliminación de enfermedades y en algunos casos de virus mediante el cultivo de meristemas, ha permitido asimismo la inducción y el aislamiento de mutantes mediante el cultivo de células, - obtención de homocigotos diploides por cultivo de microsporas, hibridación por fusión de células somáticas, cultivares seleccionados por cultivo de protoplastos y producción de callo o células simples para desarrollar plantas completas por organogénesis o directamente por embriogénesis in vitro (4, 31, 63).

1.2.3 RUTAS DE PROPAGACION

Existen dos vías importantes a seguir en el cultivo in vitro con fines de multiplicación y regeneración de plantas (1, 27), una indirecta que requiere de la generación de callo (formado por células desorganizadas) y la otra directa, manteniendo los elementos organizados del inóculo madre (FIGURA 4.)

El uso de la vía indirecta de multiplicación permite obtener gran número de propágulos, sin embargo, presenta varios inconvenientes ya que las células tienen una gran actividad mitótica, es posible que se desarrollen mutantes. Las plantas formadas no siempre resultan viables ya que la formación de conexiones vasculares entre tallo y raíz así como algunas estructuras morfológicas correspondientes a desarrollo secundarios puede ser defi -

ciente, además de que el potencial morfogénético disminuye con el aumento de los subcultivos.

En contraste en la ruta directa de multiplicación no se presentan estas situaciones, aunque los índices de multiplicación son mucho más bajos, del orden de 10^5 comparados con 10^{12} por la otra vía (1, 17, 48).

El uso de una u otra vía de propagación, dependiera de diversos factores esto es, de las características regenerativas de la especie a manejar, de los objetivos de la línea de propagación a establecer y de los recursos, así como del tiempo .

En muchas especies la propagación in vitro es relativamente fácil, en otras es complicada, ya que no se conoce lo suficiente sobre los requerimientos nutricionales y hormonales. A pesar de esto, los progresos en este campo han hecho del área una de las más promisorias y en la actualidad las técnicas de cultivo de tejidos se usan para estudios de biología celular, genética y fisiología vegetal (20, 22, 31, 48).

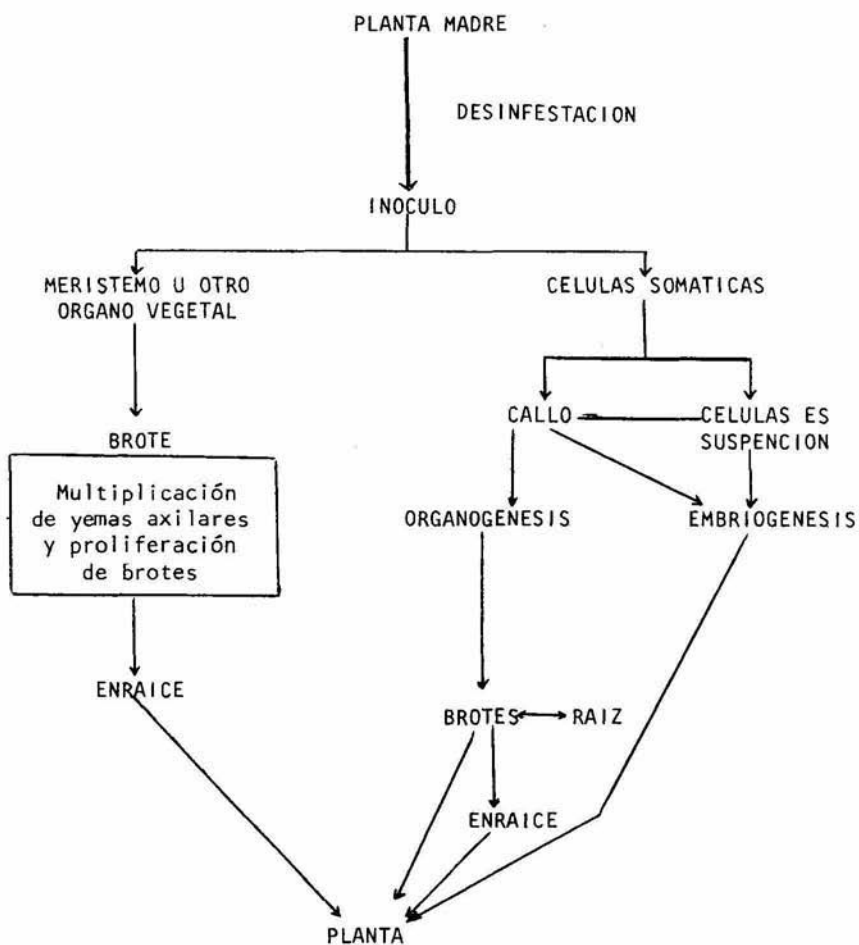


FIGURA 4. RUTAS DE PROPAGACION *in vitro*
(GUEVARA 1986 Y ABBOT 1978).

1.2.4 CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS.

Aunque la técnica de cultivo de tejidos se considera vieja, (1902) solo recientemente ha tenido importancia en la producción comercial de material vegetal.

Muchas especies vegetales han sido propagadas por éste método y dentro de éstas las menos estudiadas han sido las cactáceas, ya que a pesar de ser plantas de gran importancia no han recibido suficiente atención (34, 46).

Se ha demostrado que especies de cactáceas y suculentas son potencialmente propagables por cultivo de tejidos (57). Entre los primeros que aplicaron ésta técnica en cactáceas está Nitsch quién en 1951 (citado por - - - Starling, R. 1985) intentó propagar Opuntia en un medio con jugo de tomate pero no consiguió tener cultivos derivados del tejido original. No fué sino hasta 1957 cuando King, logró obtener la formación de callo, empleando tallos, hojas, raíces, estambres, pistilos y óvulos de diversas especies utilizando el medio de White complementado con 2,4-D, logrando subcultivarlos con poco éxito ya que raramente formaban callo en cultivo permanentes.

Steinhart en 1962 con el fin de estudiar la biosíntesis de alcaloides de Trichocereus spachianus in vitro, logró obtener tres distintos tipos de callo: 2 compactos con diferente color y velocidad de crecimiento y uno desmenuzable de rápido crecimiento, utilizando el medio de Hildebrandt, complementado con glucosa, leche de coco y 2,4-D.

Minocha y Mehra en 1974 mantuvieron una continua proliferación de callo de Neomammillaria prolifera y realizaron una serie de experimentos para diferenciarlo, variando las concentraciones de sales del medio de Murashige - Skoog, diferentes fuentes de carbono como sacarosa, glucosa, fructosa y glicerol, complejos naturales como leche de coco y jugo de sandía, y utilizando diferentes reguladores de crecimiento, en forma individual y en combinación (2,4-D, AIA, IBA, ANA, Kn, GA) observandose distintas respuestas del callo, en cuanto a cambios de color, crecimiento, consistencia, etc. pero no lograron se diferenciación, excepto la iniciación de raíces en cultivos esporádicos.

Tal diferenciación la obtuvieron Mauseth y Halperin en 1975 cultivando areolas aisladas de Opuntia polyacantha en el medio de Lin y Staba modificado con 5 mM de Nitrógeno de Amonio, 1% de agar y 5% de sacarosa, complemen-

tado con citocininas (BAP, Kn y Zea), auxinas (ANA, AIA y 2,4-D) y ácido giberélico, logrando la activación del 100% de las areolas con 10 ppm de BAP y la producción de vestigios de hoja. La producción de espinas se observó con 50 ppm de GA y el desarrollo de raíces con 5 a 50 ppm de ANA.

Otros de los trabajos en los que se obtuvo la diferenciación fué el de Kolar, Bártek y Vyskot en 1976 quienes lograron la obtención de brotes en cultivo de callo de Mammillaria woodsii y promovieron el enraizamiento al colocarlos en vermiculita para su crecimiento normal.

Mauseth en 1976 utilizando el medio de Murashige - Skkog con 5% de sacarosa y 10 ppm de BAP ó 50 ppm de GA cultivó meristemos areolares de tallos de Opuntia polyacantha con el fin de describir los efectos que tienen las citocininas y el ácido giberélico sobre la estructura y el metabolismo de los meristemos, encontrando que el BAP estimula los meristemos para la producción de vestigios de hojas y el GA estimula el desarrollo de espinas.

Existe un número muy limitado de investigadores que estudian la propagación de cactáceas por cultivo de tejidos, algunos de estos tienen objetivos específicos como por ejemplo: Steinhart (1962) quién lo utiliza para estudiar la biosíntesis de alcaloides, o morfogénesis en cactáceas, como Sachar e Iyer en 1959, Mauseth y Halperin en 1975 y Mauseth en 1976 entre otros.

Johnson y Emino en 1979a. ha reportado que usando una variación del medio Lin y Staba (1961) se puede obtener cultivo de callo de diversas especies de cactus. Ellos realizaron estos trabajos con el fin de determinar el potencial de aplicación de la técnica de cultivo de tejidos, y proponen que dicho método puede ser usado para propagar especies amenazadas o en peligro de extinción, así como la propagación de nuevas variedades, estimulando programas de producción de cactus.

Con este fin Mauseth en 1979 reporta la propagación de 11 especies de cactáceas a partir de areolas sembradas en el medio de Lin y Staba, modificado por Mauseth y Halperin (1975) en concentraciones óptimas de 1.0 y 10 mg/l de BAP, exceptuando Hetiora salicornioides que no necesitó de éste regulador, lograron el enraizamiento en un segundo medio complementado con 10 mg/l de ANA.

De las 11 especies trabajadas por Mauseth, dos (Opuntia polyacantha y Mammillaria elongata) también han sido trabajadas por Johnson y Emino en 1977a, 1977b y 1979b quienes a su vez han propagado otros cactus, En éstos trabajos ellos usaron areolas y las cultivaron en el medio de Murashige - Skoog complementado con varios reguladores de crecimiento: auxinas, citocininas y ácido giberélico en diferentes concentraciones.

Los trabajos de Johnson y Emino 1979 al igual que el de Larzate, Gaiser y Brown en 1982, tuvieron como objetivo utilizar la técnica de cultivo de tejidos como una alternativa para propagar comercialmente cactáceas.

Haciendo énfasis en utilizar ésta técnica de propagación vegetativa en cactáceas amenazadas o en peligro de extinción Corona y Yañes en 1984 logran obtener callo de Cephalocereus senilis, utilizando el medio basal de Murashige - Skoog, y auxinas como 2,4-D, ANA, AIA, IBA en combinación con una citocinina (Kn) en diferentes concentraciones, obteniendo los mejores resultados con 4 mg/l de Kn en combinación con 2 mg/l de 2,4-D, aunque en ninguno de los tratamientos se logró la formación de yemas ni el enraizamiento de los callos.

Starling en 1985 utilizando el medio nutritivo de Murashige - Skoog complementado con 0 a 10 mg/l de BA en combinación con 0 a 10 mg/l de ANA y 3% de sacarosa, obtiene vástagos esporádicos en cultivos de Ariocarpus trigonus y Obregonia denegrii, y poca proliferación de retoños en Astrophytum asterias.

Díaz en 1985 trabajó con Astrophytum myriostigma y logró la proliferación de callo y la obtención de plantas completas, utilizando trozos de plántulas como inóculos, los que proliferaron formando tejido calloso, utilizando el medio de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985) con Kn y 2,4-D a una concentración de 5 y 1 mg/l respectivamente más tarde se diferenciaron en el medio "A" para proliferación de brotes de Murashige (1976) (citado por Anaya, S. 1986) con 30 mg/l de 2iP y 0.5 mg/l de AIA, y el enraizamiento de brotes se llevó a cabo con el medio de Murashige - Skoog (1976) sin reguladores de crecimiento.

Más recientemente Anaya, S. 1986, optimizó esta metodología seleccionando el nivel hormonal de 5 mg/l de Kn y 0.5 mg/l de 2,4-D para promover el desarrollo de callo, y el nivel hormonal de 30 mg/l de 2iP y 0.5 mg/l de AIA para favorecer la diferenciación del mismo y la producción del mayor nú

mero de brotes en el menor tiempo, solo que la inducción de brotes se obtuvo en el medio utilizado para el desarrollo de callo (medio de Groenewald, Wessels y Koleman, 1977) y no en el reportado por Díaz en 1985.

Para Echinocactus grusonii se reportan métodos de propagación, utilizando semillas (13, 16, 62), pero su propagación por cultivo de tejidos no se ha descrito de manera formal.

En 1982 Corona y Chávez reportan que utilizando técnicas in vitro con plántulas de semillas en el medio de Murashige - Skoog se tienen ya plántulas de E. grusonii y E. grandis pero no se presenta ningún detalle sobre el procedimiento y metodología por el cual se logró, por lo que no se tiene aún una metodología para su propagación por cultivo de tejidos.

Díaz G. en julio de 1985 (comunicación personal), inicia experimentos preliminares con E. grusonii en el laboratorio de Fitoproducción de la Comisión Nacional de Fruticultura, a partir de que una sola planta germinada asépticamente y que permaneció bajo estas condiciones durante varios meses, logró producir 22 retoños, lo que condujo a la idea de una reproducción asexual eficiente.

En estos experimentos se usaron como inóculos, areolas aisladas, discos de plántulas y plántulas sin raíz, en el medio de Murashige - Skoog complementado con BAP, y se observó que en el segundo inóculo (discos de plántulas) usando el medio complementado con 5 mg/l de BAP se logró la formación de brotes además de masas amorfas de tejido que en apariencia eran una masa de esferas unidas entre sí y que probablemente regenerarían en nuevas plantas. Se pudo notar que este inóculo presenta gran potencialidad probablemente debido a que las zonas en donde se incluye el tejido meristemático no se dañan al hacer este tipo de corte y las areolas son estimuladas hacia la producción de brotes, lo que no ocurrió con los inóculos restantes.

Uno de los mayores logros de estos experimentos fue que la producción de brotes se dió por vía directa, esto es, el tejido se mantuvo organizado, lo cual nos evita los riesgos que implica genéticamente hablando, la propagación por vía indirecta (desorganización de tejido y producción de callo).

En base a estos experimentos previos se planteó la presente investigación, en la que se trabajó con plántulas de semillas germinadas en condiciones asépticas, y como inóculos: plántulas sin porción apical ni raíz y

cortadas longitudinalmente, probando diferentes combinaciones de auxinas, -
citocininas y ácido giberélico.

2. OBJETIVOS.

La forma comercial más ampliamente utilizada del cultivo de tejidos ha sido la propagación clonal. Una gran cantidad de ornamentales, algunos frutales y vegetales y ciertos géneros forestales están siendo reproducidos de manera comercial con el uso del cultivo de tejidos.

Algunas de las investigaciones en esta área han probado que la técnica puede ser usada exitosamente como un método de propagación de cactáceas. -

Hasta la fecha Echinocactus grusonii puede ser propagado por cultivo de tejidos, sin embargo no se ha descrito la metodología para la obtención de plantas a partir de fragmentos de tejido cultivados asépticamente.

Por lo que en el presente proyecto se considera como objetivo general :

Desarrollar y describir la metodología con la que se logra la propagación por vía directa de Echinocactus grusonii mediante cultivo de tejidos.

Y como objetivos específicos:

1. Lograr la germinación aséptica de semillas donadoras de material vegetal.
2. Establecer el cultivo de inóculos provenientes de plántulas de las semillas germinadas asépticamente.
3. En una primera etapa experimental, evaluar el efecto de auxinas (IBA, AIA y ANA), citocininas (BAP, Kn, 2iP y Zea) y ácido giberélico (AG₃) - en forma individual y tomadas de dos en dos, sobre la producción por vía directa de brotes de buena calidad, determinando las mejores combinaciones.
4. Evaluar en una segunda etapa las combinaciones elegidas en la primera, - ampliando el rango de concentraciones al menos de una de las hormonas involucradas.
5. Determinar concentraciones óptimas que logren la obtención de un número mayor de brotes de buena calidad en menor tiempo, comparando con lo obtenido en la primera etapa.

3. MATERIALES Y METODOS.

El medio basal utilizado fué el de Murashoge - Skkog (1962) cuya formulación mineral y concentraciones de complementos orgánicos, se pueden ver en el APENDICE 1.

El medio fué complementado con varios reguladores de crecimiento: auxinas (AIA, ANA y IBA), citocininas (BAP, Kn 2iP y Zea) en una concentración de 10 y 20 μ M respectivamente.

Estos reguladores se probaron de manera individual así como combinados de dos en dos de acuerdo al diseño mostrado en el CUADRO 1., además del uso de GA₃ a una concentración de 10 μ M.

La preparación de los medios se simplificó usando soluciones stock de macroelementos y microelementos, así como de vitaminas y reguladores de crecimiento (APENDICE 5 y 6).

El pH se ajustó a 5.7 - 5.8 con ácido clorhídrico o hidróxido de Potasio al 0.1 N, según fuera necesario.

Al medio se le agregaron 8 gr/l de agar antes de vertirlo en los frascos de cultivo. Se pusieron 25 ml de medio por frasco, y se taparon para después ser esterilizados durante 15 minutos a una presión de 1.05 Kg/cm² y una temperatura de 120 °C.

3.1 GERMINACION DE SEMILLAS.

El material empleado para la obtención de inóculos, consistió de plántulas provenientes de semillas previamente germinadas en condiciones asépticas de Echinocactus grusonii.

La germinación de semillas se llevó a cabo con el método desarrollado por Díaz en 1985 (comunicación personal), la germinación fué bajo condiciones asépticas, utilizando frascos de cultivo de 20 ml de capacidad, con un soporte de algodón humedecido con 8 a 10 ml de medio líquido de De Fossard (1976), para germinación de semillas (APENDICE 2.). Los frascos se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.05 Kg/cm² y una temperatura de 120 °C durante 15 minutos.

AUXINAS 10 μ M

		SIN AUXINA	IBA	AIA	ANA	GIBERELINA 10 μ M
C I T O C I N I N A S 20 μ M	SIN CITOCI- NINAS	T1	T2	T3	T4	GA ₃ 10 μ M
	BAP	T5	T6	T7	T8	T9
	Kn	T10	T11	T12	T13	T14
	2iP	T15	T16	T17	T18	T19
	Zea	T20	T21	T22	T23	T24
	GA ₃ 10 μ M	T25	T26	T27	T28	

CUADRO 1. TRATAMIENTOS DE LA PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL FORMADOS A PARTIR DE REGULADORES DE CRECIMIENTO ADICIONADOS AL MEDIO DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE BROTES EN INOCULOS DE *E. grusonii* CULTIVADOS in vitro.

Antes de la germinación, las semillas fueron tratadas con una solución de ácido giberélico al 0.1 %, sumergiéndolas durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se pasaron a una solución de Hipoclorito de Calcio al 7% más 3 gotas de tween 20 al 0.1% para desinfectar, agitando levemente por 30 minutos.

Ya en la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se procedió a su siembra, poniendo de 2 a 3 semillas por frasco.

Hecha la siembra y dado que las semillas de cactáceas requieren luz para su germinación (23), se incubaron en un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad (días largos) bajo una intensidad luminosa de 1500 lux a una temperatura de 26 a 30 °C por tres meses.

3.2 OBTENCION DE INOCULOS.

La obtención de los inóculos se realizó a partir de las 14 a 16 semanas de cultivo, cuando las plántulas tuvieron un tamaño aproximado de 1.0 a 1.3 cm de longitud.

Se efectuaron cortes transversales, eliminando la zona de las raíces y la del ápice, y un corte longitudinal con el fin de obtener dos inóculos por plántula (FIGURA 5.), teniendo precaución de no eliminar la totalidad de las areolas.

Los cortes se hicieron sobre un cristal graduado, con el fin de estandarizar el tamaño de los inóculos. Estos tuvieron finalmente un tamaño promedio de 5 a 8 mm de longitud.

3.3 CULTIVO in vitro.

Los inóculos sembrados en los tratamientos fueron incubados por tres meses en una cámara de crecimiento a una temperatura de 26 a 30 °C y un fotoperíodo de 16 horas luz, con una intensidad luminosa de 1500 lux.

Todos los inóculos fueron subcultivados cada cuatro semanas a un medio



SEMILLAS EN EL MEDIO PARA GERMINACION
DE R.A. DE FOSSARD (1976).



PLANTULA DE 14 A 16 SEMANAS DE EDAD
(1.0 a 1.3 cm DE LONGITUD)



CORTES TRANSVERSALES Y
LONGITUDINALES.

INOCULO EN EL MEDIO
MURASHIGE-SKOOG (1962).

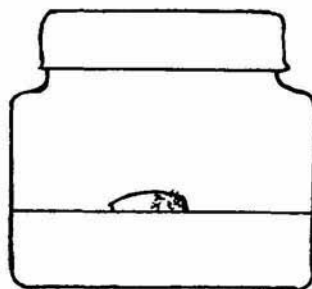


FIGURA 5. SECUENCIA SEGUIDA PARA LA OBTENCION DE INOCULOS.

fresco con el fin de evitar el agotamiento de nutrientes y la acumulación de desechos metabólicos que pudieren afectar la constante proliferación del tejido.

El trabajo experimental se desarrollo en dos etapas, en la primera se observó el efecto individual y combinado de auxinas, citocininas y ácido giberélico, con el fin de determinar la o las mejores combinaciones de reguladores de crecimiento que favorecieran el desarrollo de brotes axilares. Para tal efecto se elaboró un diseño de tratamientos (6 X 5) de todas las hormonas, en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones (cada repetición contiene un solo inóculo) (CUADRO 1).

Se realizaron evaluaciones semanales del tipo de respuesta del tejido en cada tratamiento durante tres meses.

De acuerdo con los resultados observados en la primera etapa experimental, en la segunda se seleccionaron de los 28 tratamientos iniciales, 3 de ellos, los que se caracterizaron por presentar el mayor número de brotes de buena calidad, que presentan grandes posibilidades de éxito a la adaptación a condiciones ambientales.

En esta etapa se amplió el rango de concentraciones con el fin de establecer rangos hormonales óptimos, al menos de una de las hormonas, que nos permitiera mejorar la respuesta ya obtenida.

El CUADRO 2 muestra las combinaciones así como concentraciones de las hormonas empleadas en ésta etapa.

MEDICIONES EFECTUADAS

Las evaluaciones semanales consistieron en registrar el tipo de diferenciación del tejido, tomando en cuenta las siguientes alternativas:

1. Formación de callo.
2. Crecimiento amorfo (C. A.)
3. Desarrollo de brotes axilares (calidad y cantidad)
4. Tipo de raíz, tomando en cuenta la cantidad y su ramificación.

1. En cuanto a la formación de callo, se pretendía evaluarlo tomando en cuenta su consistencia (grado de compactés), color, de acuerdo al catálogo - "Pantone Color Specifier" y el tamaño aproximado.

2. Para el crecimiento amorfo, solo se tomó en cuenta presencia o ausencia.

CCA - Con crecimiento amorfo.

SCA - Sin crecimiento amorfo.

3. En lo que se refiere al desarrollo de brotes axilares, dado que el objetivo de aplicar este primer cuadro fué determinar las combinaciones de reguladores de crecimiento que los favorecieran, se registró el número total de brotes producidos durante 12 meses de cultivo, además se consideró la variable que se denominó "tipo de vigor" de los brotes, que refleja su calidad, con la que finalmente se determinó el tratamiento que tuviera el mayor número de brotes de buena calidad. Para determinar el "tipo de vigor" se tomó en cuenta el tamaño final de los brotes, el tiempo requerido por estos para adquirir un tamaño mínimo de 1.0 mm de altura por 1.0 mm de diámetro, su forma y la abundancia de espinas en los brotes, relacionandose como se indica en el CUADRO 3.

4. Para el tipo de raíz se tomó en cuenta la cantidad y su ramificación, se consideraron cinco tipos de raíz que se diferenciaron como sigue:

- a) Raíz abundante-simple (AS), tomando como raíz abundante la presencia en el inóculo de más de 10 raíces.
- b) Raíz abundante-ramificada (AR).
- c) Raíz Poca-simple (PS), tomando como poca raíz la presencia en el inóculo de 1 a 4 raíces.
- d) Raíz poca-ramificada (PR).
- e) Ausencia de raíz en el inóculo (SR).

Para cada tratamiento se contó el número de repeticiones que presentaron cada uno de los tipos de raíz definidos.

A I A
CONCENTRACIONES EN mg/l

	0	0.2	0.8	1.0	1.5	1.86
SIN CITOC.	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Kn 20 μ M	T7	T8	T9	T10	T11	T12
2iP 20 μ M	T13	T14	T15	T16	T17	T18

CUADRO 2. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIA CON CONCENTRACIONES FIJAS DE Kn y 2iP PARA OPTIMIZACION DE LA INDUCCION - DE BROTES EN INOCULOS DE Echinocactus grusonii CULTIVADOS in vitro.

BROTOS VIGOROSOS (BV)*			BROTOS NO VIGOROSOS (BNV)*
BROTOS CON AREOLAS DEFINIDAS Y CON ESPINAS			BROTOS CON AREOLAS NO DEFINIDAS Y SIN ESPINAS
BROTOS MUY VIGOROSOS (BV)	BROTOS MEDIANAMENTE VIGOROSOS (BmV)	BROTOS POCO VIGOROSOS (BPV)	LAS CARACTERISTICAS DEL ENCABEZADO DEFINEN PERFECTAMENTE A LOS BROTOS NO VOGOROSOS.
4**	7	8	
\emptyset 5 ⁺ mm	2 \emptyset 4mm	1 \emptyset 2mm	
FC ⁺⁺ a- \emptyset 0.5mm	FC o FNC	FC o FNC	
ABUNDANTES* ESPINAS	ABUNDANTES ESPINAS	POCAS ESPINAS	

CUADRO 3. CARACTERISTICAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR EL "TIPO DE VIGOR" DE LOS BROTOS.

* BV, BNV se muestran en la FIGURA 6a y 6b respectivamente.

** Número de semanas requeridas por los brotes para alcanzar un tamaño mínimo de 1 mm de altura (a) por 1 mm de diámetro(\emptyset).

+ Diámetro que adquieren los brotes al final de la fase de experimentación (12 semanas)

++ FC, FNC forma cilíndrica y no cilíndrica respectivamente. Para considerarse de la primera forma es necesario una diferencia de a - \emptyset 0.5 mm.

* Un brote con abundantes espinas es aquel que tiene tubérculos bien definidos en forma de cono y con espinas gruesas que se distinguen fácilmente (FIGURA 7a). Mientras que uno con pocas espinas, tiene tubérculos en forma de cono pero el ápice de éstos es más achatado y sus espinas son mucho menos gruesas y cortas, dando apariencia de puntos blancos en el ápice de los tubérculos (FIGURA 7b).

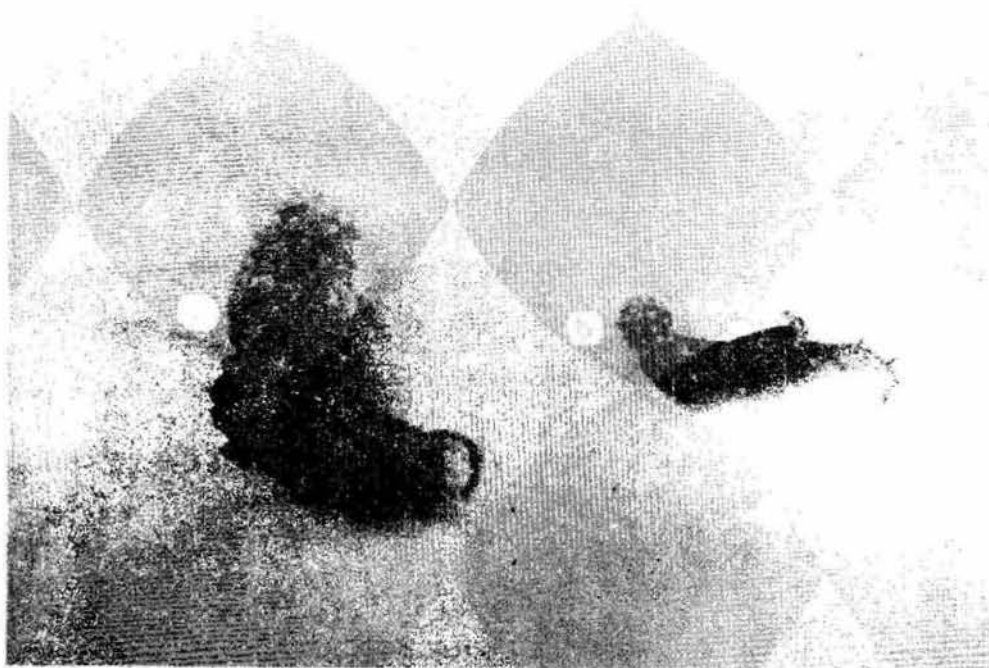


FIGURA 6. ASPECTO DEL VIGOR DE LOS BROTES

a. BROTES VIGOROSOS (BV)

b. BROTES NO VIGOROSOS (BNV)

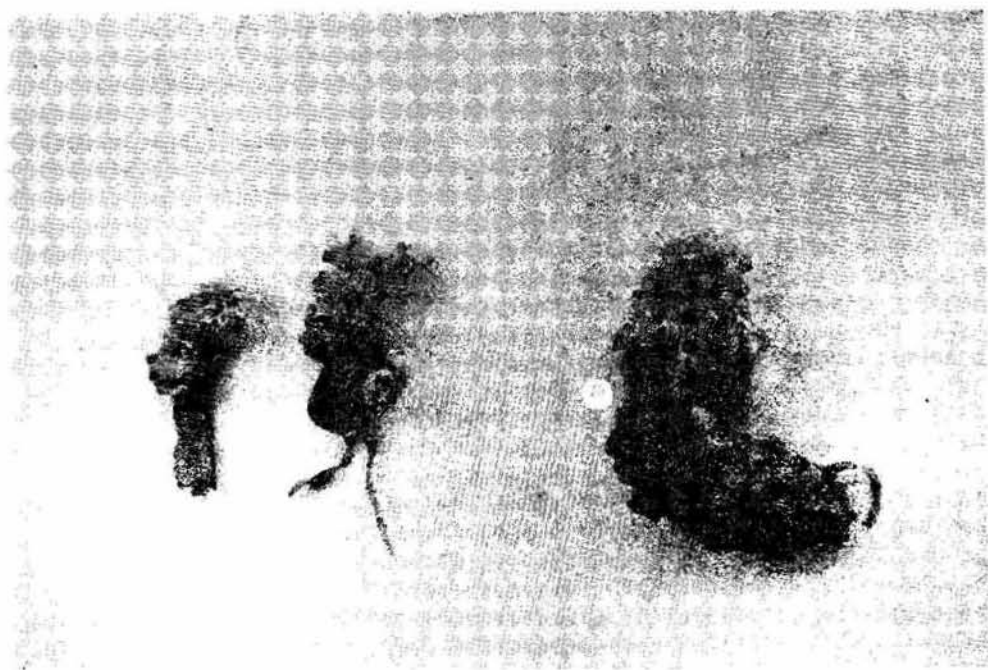


FIGURA 7. ASPECTO DE LA ABUNDANCIA DE ESPINAS EN LOS BROTES

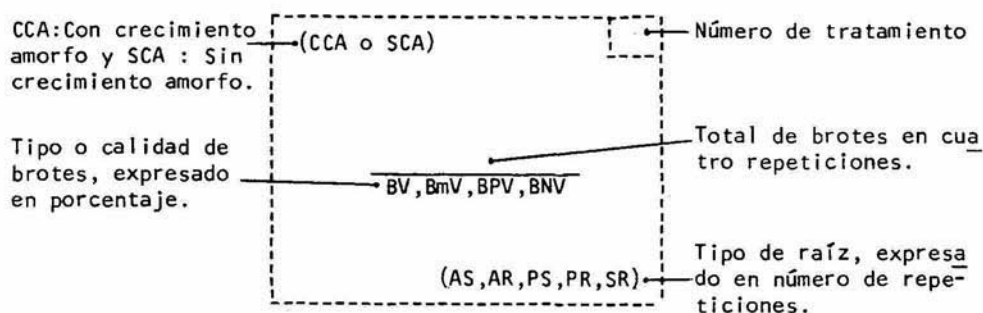
a. ABUNDANTES ESPINAS

b. POCAS ESPINAS

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 PRIMERA ETAPA.

De las plántulas desarrolladas entre las 14 a 16 semanas de cultivo, se tomaron los inóculos en estudio y para la aplicación de cada uno de los tratamientos de la primera etapa, se seleccionaron 4 inóculos de manera aleatoria. Los resultados obtenidos se muestran en el CUADRO 4. En dicho cuadro cada una de las celdas considera la notación de las categorías descritas en la metodología, que se refieren de modo resumido a lo siguiente:



Antes de analizar en detalle el cuadro 4, de manera general se mencionará el comportamiento de los tejidos en cultivo.

Los primeros signos morfológicos de organogénesis que condujeron al desarrollo de brotes, en algunas de las combinaciones hormonales probadas, fueron notados de los 10 a 15 días de cultivo, éste desarrollo de brotes ha sido reportado por algunos autores (32, 33, 35, 38, 39, 45, 56, 57) en cultivos adicionados con reguladores de crecimiento, de varias especies de cactus. La iniciación de brotes comienza con la activación de areolas, que --

AUXINAS 10 μ M

		SIN AUXINAS		IBA		AIA		ANA			
C I T O C I N I N A S 20 μ M	SIN CITOCINI- NAS	(SCA)	1	(SCA)	2	(SCA)	3	(SCA)	4	GA3 10 μ M	
		3		0		3		0			
		[0,66,33,0]		[0,0,0,0]		[0,100,0,0]		[0,0,0,0]			
		(0,2,1,1,0)		(0,4,0,0,0)		(0,4,0,0,0)		(0,3,0,0,1)			
	BAP	(CCA)	5	(SCA)	6	(SCA)	7	(SCA)	8	(SCA)	9
		5		0		2		3		5	
		[0,20,80,0]		[0,0,0,0]		[0,0,0,100]		[0,0,53,66]		[0,20,20,40]	
		(0,0,3,0,1)		(0,0,1,1,2)		(0,0,1,0,3)		(0,0,2,0,2)		(0,0,0,0,4)	
	Kn	(CCA)	10	(SCA)	11	(SCA)	12	(CCA)	13	(SCA)	14
		3		3		5		2		3	
		[0,33,0,66]		[0,33,66,0]		[20,80,0,0]		[0,50,50,0]		[0,0,0,100]	
		(0,0,2,0,2)		(0,0,2,2,0)		(0,0,2,2,0)		(0,0,2,0,2)		(0,0,1,0,3)	
	21P	(CCA)	15	(SCA)	16	(CCA)	17	(SCA)	18	(CCA)	19
		2		2		5		2		0	
		[0,0,50,50]		[0,50,50,0]		[40,40,20,0]		[0,50,0,50]		[0,0,0,0]	
		(0,0,1,1,2)		(0,0,2,0,2)		(0,0,1,3,0)		(0,0,3,0,1)		(0,0,1,0,3)	
	Zea	(CCA)	20	(SCA)	21	(CCA)	22	(CCA)	23	(SCA)	24
		0		2		0		1		2	
		[0,0,0,0]		[0,0,0,100]		[0,0,0,0]		[0,0,0,100]		[0,0,0,100]	
		(0,0,0,0,4)		(0,1,1,1,1)		(0,0,3,0,1)		(0,0,1,1,2)		(0,0,0,0,0)	
	GA3 10 μ M	(SCA)	25	(CCA)	26	(SCA)	27	(SCA)	28		
		0		2		0		0			
		[0,0,0,0]		[0,0,0,100]		[0,0,0,0]		[0,0,0,0]			
		(0,0,2,1,1)		(0,1,2,0,1)		(0,1,1,0,2)		(0,1,1,0,2)			

CUADRO 4. TOTAL DE BROTES, CALIDAD, COLOR DE CRECIMIENTO AMORFO Y TIPO DE RAICES PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO A LAS DOCE SEMANAS DE CULTIVO, COMO CONSECUENCIA DEL EFECTO DE AUXINAS, CITOCININAS Y ACIDO GIBERELICO APLICADOS POR SEPARADO Y COMBINADOS.

son meristemas areolares derivados directamente de la zona periférica del á pice del tallo (6, 7) y son comparables con los meristemas de yemas axilar es en muchas plantas (6).

Por la activación en el ápice areolar surgen nuevas espinas y el tejido en la base de la areola aumenta semejando pequeñas protuberancias con espinas en el ápice, que van creciendo y finalmente forman brotes.*

El desarrollo de brotes se pudo observar a lo largo de la mayor parte de la etapa experimental. En algunos tratamientos (12 y 17 : APENDICE 3) se observó desde las tres semanas de cultivo, mientras que en otros (tratamiento 26), hasta las 10 semanas.

A lo largo de ésta etapa el desarrollo de brotes fué directamente (a -- partir de la activación de areolas) FIGURA 8, sin embargo, observaciones hechas después de las doce semanas de cultivo, mostraron que los brotes pued es obtenerse por vía indirecta, aclarando que no se refiere al desarrollo de callo, sino al desarrollo de masas amorfas de tejido (crecimiento amorfo) caracterizado por presentar estructuras semejantes a tubérculos no bien definidos y de mayor tamaño que los normalmente formados en esta especie, en sus estados juveniles. Estos tubérculos presentaron areolas en su ápice -- que únicamente produjeron lana, y posteriormente dieron lugar a brotes FIGURA 9. Los brotes así obtenidos no están considerados en el cuadro de resultados (CUADRO 4) ya que como se mencionó, estos se desarrollaron después -- del período que abarcó la primera etapa experimental.

En el área de cultivo de tejidos, de manera reiterada se reporta que la respuesta se ve influenciada por las concentraciones y combinaciones hormonales empleadas (20, 41, 48, 60), ya que estas intervienen en estimular -- la actividad celular induciendo la desorganización del tejido que conduce a la diferenciación de brotes foliares y radiculares (inclusive en plantas completas), o bien a la desorganización de células y su permanencia en estado de callo.

* Cabe mencionar que con fines prácticos se consideraron brotes al adquirir un tamaño aproximado de 1 mm de diámetro por 1 mm de altura.

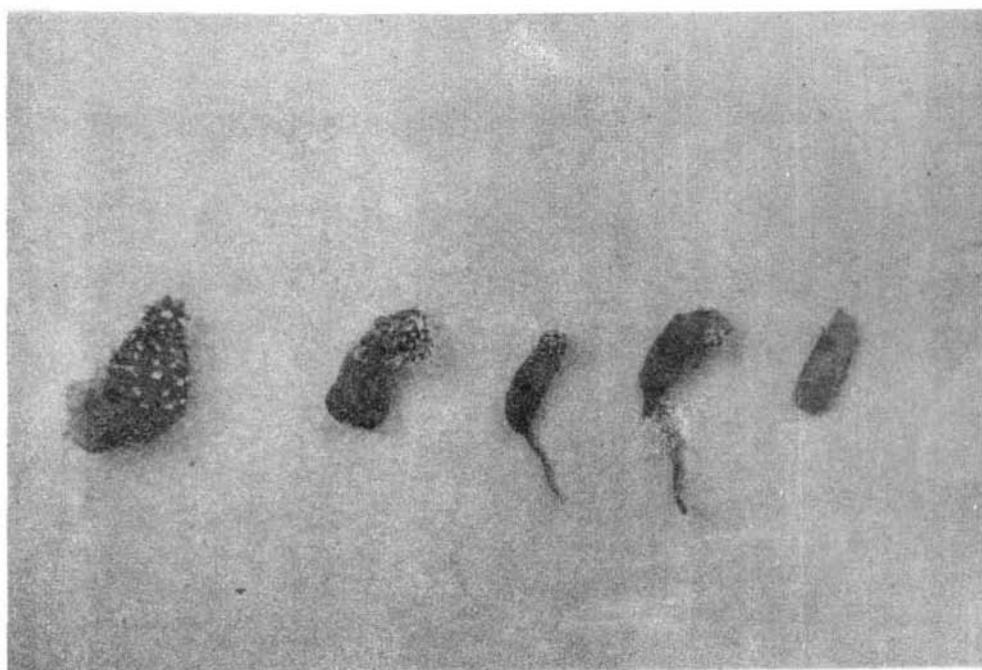


FIGURA 8. SECUENCIA PARA LA OBTENCION DE BROTES DE MANERA DIRECTA.

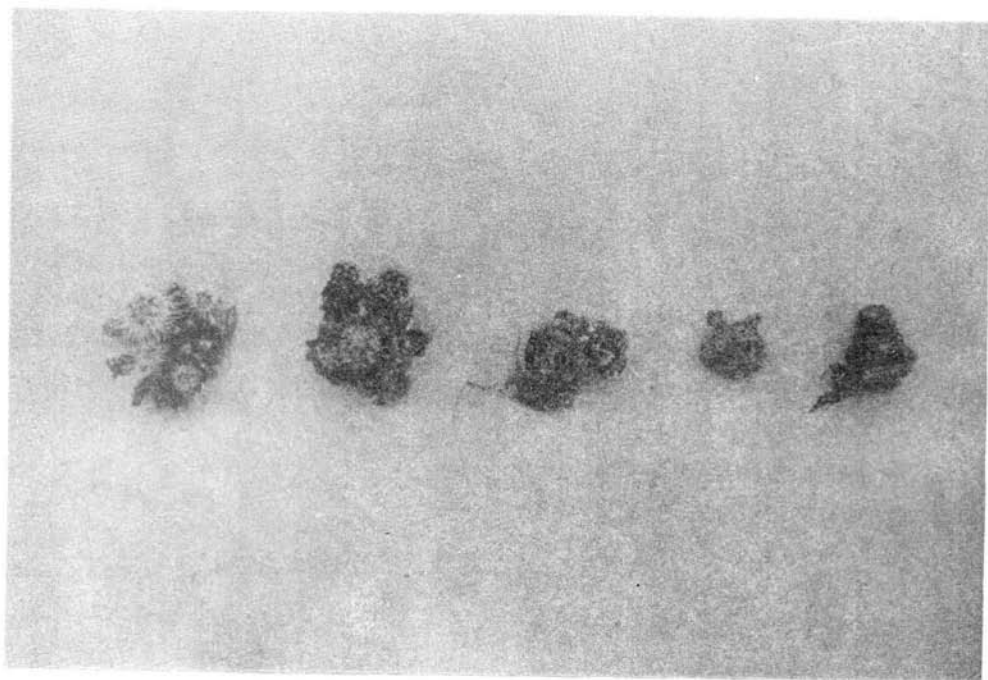


FIGURA 9. SECUENCIA PARA LA OBTENCION DE BROTES DE MANERA INDIRECTA (DESARROLLO DE CRECIMIENTO AMORFO).

Como se observa en el cuadro de resultados (CUADRO 4), en ninguno de los tratamientos está presente el crecimiento de callo ya que para su desarrollo, en cac_táceas, se requiere de un medio complementado con 2,4-D (19, 32, 58, 66), o bien altas concentraciones de 2,4-D (de 2 a 10 mg/l) en combinación con bajas concentraciones de Kn (de 1 a 2 mg/l) (19, 30, 33, 46), en el presente trabajo éstas condiciones no se contemplaron, ya que el objetivo fué obtener plantas por vía directa.

Otro tipo de respuesta observada en el cuadro de resultados, fué el desarrollo de crecimiento amorfo, cuyas características ya se han mencionado y que se presentó asarosamente.

Estas diferentes respuestas presentadas por los inóculos, están determinadas por el balance cuantitativo de la interacción entre constituyentes del medio de cultivo y factores endógenos en sitios particulares del tejido (Thorpe, T.A. 1981), además de la capacidad regenerativa del material vegetal.

El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico y complejo el cual está rigurosamente controlado, y en donde los reguladores de crecimiento juegan un papel importante, estando involucrados en los cambios morfogenéticos del vegetal.

En cultivo de tejidos, la clave de la respuesta morfogenética del inóculo está relacionada con el balance o interacción entre estos reguladores, más que en la suma de sus acciones individuales. Sin embargo, varios autores mencionan que los factores externos y aquellos inherentes a los inóculos son importantes para la diferenciación de órganos y que además de la adición exógena de auxinas-citocininas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, fosfatos y otros durante la regulación de la organogénesis, debe tomarse en cuenta la correlación intercelular, determinación genética y el estado fisiológico de la planta madre (Ingram, D.S. y Helgeson, 1980 y Leopold A.C. 1975).

Como se observa en el cuadro de resultados, la formación de brotes que en éste caso son los órganos de interés para el estudio, se logró en la mayoría de los tratamientos complementados con reguladores de crecimiento. Co

mo ya se ha mencionado su participación en la organogénesis, junto con otros factores, es importante, por lo que podríamos preguntarnos ahora ¿ Que ocurre con los brotes, cuando fragmentos de tejido son cultivados en medio no abastecido de reguladores de crecimiento?

La respuesta al respecto en el experimento, como se observa en el cuadro 4 es que también está presente su desarrollo.

Esta situación contradice los reportes que se tienen para algunas cactáceas, en los que se menciona que no hay ningún tipo de morfogénesis en un medio carente de reguladores (42).

Sin embargo, Steinhart en 1985 obtiene brotes en Leuchtenbergia principis, aunque en poca cantidad, sin el uso de reguladores de crecimiento.

Esta respuesta obtenida pudo deberse a la gran capacidad regenerativa de la especie, ya que las cactáceas en condiciones naturales producen hijuelos como una respuesta a heridas, y en este caso, el corte para la obtención del inóculo a partir del material original, produjo una respuesta del tejido, la que consistió en la activación de los puntos de crecimiento (meristemas areolares), incluyendo la intervención del contenido endógeno de hormonas presentes en los tejidos.

El responsabilizar a éstas condiciones del desarrollo de brotes nos haría pensar en que el usar o no reguladores de crecimiento exógenos realmente no tiene ninguna diferencia pues sin su uso podemos obtener brotes, sin embargo, hablando del contenido endógeno de hormonas, es sabido que dicho contenido disminuye y se agota cuando los tejidos son separados de la planta. Pudo ser que al no existir reguladores exógenos los niveles endógenos probablemente fueron los necesarios para inducir la formación de brotes pero no para seguir manteniendo su división celular, pues como se puede observar en el APENDICE 3, los brotes en el tratamiento que no se complementó con reguladores de crecimiento, aunque se obtienen durante las primeras semanas de cultivo, se mantuvieron pequeños durante toda la etapa experimental.

Entonces la ausencia de reguladores de crecimiento, no imposibilita la diferenciación de brotes, pero éstos brotes si los requieren para continuar

su crecimiento y división celular in vitro (37 y Roberts, 1976, citado por Dodds y Roberts, 1982).

ANALISIS DE RESULTADOS

Después de haber comentado de manera general el comportamiento de los tejidos, pasaremos a analizar el CUADRO 4, antes referido.

El resultado de nuestro experimento muestra que el efecto de las auxinas (IBA, AIA y ANA) probadas individualmente, sobre la formación de brotes varía, ya que la clase y calidad de hormonas de crecimiento aplicadas, usualmente ejercen efectos diferentes sobre el crecimiento de tejidos vegetales, y en éste caso solo en tejidos abastecidos con AIA se logra la proliferación de brotes.

El desarrollo de raíces, que en su mayoría fueron abundantes y ramificadas, se vieron favorecidas por las tres auxinas probadas, como hera de esperarse, ya que se habla de su uso como enraizadores (20, 37, 39). Y en el caso de AIA además de contribuir al desarrollo de raíz, también contribuye a la división celular en brotes (60).

Todas las auxinas fueron probadas a una misma concentración (10 M), sin embargo, el AIA es la más inestable de las tres ya que es fotolábil (Kenneth, V.T., 1972) y tiene por tanto una relación inversa con respecto al tiempo de exposición a la luz, por lo que la disminución en el contenido de auxinas en los tejidos quizá permitió alcanzar el balance auxina-citocinona (considerando los niveles endógenos de citocininas) adecuado para la activación del desarrollo de brotes. Por lo tanto podríamos pensar en la posibilidad de que una disminución en la concentración de auxinas más estables (IBA y ANA) que AIA permitirá también la proliferación de brotes.

El total de brotes obtenidos para este tratamiento es igual al del tratamiento que no se complementó con reguladores de crecimiento, por lo que se consideraría que la aparición de brotes en el tratamiento de AIA está influenciado más por las concentraciones endógenas de hormona que por el AIA exógeno, pero ya que uno de los aspectos importantes que determinan el

éxito de la regeneración de plantas no solo es la cantidad de brotes, sino también la calidad de éstos, conviene fijarnos en la calidad alcanzada por los brotes en ambos tratamientos.

Al respecto, como se observa a continuación la calidad de los brotes obtenidos no es muy diferente entre los dos tratamientos, concluyéndose entonces que al menos en esta especie, el uso de AIA de manera individual a una concentración de 10 M no mejora ni la cantidad ni la calidad de los brotes obtenidos.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE VIGOR DE LOS BROTES			
	BV	BmV	BPV	BNV
1	--	66	33	--
3	--	100	--	--

Analizando ahora el efecto de las citocininas probadas en forma individual, (tratamientos 5, 10, 15, 20) tenemos que como hera de esperarse todas disminuyen el desarrollo de raíz siendo poca para el caso de BAP, Kn y 2iP y nula para el caso de la Zeatina. En cuanto a su efecto sobre el desarrollo de brotes, se puede decir que solo la zeatina no promovió su desarrollo.

Con respecto al uso de la zeatina en propagación in vitro de cactáceas, solo se tiene un reporte en el que se menciona que la zeatina probada a diferentes concentraciones induce la formación de yemas en Opuntia polyacantha pero solo en algunos inóculos (42). Por lo que fué de interés evaluar su efecto en Echinocactus grusonii ya que como se menciona anteriormente el efecto que pueda tener un regulador de crecimiento sobre los tejidos cultivados dependerá de la concentración, así como del inóculo y de la especie trabajada.

Ahora bien, los resultados nos muestran que la zeatina sola o en combinación no contribuye al desarrollo de brotes en E. grusonii.

En el caso de las demás citocininas, todas promueven el desarrollo de brotes, siendo mayor en BAP (5 brotes) y 3 y 2 brotes para Kn y 2iP respectivamente. Sin embargo, en ninguno de estos tratamientos el porcentaje de vigor de los brotes supera al del tratamiento testigo.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE VIGOR DE LOS BROTES			
	BV	Bmv	BPV	BNV
1 Testigo	--	66	33	--
5 BAP	--	20	80	--
10 Kn	--	33	--	66
15 2iP	--	--	50	50
20 Zea	--	--	--	--

En relación a lo anterior se puede decir que el uso de citocininas de manera individual, y aún cuando estén actuando con los niveles endógenos de auxinas, estimulan deficiente desarrollo de brotes, en cuanto a cantidad y calidad de los mismos. Sin embargo, estos reguladores estimulan una gran división celular (37, 41) y promueven el desarrollo de crecimiento amorfo, que como ya se ha mencionado tiene la apariencia de ser un conjunto de tubérculos no bien definidos y que muestra ser una vía alternativa para la obtención de brotes.

Si consideramos ahora el efecto de auxinas en combinación con citocininas podemos observar que en todas las combinaciones de auxinas con BAP (tratamiento 6, 7 y 8) el desarrollo de raíz es deficiente y solo las combinaciones con AIA y ANA contribuyen al desarrollo de brotes, siendo para AIA de 2 y para ANA de 3. Al respecto Larzate, Gaiser y Brown (1982) con una combinación de 0.1 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP logran el inicio del desarrollo de brotes de Epiphyllum chrysocardium, en aproximadamente 10 días, para su posterior enraizamiento in vitro y adaptación a invernadero.

Refiriéndose a la relación entre auxinas y citocininas Skoog y Miller (citado por Thorpe, 1978) comentan que un nivel relativamente alto de citocininas sobre auxinas ocasiona formación de brotes, en tanto que una relación inversa, favorece la formación de raíz en tejidos de tabaco. Sin embargo, hacen notar que las generalidades de tal relación de reguladores, puede variar dependiendo de la especie y el inóculo trabajados.

Las combinaciones de BAP con AIA y con ANA contribuyeron al desarrollo de brotes, estos brotes no presentan características sobresalientes con respecto a su vigor, si los comparamos con los brotes del tratamiento que no se complementó con reguladores.

Por lo que se dice que la interacción de pestos reguladores no favorece ni el número ni la calidad de los brotes.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE VIGOR DE LOS BROTES			
	BV	BmV	BPV	BNV
1 Testigo	--	66	33	--
11 Kn / IBA	--	33	66	--
13 Kn / ANA	--	50	50	--
12 Kn / AIA	20	80	--	--

La combinación de Kn con ANA aunque promueve efectivamente el desarrollo de brotes, promueve el crecimiento amorfo.

Estos resultados muestran que la Kn en combinación con AIA tiene un papel determinante en la formación de brotes.

Al respecto Hill, J.R. en 1977 reporta la obtención de plnatas a partir de tejidos de semillas germinadas de la suculenta Conophytum ingniflorum en un medio complementado con la combinación de 2.0 mg/l de AIA y 2.5 mg/l de Kn y Silberstein, et al en 1983 combinando también Kn y AIA en concentraciones de 10 y 0.01 mg/l respectivamente, también logra el desarrollo de brotes en la suculenta Euphorbia flanaganii. Para ambos casos se observa que la relación entre auxinas y citocininas se mantiene en la proporción a-

deuada para la proliferación de brotes, esto es, la citocinina se encuentra en mayor proporción que la auxina.

En cuanto a la evaluación de las combinaciones de las auxinas con la citocinina 2iP (tratamientos 16,17, 18) el desarrollo de raíz se observa claramente disminuído en las tres combinaciones y se presenta el desarrollo de brotes, 2 brotes en el caso de las combinaciones con IBA y ANA y 5 en la combinación con AIA. Si comparamos el vigor de los brotes en estas combinaciones con los del tratamiento testigo, nos damos cuenta que la adición en el medio de 2iP en combinación con IBA o ANA no mejora ni el vigor ni la cantidad de brotes, en tanto que la adición en el medio de 2iP en combinación con AIA mejora tanto la cantidad como la calidad de los brotes, llegando a ser hasta de un 40% el total de brotes vigorosos (BV).

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE VIGOR DE LOS BROTES			
	BV	BmV	BPV	BNV
1 Testigo	--	66	33	--
16 2iP / IBA	--	50	50	--
18 2iP / ANA	--	50	--	50
17 2iP / AIA	40	40	20	--

En esta combinación además se presenta el crecimiento amorfo, por lo -- que aumenta la posibilidad de lograr una mayor proporción de brotes vigorosos considerando el tiempo de incubación de los tejidos mayor de 12 semanas.

Con respecto al uso de 2iP en la propagación in vitro de cactáceas -- Johnson y Emíno en 1977 reportan dos trabajos en los que usaron 2iP en concentracón de 40 mg/l logran la mayor proliferación de tallos en -- -- -- -- Mammillaria elongatha y una concentración de 20 mg/l en Opuntia polyacantha, mostrando la importancia que tiene esta citocinina al igual que la Kn, como

ya se ha mencionado, sobre el proceso de obtención de brotes.

El que los mejores resultados, en el caso de Kn y 2iP solo se hayan --- presentado al combinarse con AIA, apoya la afirmación expresada anteriormente con referencia a que en la respuesta morfogénica del inóculo es más importante el balance o interacción de reguladores de crecimiento que sus - acciones individuales .

Para el caso de las auxinas evaluadas en combinación con la Zeatina (tratamientos 21, 22 y 23) se observa que todas disminuyen el desarrollo de raíz y solo las combinaciones con IBA y ANA (tratamientos 21 y 23) promueven el desarrollo de brotes, aunque todos de mala calidad (100% BNV).

En algunas de estas combinaciones (Zea / AIA y Zea / ANA), está presente el desarrollo de crecimiento amorfo, y como lo muestra la FIGURA 10 a - las 18 semanas de cultivo, en éstos tratamientos se presentan brotes de muy buen aspecto, lo que nos permite suponer la posibilidad de obtención de brotes vigorosos con estas combinaciones, si se considera mayor el tiempo de - incubación.

Evaluando ahora los efectos de las combinaciones de ácido giberélico y auxinas (tratamientos 26, 27, 28) solo la combinación con IBA promovió el - desarrollo de brotes aunque ninguno es vigoroso. En cuanto al desarrollo - de raíz se observa que es mínimo para cada caso solo una repetición presentó raíz abundante, lo que es quizá resultado del uso de auxinas y no del ácido giberélico, ya que algunos autores como Mauseth y Halperin 1975, 1976, reportan que los primordios formados bajo la influencia de GA_3 producen espinas.

En cuanto al efecto del ácido giberélico en combinación con citocininas, se observó que la combinación con Zea, Kn y BAP (tratamientos 24, 14, 9) faveorece el desarrollo de brotes.

En los dos primeros, los brotes desarrollados son brotes no vigorosos, en tanto que en el caso de la combinación con BAP existen brotes medianamente vigorosos. El desarrollo de brotes en este tratamientos, así como la -- presencia de crecimiento amorfo en la combinación con 2iP (tratamiento 19) suponemos es debida al igual que en las combinaciones con auxinas al efecto

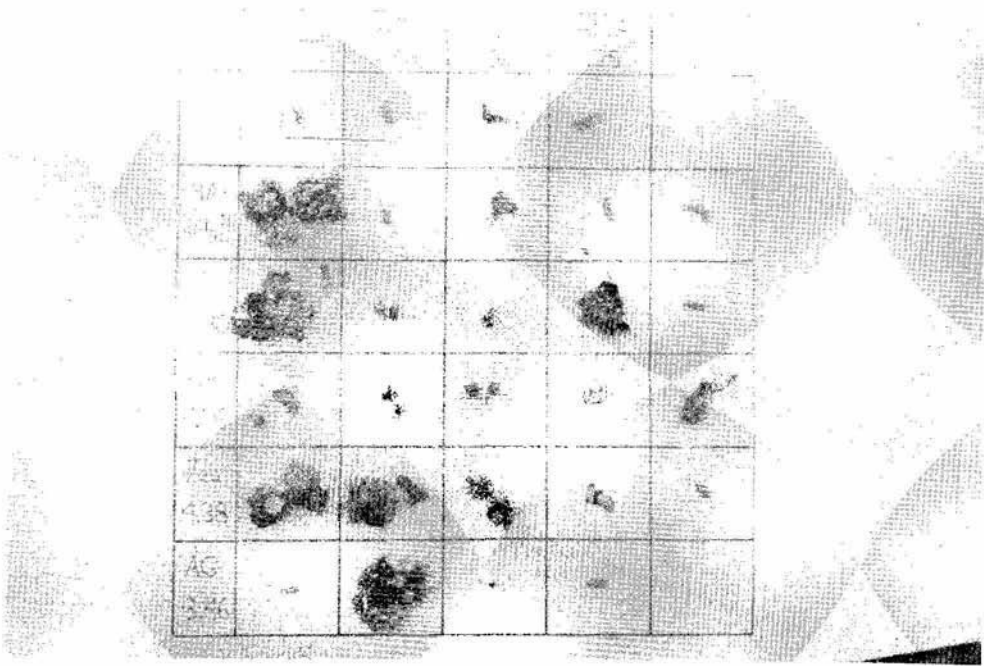


FIGURA 10. RESPUESTA DE LOS INOCULOS CULTIVADOS A LAS 18 SEMANAS DE INCUBACIÓN.

de la hormona adicional y no al ácido giberélico, lo que podemos apoyar si observamos los resultados del tratamiento donde se provó el AG₃ en forma individual en el que no se tiene ninguna respuesta, además que esta hormona es reportada como promotor de la elongación y represor de la formación de brotes y cualquier clase de tejido organizado (41).

En cuanto al uso del ácido giberélico en cultivos in vitro de cactus los reportes que se tienen resaltan su influencia en la activación de areolas y posterior producción de espinas (43).

En numerosos trabajos de investigación, se hace uso de reguladores de crecimiento combinados o individualmente para obtener el medio que logre la propagación de especies vegetales.

En cactáceas el uso de reguladores de crecimiento es muy variada, como se observa en los diferentes reportes que sobre el tema se tienen, sin poder generalizar su uso. Como ya se ha mencionado, las interacciones entre los factores del crecimiento, especialmente auxinas y citocininas, y entre estos y otros factores (no analizados en este trabajo) participan en los mecanismos de regulación del crecimiento, desde la elongación celular hasta la formación de órganos.

Los resultados muestran que existen reguladores de crecimiento con los cuales el tejido de cactáceas responde, ya sea con desarrollo de brotes, raíz, crecimiento amorfo o incluso de los tres. Combinando estos reguladores es posible plantear una secuencia para la obtención de plantas, con el propósito final de la propagación vegetativa.

Es conveniente anotar que el desarrollo de raíz es favorecido por la aplicación de auxinas (IBA, AIA, ANA).

En cuanto al desarrollo de crecimiento amorfo no podemos asegurar que las combinaciones hormonales en las que ocurrió sean determinantes para su desarrollo ya que fué azaroso.

En lo que respecta al desarrollo de brotes, este se ve favorecido por algunas combinaciones entre auxinas y citocininas promoviendo el desarrollo de brotes de distinto vigor, por lo que es importante determinar cual de es

tas combinaciones nos permite tener los brotes de mejor calidad. Esto con el propósito final de establecer uno de los pasos por los que se logra la propagación in vitro de la planta por vía directa.

Dado que las diferencias que puedan presentarse entre las distintas relaciones hormonales pueden observarse a través de la presencia de raíz, el crecimiento alorfo (C.A.) y fundamentalmente, dado el interés de nuestro estudio, el desarrollo de brotes (número y calidad) se procedió a determinar si la raíz y el C.A. tienen alguna relación con el desarrollo de brotes.

Para ello se aplicó una pequeña prueba estadística construyendo tablas de 2 X 2 en las que se considera presencia o ausencia de las características mencionadas. (TABLA 1)

		BROTOS		
		SIN	CON	TOT
C.A.	SIN	58	37	95
	CON	11	6	17
	TOT	69	43	112

		BROTOS		
		SIN	CON	TOT
SIN	33	18	51	
CON	35	26	61	
TOT	68	44	112	

TABLA 1. NUMERO TOTAL DE CASOS CON PRESENCIA O AUSENCIA DE LAS CARACTERISTICAS EN ESTUDIO.

Al aplicar la prueba estadística de Ji^2 con la corrección de Yates para tablas de 2 X 2 (TABLA 2), los resultados indican que se acepta la hipótesis nula, pues los riesgos de rechazo de dicha hipótesis son altos, -- 100 y 44% respectivamente, por lo que se concluye que no existe relación entre el desarrollo de brotes con C. A. y con raíz.

	VALOR Ji^2	G.L.	PROBABILIDAD
BROTOS VS. C.A.	0.000	1	1.000
BROTOS VS. RAIZ	0.585	1	0.445

TABLA 2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA PROBAR LA HIPOTESIS DE INDEPENDENCIA ENTRE CARACTERÍSTICAS.

Considerando únicamente el número de brotes obtenidos por tratamiento se construyó la TABLA 3 en la que se observa que solo tres de las combinaciones evaluadas promueven un aumento en el número de brotes con respecto al tratamiento que no tuvo reguladores de crecimiento. Estas combinaciones son BAP / Sin Auxina, Kn / AIA y 2iP / AIA, las cuales produjeron un total de 5 brotes.

Si observamos rápidamente estos resultados, podríamos aventurarnos a concluir que ni el balance o interacciones entre auxinas y citocininas ni el efecto individual de éstos tiene mayor relevancia en la producción de brotes, ya que su variación con respecto al tratamiento que no se complementó con reguladores de crecimiento es baja e incluso en algunos casos el uso de reguladores trajo consigo una disminución en el número de brotes producidos.

		A U X I N A S 10 μ M				TOT
		SIN A	IBA	AIA	ANA	
C I T O C I N I N A S 20 μ M	SIN C	3(7.0)	0	3(7.0)	0	6(14.0)
	BAP	5(11.6)	0	2(4.7)	3(7.0)	10(23.3)
	Kn	3(7.0)	3(7.0)	5(11.6)	2(4.7)	13(30.2)
	2iP	2(4.7)	2(4.7)	5(11.6)	2(4.7)	11(25.6)
	Zea	0	2(4.7)	0	1(2.3)	3(7.0)
	TOT	13(30.2)	7(16.3)	15(34.9)	8(18.6)	43(100)

TABLA 3. NUMERO DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO CONSIDERANDO LAS AUXINAS Y CITOCININAS EVALUADAS.
() PORCENTAJE DE BROTES CON RESPECTO AL TOTAL.

Sin embargo, como se ha mencionado esta es una conclusión aventurada si no se consideran otros factores que intervienen necesariamente en el -- proceso organogenético.

El que las variaciones observadas en el número de brotes producidos en cada combinación evaluada hayan sido leves podemos decir que fueron causadas por varios factores entre los que consideramos:

a) El número de observaciones, ya que los inóculos evaluados por tratamiento fueron pocos y no permitieron asegurar que el resultado presentado sea verdaderamente efecto de cada combinación.

b) Otro aspecto importante a considerar es referente a la obtención de los inóculos. Pues creemos que uno de los principales problemas en el estudio organogenético fué que el inóculo al provenir de semillas presenta - alta variabilidad y por tanto una respuesta no homogénea, además de otros puntos no considerados como las condiciones ambientales bajo las que se colectaron las semillas y la época del año en que se obtuvieron los inóculos

para el cultivo aséptico (febrero de 1986) que quizá no haya sido la más adecuada, ya que las cactáceas en condiciones naturales son estimuladas al crecimiento durante los meses de Mayo - junio (28) y como también lo menciona Murashige en 1974, la época del año en que se obtiene el inóculo también puede influir en sus características regenerativas.

c) En cuanto a los requerimientos del medio de cultivo, Thorpe y Stefania (1981) mencionan a cinco grupos de componentes definidos que son requeridos para los procesos de organogénesis: Las sales inorgánicas, la fuente de energía, las vitaminas, la fuente de nitrógeno orgánico y los reguladores de crecimiento, y sobre el medio ambiente físico incluyen el estado físico del medio, el pH, la humedad, la luz y la temperatura.

Al respecto las condiciones prevaletentes en nuestros experimentos son las que se han reportado para otras especies de cactus que han sido propagadas exitosamente.

Ya que ésta etapa se aplicó como una etapa de exploración para ver la respuesta del inóculo en cuanto a la producción de brotes en cada una de las combinaciones, aunque no hay un efecto significativo del uso de hormonas exógenas, es importante determinar que combinaciones permiten obtener los resultados más prometedores, por lo que regresando a la TABLA 3 parcialmente decimos que las mejores combinaciones fueron, el tratamiento 5 (BAP / Sin A), tratamiento 12 (Kn / AIA) y tratamiento 17 (2iP 6 AIA), sin embargo, como ya se ha mencionado no solo la cantidad sino también la calidad de los brotes son importantes para determinar el éxito de la regeneración de plantas, por lo que es de interés ahora considerar la cantidad de brotes de buena calidad, tomando en cuenta que BV y BmV son brotes de calidad deseada y BPV y BNV, brotes de calidad no deseada.

Para tal efecto se construyó la TABLA 4, en la que se observa claramente que solo tres de las combinaciones presenta mayor cantidad de brotes de calidad deseada. Tales combinaciones son el tratamiento 3 (SIN C / AIA), el 12 (Kn / AIA) y 17 (2iP / AIA) con 3, 5 y 4 brotes de calidad deseada respectivamente.

A U X I N A S 20µM

		SIN A	IBA	AIA	ANA	TOT	
20 µM	C						
	I						
	T	SIN C	1(2)	0	3(0)	0	4(2)
	O	BAP	1(4)	0	0(2)	0(3)	1(9)
	C	Kn	1(2)	1(2)	5(0)	2(0)	9(4)
	I	2iP	0(2)	1(1)	4(1)	1(1)	6(5)
N	Zea	0	0(2)	0	0(1)	0(3)	
A	TOT	3(10)	2(5)	12(3)	3(5)	20(23)	
S							

TABLA 4. NUMERO TOTAL DE BROTES DE CALIDAD DESEADA Y NO DESEADA
 PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO.
 () BROTES DE CALIDAD NO DESEADA.

La combinación SIN A / BAP (tratamiento 5) a pesar de presentar gran número de brotes (5 brotes) no resulta ser de mayor relevancia ya que solo uno de los brotes es de calidad deseada.

Las pequeñas diferencias en cuanto a la calidad y cantidad de brotes dadas por los tratamientos aplicados, permitieron detectar reguladores de crecimiento que son de gran importancia para la propagación de brotes con altas posibilidades de sobrevivencia al trasplante. Estos reguladores fueron AIA en combinación con Kn y 2iP que al ser evaluados en una segunda etapa experimental permitieron detectar rangos hormonales óptimos (al menos de una de las hormonas) que mejoraron la respuesta obtenida en lo que se refiere al número de brotes de calidad deseada, como se discute a continuación.

4.2 SEGUNDA ETAPA

Las combinaciones elegidas en la primera etapa se llevaron a una segunda, en la que se evaluaron diferentes concentraciones de AIA, manteniéndose constantes las de las citocininas, como se indicó en el CUADRO 2.

A continuación se presenta en la FIGURA 11 el comportamiento de los inóculos a las 12 semanas de cultivo en cada tratamiento y de manera descriptiva en el CUADRO 5.

En ésta etapa el desarrollo de brotes es la característica predominante, presentándose en todos los tratamientos evaluados. Su desarrollo se empieza a notar al igual que en la primera etapa de los 10 a 15 días de cultivo. La obtención de brotes ocurrió en algunos tratamientos desde las 3 semanas (APENDICE 4) y en otros hasta las 11 semanas, lo que permitió ver su desarrollo a lo largo de la mayor parte de ésta etapa.

El desarrollo de brotes al igual que en la primera etapa se originó a partir de la activación de areolas y una pequeña parte de crecimiento amorfo, observándose cambios importantes en cuanto al número de brotes en relación a los tratamientos.

En lo que se refiere al desarrollo de raíz, se presenta en todos los tratamientos, pero la abundancia y ramificación de las mismas varía dependiendo de la combinación, presentándose la respuesta más uniforme en los tratamientos donde está presente solo el AIA en sus diferentes concentraciones (tratamiento 1 a 6).

En cuanto a crecimiento amorfo, se presentó indistintamente en tratamientos en donde se evalúa AIA en forma individual y AIA en combinación con 2iP.

Para el caso de AIA en combinación con Kn el crecimiento amorfo siempre estuvo presente aunque no en todas las repeticiones, lo que probablemente es debido a la variabilidad del material al provenir de semilla y a la capacidad de los inóculos para regenerar este tipo de morfogénesis.

AIA

mg/L	0	0.2	0.8	1.0	1.5	186
—						
Kn 4.30						
2iP 4.06						

FIGURA 11. RESPUESTA DE LOS INOCULOS A LAS DOCE SEMANAS DE CULTIVO EN LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.

A I A
CONCENTRACIONES EN mg./lt.

	SIN AUXINA	0.2	0.8	1.0	1.5	1.86
SIN	(SCA) 1	(SCA) 2	(SCA) 3	(SCA) 4	(SCA) 5	(CCA) 6
CITOCINI- NINAS	3 [0,100,0,0] (0,3,2,0,0)	4 [0,75,0,25] (0,2,1,1,1)	2 [0,0,100,0] (1,0,1,2,0)	3 [0,0,66,33] (1,1,2,0,0)	5 [0,40,20,40] (0,4,0,0,1)	7 [0,86,14,0] (0,4,0,2,2)
Kn	(CCA) 7	(CCA) 8	(CCA) 9	(CCA) 10	(CCA) 11	(CCA) 12
20 μ M	4 [0,0,25,75] (0,0,2,1,3)	6 [0,33,33,33] (0,0,4,1,2)	15 [42,8,14,2,14,2,28,5] (1,1,4,0,3)	12 [7,6,46,1,7,6,38,4] (0,0,4,0,4)	13 [46,5,20,20,13,3] (4,1,1,0,1)	14 [30,7,38,4,23,7,6] (0,0,4,0,5)
2iP	(CCA) 13	(CCA) 14	(CCA) 15	(SCA) 16	(CCA) 17	(SCA) 18
20 μ M	4 [0,75,25,0] (0,0,1,1,4)	19 [15,7,36,8,21,26,3] (0,0,1,0,4)	16 [25,31,2,17,7,25] (0,0,2,1,4)	8 [0,62,5,25,12,5] (0,0,4,0,1)	3 [0,0,100,0] (0,0,0,0,6)	7 [57,1,42,8,0,0,1] (0,0,2,3,5)

CUADRO 5. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE AIA EN COMBINACION CON LAS CITOCININAS Kn 2iP PROBADAS A UNA CONCENTRACION DE 20 μ M, - SOBRE EL NUMERO Y CALIDAD DE BROTES, CRECIMIENTO AMORFO Y TIPO Y ABUNDANCIA DE RAIZ, PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO A LAS DOCE SEMANAS DE CULTIVO.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A I A
CONCENTRACIONES EN mg./lt.

	SIN AUXINA	0.2	0.8	1.0	1.5	1.86
SIN	(SCA) 1	(SCA) 2	(SCA) 3	(SCA) 4	(SCA) 5	(CCA) 6
CITOCINI- NINAS	3 [0,100,0,0] (0,3,2,0,0)	4 [0,75,0,25] (0,2,1,1,1)	2 [0,0,100,0] (1,0,1,2,0)	3 [0,0,66,33] (1,1,2,0,0)	5 [0,40,20,40] (0,4,0,0,1)	7 [0,86,14,0] (0,4,0,2,2)
Kn	(CCA) 7	(CCA) 8	(CCA) 9	(CCA) 10	(CCA) 11	(CCA) 12
20 μ M	4 [0,0,25,75] (0,0,2,1,3)	6 [0,33,33,33] (0,0,4,1,2)	15 [42.8,14.2,14.2,28.5] (1,1,4,0,3)	12 [7.6,46.1,7.6,38.4] (0,0,4,0,4)	13 [46.8,20,20,13.3] (4,1,1,0,1)	14 [30.7,38.4,23,7.6] (0,0,4,0,5)
2iP	(CCA) 13	(CCA) 14	(CCA) 15	(SCA) 16	(CCA) 17	(SCA) 18
20 μ M	4 [0,75,25,0] (0,0,1,1,4)	19 [15.7,36.8,21,26.3] (0,0,1,0,4)	16 [25.31,2,17,7,25] (0,0,2,1,4)	8 [0,62,5,25,12.5] (0,0,4,0,1)	3 [0,0,100,0] (0,0,0,0,6)	7 [57.1,42.8,0,0,] (0,0,2,3,5)

CUADRO 5. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE AIA EN COMBINACION CON LAS CITOCININAS Kn 2iP PRORADAS A UNA CONCENTRACION DE 20 μ M, SOBRE EL NUMERO Y CALIDAD DE BROTES, CRECIMIENTO AMORFO Y TIPO Y ABUNDANCIA DE RAIZ, PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO A LAS 60SE SEMANAS DE CULTIVO.

4.2.1 ANALISIS ESTADISTICO.

Al igual que en la primera etapa experimental, el análisis solo se refiere a las diferencias presentadas entre las distintas relaciones hormonales en cuanto a la regulación de la producción de brotes. Aquí también se consideró importante determinar la posible relación entre el desarrollo de brotes y el de raíz y C.A., para lo cual se construyó la TABLA 5, en la que se considera el número total de casos con presencia o ausencia de las características en estudio.

		BROTOS		
		SIN	CON	TOT
RAIZ	SIN	16	39	55
	CON	18	59	77
	TOT	34	98	132

		BROTOS		
		SIN	CON	TOT
C. A.	SIN	27	77	104
	CON	7	21	28
	TOT	34	98	132

TABLA 5. NUMERO TOTAL DE CASOS CON PRESENCIA O AUSENCIA DE LAS CARACTERISTICAS EN ESTUDIO EN LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.

Al aplicar el análisis de J_i^2 con la corrección de Yates para probar la hipótesis de independencia de efectos, la hipótesis nula no se rechaza

ya que los riesgos de rechazo son muy altos 29 y 100% respectivamente. Concluyéndose que no existe relación entre las características analizadas, por lo que se procedió al análisis solo del desarrollo de brotes (número y calidad).

ANALISIS DEL DESARROLLO DE BROTES.

Considerando únicamente el número total de brotes producidos por tratamiento, se construyó la TABLA 6.

		CITOCININAS 20 μ M			TOT
		SIN C	Kn	2IP	
A I A mg/l	0	3(2.0)	4(2.75)	4(2.75)	11(7.56)
	0.2	4(2.75)	6(4.13)	19(13.10)	29(19.98)
	0.8	2(1.34)	15(10.34)	16(11.03)	33(22.74)
	1.0	3(2.06)	12(8.27)	8(5.51)	23(15.84)
	1.5	5(3.44)	13(8.96)	3(2.06)	29(17.22)
	1.86	7(4.82)	14(9.65)	7(4.82)	28(19.29)
TOT		24(16.50)	64(44.13)	57(39.31)	145(100)

TABLA 6. NUMERO TOTAL DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO.

() PORCENTAJE DE BROTES CON RESPECTO AL TOTAL.

En esta tabla se puede observar que el número total de brotes varía -- considerablemente dependiendo de la combinación, por ejemplo, para el tratamiento que no fué complementado con reguladores de crecimiento tenemos 3 brotes, al adicionar AIA éste número varía, aumentando, disminuyendo e incluso manteniéndose igual al cambiar la concentración de AIA, sin ser --

aparentemente cambios significativos.

Si observamos el efecto de Kn y lo comparamos con el de AIA, nos podemos dar cuenta de que hay importante efecto, pues se incrementa el número de brotes producidos en todas las concentraciones de AIA observandose marcadamente en el tratamiento 9 (0.8 mg/l de AIA en combinación con Kn) ya que de 2 brotes producidos en 0.8 mg/l de AIA, el número asciende a 15 al combinarlo con Kn.

Para el caso de 2iP la situación es diferente, pues es verdad que el número de brotes producidos varía al cambiar la concentración de AIA, sin embargo, comparando con los tratamientos en que solo se presenta AIA algunas combinaciones aumentan el número total de brotes, como son las combinaciones de 0.2 y 0.8 mg/l de AIA con 2iP siendo de 19 y 16 respectivamente el número de brotes producidos, y combinaciones como la del tratamiento 17 (1.5 mg/l de AIA en combinación con 2iP) en que el número de brotes disminuye de 5 en 1.5 mg/l a 3 al combinarlo con 2iP.

En ambos casos se hace evidente la influencia del balance o interacción entre ambos reguladores en la producción de brotes.

En el caso de Kn parece existir una relación directa entre las concentraciones de AIA usadas y la producción de brotes, en tanto que para 2iP parece ser contrario, pues el total de brotes producidos por tratamiento primero aumenta y llega a un óptimo a partir del cual comienza a disminuir al aumentar las concentraciones de la auxina.

En esta etapa se observa una mayor homogeneidad en la respuesta en comparación con la primera a pesar de que los inóculos también provienen de semilla. Se piensa que esta mejor respuesta de los inóculos podría estar relacionada con la mayor capacidad regenerativa de los tejidos, ya que la etapa se estableció durante el mes de Junio, tiempo en que estas plantas presentan crecimiento vegetativo en condiciones naturales. Además de que el número de observaciones fué mayor.

Para analizar estadísticamente los resultados de la TABLA 6, se elaboró el análisis de varianza (ANOVA) considerando el número de brotes obtenidos por repetición en cada tratamiento.

Los resultados del análisis estadístico se encuentran en la siguiente tabla, en la que se observa que la F calculada tanto para las citocininas usadas, como para las concentraciones de auxina y las interacciones entre estas, son altamente significativas con un $0,05$, por lo que se puede concluir que los efectos diferentes sobre el número de brotes producidos están dados por las citocininas como por AIA así como por las combinaciones entre sus niveles.

F. V.	S. C.	G. L.	C. M.	R. V.	F $0,05$
CITOCININAS	30.422	2	15.211	15.135	3.15
CONCENTRACIONES DE AIA	20.055	5	4.011	3.991	2.37
AIA X CITOCINI NAS	46.512	10	4.651	4.627	1.99
TRATAMIENTOS	96.989	17	5.705		
ERROR	72.4	72	1.005		
TOTAL	169.389	89			

TABLA 7. RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA APLICADO AL TOTAL DE BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO.

De aquí que haya sido importante determinar las diferencias entre las combinaciones con el fin de proponer aquellas que tengan mayor influencia sobre la producción de brotes de E. grusonii, para lo cual se aplicó la -- prueba de Tukey de diferencias mínimas significativas (DMS), resultando lo siguiente:

CITOCININAS

TRATAMIENTOS	\bar{X} TRATAMIENTO
Kn	2.133
2iP	1.90
SIN C	0.80

CONCENTRACIONES DE A I A

TRATAMIENTOS	\bar{X} TRATAMIENTO
0.8	2.2
0.2	1.933
1.86	1.86
1.0	1.533
1.5	1.4
0	0.733

En cuanto a las citocininas podemos decir que ambas (Kn y 2iP) son estadísticamente diferentes con respecto al nivel SIN C con un $\alpha = 0.05$ y que no hay diferencias estadísticas entre ambas citocininas por lo que si se busca un aumento en la producción de brotes en tejidos cultivados de E. grusonii deben usarse citocininas ya sea Cinetina (Kn) o bien Isopenteniladenina (2iP) a una concentración de 20 μ M.

Para el caso de las concentraciones de AIA, como se observa, los niveles 0.2, 0.8 y 1.86 mg/l son estadísticamente diferentes con respecto al nivel 0 mg/l con un $\alpha = 0.05$ y que entre estas tres no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su efecto sobre el número de brotes producidos.

De lo anterior se puede concluir que si se quiere mejorar la respuesta de brotación en los inóculos se debe usar además de Kn o 2iP concentraciones de 0.2, 0.8 ó 1.86 mg/l de AIA.

Ya que las mejores combinaciones para esta etapa están incluidas las dos citocininas y tres de los niveles de AIA es necesario considerar otras características tales como la calidad de los brotes y el costo de las hormonas, ya que tomando en cuenta únicamente el número de brotes producidos encontramos que son seis las combinaciones recomendadas.

Para hacer la evaluación de la calidad de los brotes producidos en estos tratamientos se elaboró la TABLA 8 la cual considera únicamente el número de brotes producidos de calidad deseada, esto es, la suma de brotes vigorosos (BV) y brotes medianamente vigorosos (BmV) para los tratamientos elegidos.

		CITOCININAS 20 μ M		
		Kn	2iP	TOT
A I A	0.2	2	10	12
	0.8	9	9	18
	1.86	9	7	16
mg/l	TOT	20	26	46

TABLA 8. NUMERO TOTAL DE BROTES DE CALIDAD DESEADA PRODUCIDOS POR COMBINACION.

En ésta tabla se observa que para Kn el número de brotes desarrollados de calidad deseada varía del nivel 0.2 al 0.8 mg/l y 1.86 mg/l (de 2 brotes a 9). Para 0.8 y 1.86 mg/l no hay diferencias en el número de brotes de calidad deseada, y considerando los costos como otro criterio de selección, el nivel de 0.8 mg/l será el más conveniente.

Para 2iP el nivel de 0.2 y 0.8 mg/l de AIA muestra solo una diferencia de 1 brotes, en tanto que entre el nivel 0.2 y 1.86 mg/l existe una diferencia de 3 brotes, por lo que usar una concentración de 0.2 mg/l de AIA - en combinación con 2iP, resulta ser el tratamiento que mejora la cantidad de brotes de calidad deseada.

Observando únicamente estas dos combinaciones elegidas tenemos:

<u>Kn / 0.8mg/l</u>	<u>2iP / 0.2 mg/l</u>
---------------------	-----------------------

9

10

y si tomamos en cuenta que :

1. La diferencia en el número de brotes producidos de buena calidad no es significativa entre los tratamientos, por lo que son iguales.
2. El costo entre ambas citocininas es diferente, siendo mayor para 2iP.
3. Solo existe una diferencia de 0.6 mg/l entre ambas concentraciones de AIA.

Entonces la combinación de Kn 20 μ M y 0.8 mg/l de AIA es la óptima para lograr la mayor producción de brotes de buena calidad, aumentando las posibilidades de los brotes al éxito del trasplante, aspecto que es muy importante, ya que como se ha mencionado (63) una parte muy importante en lo que se refiere a la propagación vegetativa es su éxito no solo en la proliferación in vitro, sino su transformación efectiva de una condición heterótrofa a una autótrofa lo que implica la adaptación de la planta al medio ambiente.

En esta etapa se mostró que la respuesta morfogénica del inóculo - está influenciada por la presencia de hormonas (Kn y AIA), sin embargo, no debemos pasar por alto que dicha respuesta también se ve favorecida por el contenido endógeno de hormonas en los tejidos, así como por el efecto de - condiciones medio ambientales y la capacidad regenerativa de la especie.

5. CONCLUSIONES.

La técnica de desinfección de semillas consiste en exponerlas a una solución de hipoclorito de calcio al 7% más 3 gotas de tween 20 al 0.1% durante 30 minutos, ya que con esta se llega a acumular solo un porcentaje de contaminación del 5% después de 20 días.

La utilización de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente es una buena opción para la obtención de inóculos, ya que se garantiza la sanidad de éstos, contribuyendo por tanto al éxito en el establecimiento del cultivo.

Uno de los factores que determinó las diferentes respuestas del inóculo fué el balance entre auxinas y citocininas y entre estas y el contenido endógeno de hormonas, además de otros factores ya discutidos, como son la procedencia del inóculo y la época en que se obtuvo, aunque sería necesario evaluar tales factores para darles validez experimental.

En algunos de los casos aunque el medio de cultivo carecía de reguladores de crecimiento, existió la organogénesis, pero el proceso fué lento y los órganos obtenidos (raíz y brotes) se desarrollaron pobremente.

Además de éstos órganos se obtuvo la formación de masas amorfas que se llamaron crecimiento amorfo, el cual después de casi 5 meses en cultivo, - en el caso de la primera etapa y antes de 12 semanas en la segunda, mostró ser un tejido potencial para la obtención de brotes de excelente calidad.

La comparación de las diferentes combinaciones de auxinas, citocininas y ácido giberélico, permitió detectar que AIA en combinación con Kn y AIA en combinación con 2iP, fueron los tratamientos más prometedores para lograr la obtención del mayor número de brotes de calidad deseada. La evaluación de éstas combinaciones en una segunda etapa, aumentando el rango de concentraciones de AIA permitió corroborar la decisión tomada después de la primera etapa. Ya que en esta evaluación se logró mejorar la respuesta

ta en cuanto a la cantidad de brotes de buena calidad.

El mejor tratamiento durante la segunda etapa fué el que presentó Kn a $20 \mu\text{M}$ en combinación con 0.8 mg/l de AIA, con el que se logró obtener en promedio hasta 4 brotes de buena calidad por plántula original, en un período corto de tiempo (hasta de 4 semanas).

Considerando las conclusiones anteriores, podemos dar las alternativas a seguir con el fin de establecer, posteriormente, una metodología completa que permita la propagación masiva de Echinocactus grusonii.

De esta forma deberá tomarse en cuenta, sobre la obtención de inóculos que las semillas aunque funcionaron como una buena alternativa para su obtención, presentan una gran variabilidad por lo que es preferible tratar de determinar el tipo de inóculo a obtener a partir de brotes desarrollados in vitro ya que la obtención de inóculos de plantas in vivo es difícil, primero por la escases de material y segundo por la dificultad en el manejo de esta especie.

Deberá evaluarse la obtención de inóculos en diferentes épocas del año con el objeto de determinar su efecto en el patrón morfogénético de tejidos de Echinocactus grusonii.

Sobre el número de réplicas para cada tratamiento deberá tomarse en cuenta un número mayor que el presentado en el trabajo, ya que se mencionó, que la falta de repeticiones en la primera etapa fué uno de los motivos por los que no se pudo asegurar que la respuesta morfogénética presentada fuera el resultado de la influencia de los tratamientos.

Deberán buscarse las mejores condiciones bajo las que se logre la constante proliferación de "crecimiento amorfo", con el fin de contar con una nueva alternativa para la obtención de mejores brotes.

Es necesario también evaluar las citocininas Kn y ZiP a diferentes concentraciones al igual que se hizo con AIA, para optimizar el proceso de ob

tención de brotes de buena calidad.

Finalmente, para poder contar con la metodología completa de propagación in vitro de Echinocactus grusonii, deberá establecerse las mejores condiciones nutricionales para el enraizamiento in vitro de los brotes, así como evaluar diferentes sustratos para su mejor adaptación. Conjuntamente deberán evaluarse los efectos de la variación de condiciones ambientales - como iluminación, temperatura, humedad relativa, etc. sobre el desarrollo de brotes in vitro y su adaptación a condiciones ambientales.

APENDICE 1. NATURALEZA Y CONCENTRACIONES DE SALES MINERALES Y COMPLEMENTOS ORGANICOS (MURASHIGE - SKOOG 1962) EMPLEADOS COMO MEDIO DE CULTIVO.

A. SALES MINERALES

REQUERIMIENTOS
mg / l

Elementos mayores

- Nitrato de Amonio (NH_4NO_3)	1650
- Nitrato de Potasio (KNO_3)	1900
- Cloruro de Calcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370
- Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	170
- Sal disódica de EDTA (Na_2EDTA)	37.3
- Sulfato de Hierro Heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8

Elementos menores

- Sulfato Manganoso Tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3
- Sulfato de Zinc Heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6
- Acido Bórico (H_3BO_3)	6.2
- Ioduro de Potasio (KI)	0.83
- Molibdato de Sodio Dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25
- Sulfato Cúprico Pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
- Cloruro de Cobalto Hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025

B. CONSTITUYENTES ORGANICOS

- Glicina	2
- Inositol	100
- Tiamina-HCl	0.1
- Acido Nicotínico	0.5
- Piridoxina	0.5

Fuente de Carbono

- Sacarosa	30,000
------------	--------

Soporte

- Agar	8,000
--------	-------

APENDICE 2. NATURALEZA Y CONCENTRACIONES DE SALES MINERALES Y COMPLE -
 MENTOS ORGANICOS (R. A. DE FOSSARD 1976), EMPLEADAS COMO -
 MEDIO DE CULTIVO PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

A. SALES MINERALES

Elementos Mayores	REQUERIMIENTOS mg / l
- Nitrato de Calcio Tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	472.3
- Nitrato de Potasio (KNO_3)	101.1
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	123.25
- Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	122.4
- Sal Disódica de EDTA (Na_2EDTA)	18.0
- Sulfato de Hierro Heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	13.9

Elementos menores

- Sulfato Manganoso Tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2.535
- - Sulfato de Zinc Heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.305
- Acido Bórico (H_3BO_3)	0.497
- Sulfato Cúprico Pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
- Molibdato de Sodio Dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.024

B. CONSTITUYENTES ORGANICOS

Fuente de Carbono

- Sacarosa	2056.86
------------	---------

Soporte

- Algodón.	
------------	--

APENDICE 3. BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO Y CARACTERISTICAS DE LOS MISMOS DURANTE LA PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL.*

TRATAMIENTO	SEMANAS REQUERIDAS PARA ALCANZAR UN TAMAÑO MINIMO DE 1mm DE ALTURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMAÑO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR**	
1	1	3	2 X 2	ABUNDANTES	BmV
	1	5	1 X 1	POCAS	BPV
	1	3	2 X 2	POCAS	BmV
3	1	3	2 X 2	ABUNDANTES	BmV
	1	4	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	5	2 X 2	ABUNDANTES	BmV
5	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	8	1 X 1	POCAS	BPV
	1	8	1 X 1	POCAS	BPV
	1	9	1 X 1	POCAS	BPV
	1	8	1 X 2	ABUNDANTES	BPV
7	1	4	1 X 2	NULA	BNV
	1	4	1 X 2	NULA	BNV
8	1	6	1 X 1	POCAS	BPV
	1	7	1 X 1	NULA	BNV
	1	7	1 X 1	NULA	BNV
9	1	7	1 X 1	POCAS	BPV
	1	8	2 X 2	ABUNDANTES	BmV
	1	8	1 X 1	NULAS	BNV
	1	7	1 X 2	NULAS	BNV
	1	7	1 X 1	NULAS	BNV
10	1	6	1 X 2	NULA	BNV
	1	6	1 X 2	NULA	BNV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
11	1	3	2 X 3	NULA	BPV
	1	3	2 X 3	NULA	BPV
	1	7	2 X 2	POCAS	BmV
12	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BPV
	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BPV
	1	2	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	2 X 2	POCAS	BmV
	1	2	8 X 3	ABUNDANTES	BNV

*LOS TRATAMIENTOS NO INCLUIDOS EN LA TABLA, NO PRESENTARON DESARROLLO DE BROTES.

**DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 3.

...CONTINUA APENDICE 3.

TRATAMIENTO	NUMERO DE BROTES	SEMANAS REDUE- RIDAS PARA AL- CANZAR UN TA- MANO MINIMO - DE 1mm DE AL- TURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMANO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR**
13	1	4	3 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	7	5 X 4	ABUNDANTES	BPV
14	1	3	3 X 3	NULA	BNV
	1	4	4 X 3	NULA	BNV
	1	4	3 X 3	NULA	BNV
15	1	6	1 X 1	POCAS	BPV
	1	3	2 X 2	ABUNDANTES	BNV
16	1	5	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	5	1 X 1	POCAS	BPV
17	1	2	8 X 7	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	9	1 X 1	POCAS	BPV
18	1	8	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	8	1 X 1	NULA	BNV
21	1	9	1 X 1	NULA	BNV
	1	8	1 X 1	NULA	BNV
23	1	9	2 X 2	NULA	BNV
24	1	10	1 X 1	NULA	BNV
	1	10	3 X 2	NULA	BNV
26	1	7	1 X 1	NULA	BNV
	1	7	1 X 1	NULA	BNV

*LOS TRATAMIENTOS NO INCLUIDOS EN EL APENDICE, NO PRESENTARON DESARROLLO DE BROTES.

** DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 3.

APENDICE 4. BROTES PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO Y CARACTERISTICAS DE LOS MISMOS DURANTE LA SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.

TRATAMIENTO	NUMERO DE BROTES	SEMANAS REQUERIDAS PARA ALCANZAR UN TAMAÑO FINAL DE 1mm DE ALTURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMAÑO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR*
1	1	4	2 x 2	POCAS	BmV
	1	4	2 x 2	POCAS	BmV
	1	3	3 x 3	ABUNDANTES	BmV
2	1	6	3 x 2	POCAS	BmV
	1	5	3 x 3	ABUNDANTES	BmV
	1	4	4 x 3	ABUNDANTES	BmV
	1	11	2 x 2	NULA	BNV
3	1	11	1 x 1	ABUNDANTES	BPV
	1	11	2 x 2	ABUNDANTES	BPV
4	1	9	1 x 1	POCAS	BPV
	1	10	1 x 1	POCAS	BPV
	1	7	2 x 3	NULA	BNV
5	1	8	1 x 1	POCAS	BPV
	1	11	2 x 2	ABUNDANTES	BPV
	1	5	3 x 3	ABUNDANTES	BmV
	1	5	1 x 1	NULA	BmV
	1	5	2 x 2	NULA	BNV
6	1	9	1 x 1	POCAS	BPV
	1	9	1 x 2	ABUNDANTES	BmV
	1	5	2 x 2	POCAS	BmV
	1	5	3 x 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	2 x 2	ABUNDANTES	BmV
	1	4	4 x 3	ABUNDANTES	BmV
	1	5	2 x 2	ABUNDANTES	BmV
7	1	3	1 x 1	POCAS	BPV
	1	6	3 x 3	NULA	BNV
	1	4	3 x 3	NULA	BNV
	1	3	1 x 1	NULA	BNV
8	1	8	1 x 1	POCAS	BPV
	1	8	1 x 1	POCAS	BPV
	1	4	2 x 2	POCAS	BmV
	1	8	1 x 1	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 x 6	NULA	BNV
	1	3	2 x 2	NULA	BNV

*DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 7.

...CONTINUA APENDICE 4.

TRATAMIENTO	NUMERO DE BROTES	SEMANAS REQUE- RIDAS PARA AL- CANZAR UN TA- MAÑO MÍNIMO - DE 1mm DE AL- TURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMAÑO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR*
9	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 3	ABUNDANTES	BV
	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BmV
	1	3	2 X 2	POCAS	BPV
	1	3	8 X 7	ABUNDANTES	BV
	1	3	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	1 X 1	ABUNDANTES	BPV
	1	8	3 X 4	NULA	BNV
	1	9	1 X 1	NULA	BNV
	1	9	1 X 1	NULA	BNV
	1	3	5 X 5	NULA	BNV
	1	6	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
1	2	5 X 6	ABUNDANTES	BV	
10	1	4	5 X 4	ABUNDANTES	BV
	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	3 X 3	POCAS	BmV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	3 X 2	POCAS	BPV
	1	3	3 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BmV
	1	4	4 X 2	NULA	BNV
	1	4	4 X 3	NULA	BNV
	1	2	4 X 3	NULA	BNV
	1	4	1 X 1	NULA	BNV
11	1	5	1 X 1	NULA	BNV
	1	3	2 X 2	POCAS	BPV
	1	3	1 X 1	POCAS	BPV
	1	4	5 X 4	ABUNDANTES	BV
	1	3	3 X 4	ABUNDANTES	BV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	4	7 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	4	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	12	1 X 1	POCAS	BPV
	1	6	6 X 5	ABUNDANTES	BmV
	1	7	6 X 5	ABUNDANTES	BmV
1	3	7 X 5	POCAS	BPV	
1	3	6 X 5	ABUNDANTES	BV	

*DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 3.

...CONTINUA APENDICE 4.

TRATAMIENTO	SEMANAS REQUE- RIDAS PARA AL- CANZAR UN TA- MAÑO MINIMO - DE 1mm DE AL- TURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMANO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR*	
	1	3	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	4	7 X 10	NULA	BNV
	1	4	7 X 5	NULA	BNV
12	1	7	3 X 6	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	2 X 2	ABUNDANTES	BPV
	1	3	2 X 2	ABUNDANTES	BPV
	1	3	4 X 4	POCAS	BmV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	2 X 2	POCAS	BPV
	1	4	1 X 1	NULA	BNV
13	1	5	5 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	11	4 X 3	POCAS	BPV
	1	10	5 X 5	ABUNDANTES	BmV
	1	6	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
14	1	4	1 X 1	POCAS	BNV
	1	4	5 X 4	POCAS	BNV
	1	4	1 X 1	ABUNDANTES	BNV
	1	3	2 X 3	ABUNDANTES	BNV
	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BNV
	1	4	4 X 3	ABUNDANTES	BPV
	1	3	2 X 2	POCAS	BPV
	1	4	1 X 1	POCAS	BPV
	1	3	8 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	4 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 3	ABUNDANTES	BV
	1	3	3 X 3	ABUNDANTES	BV
	1	3	3 X 3	ABUNDANTES	BPV
	1	4	3 X 3	NULA	BmV
	1	4	1 X 1	NULA	BmV
	1	4	1 X 1	NULA	BV
	1	3	2 X 2	NULA	BV

*DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 3.

...CONTINUA APENDICE 4.

TREATAMIENTO	NUMERO DE BROTOS	SEMANAS RECUE- RIDAS PARA AL- CANZAR UN TA- MANO MINIMO - DE 1mm DE AL- TURA POR 1mm DE DIAMETRO.	TAMANO FINAL (12 SEMANAS)	DENSIDAD DE ESPINAS	TIPO DE VIGOR*
	1	3	1 X 1	NULLA	BNV
15	1	3	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	3	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	5 X 6	ABUNDANTES	BV
	1	3	3 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	3	3 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	3 X 4	ABUNDANTES	BmV
	1	4	2 X 2	POCAS	BPV
	1	4	1 X 1	ABUNDANTES	BPV
	1	4	1 X 1	POCAS	BPV
	1	4	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	4	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	6 X 3	NULLA	BNV
	1	4	6 X 7	NULLA	BNV
	1	4	6 X 6	NULLA	BNV
	1	4	6 X 7	NULLA	BNV
16	1	11	2 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	3 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	3	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	6	1 X 1	POCAS	BPV
	1	7	3 X 3	ABUNDANTES	BPV
	1	6	4 X 3	ABUNDANTES	BmV
	1	6	2 X 2	ABUNDANTES	BmV
	1	3	4 X 3	NULLA	BNV
17	1	4	2 X 1	POCAS	BPV
	1	11	1 X 1	POCAS	BPV
	1	6	1 X 1	POCAS	BPV
18	1	5	4 X 3	ABUNDANTES	BV
	1	5	3 X 3	POCAS	BmV
	1	7	4 X 3	POCAS	BV
	1	4	6 X 5	ABUNDANTES	BV
	1	3	6 X 6	ABUNDANTES	BPV
	1	3	6 X 7	ABUNDANTES	BmV
	1	3	5 X 4	ABUNDANTES	BmV

*DETERMINADO EN BASE AL CUADRO 3.

APENDICE 5. COMPOSICION DE SOLUCIONES MADRE PARA LA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO. *

SALES MINERALES

a) Nitratos		b) Hierro quelado	
NH_4NO_3	165 gr/l	Na_2EDTA	373 gr/l
KNO_3	190 gr/l	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278 gr/l
c) Halógenos		d) Fosfatos	
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	44 gr/l	KH_2PO_4	17 gr/l
KI	0.083 gr/l	H_3BO_3	0.62 gr/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025 gr/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025 gr/l
e) Sulfatos			
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	37 gr/l		
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.23 gr/l		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86 gr/l		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025 gr/l		

CONSTITUYENTES ORGANICOS

Glicina	0.2 gr/l
Tiamina-HCl	0.01 mg/l
Acido Nicotínico	0.05 gr/l
Piridoxina	0.05 gr/l

* Las sustancias no incluidas en el apéndice fueron agregadas directamente.

APENDICE 6. COMPOSICION DE SOLUCIONES MADRE DE LOS REGULADORES DE CRE-
CIMIENTO EMPLEADOS, A UNA CONCENTRACION DE 1 mM.

AUXINAS

Acido Indol Butírico (IBA)	203.00 mg/l
Acido Indol Acético (AIA)	175.00 mg/l
Acido Naftalen Acético (ANA)	186.20 mg/l

CITOCININAS

Bencil Amino Purina (BAP)	225.26 mg/l
Cinetina (Kn)	215.21 mg/l
Isopentenil Adenina (2iP)	203.00 mg/l
Zeatina (Zea)	219.00 mg/l

GIBERELINAS

Acido Giberélico (GA ₃)	346.00 mg/l
-------------------------------------	-------------

B I B L I O G R A F I A C I T A D A .

1. ABBOT, a.j. 1978. Practice and promise of micropropagation of woody --- species. *Acta Horticulturae* 79:113-127.
2. ANAYA, S.A. 1986. Optimización en la proliferación de callo e inducción de brotes "in vitro" de Astrophytum myriostigma var potosina (Cactaceae) Tesis. UNAM . Fac. de Ciencias, México.
3. Anónimo. 1978. *Cactus and Succulents*. Lane Publ. Co., California.
4. Anónimo. 1985. Propagación de plantas por cultivo de tejidos. *El Campo. Revista Agrícola y Ganadera*. Año LX (118):21-26.
5. BENSON, L. 1969. The native cacti of California. *Stanford University*. - Press. Stanford, California. pp 3-15.
6. BOKE, H. N. 1944. Histogenesis of leaf and areole in Opuntia cylindrica Amer. J. Bot. 31(6):299-316.
7. ----- 1951. Histogenesis of vegetative shoot in Echinocereus. *Amer. J. Bot.* 38(1):23-38.
8. ----- 1957. Comparative histogenesis of areole of Homocephala and - Echinocactus . *Amer. J. Bot.* 44(6):362-380.
9. ----- 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. *Bio - Science* 30(9):605-610.
10. BRACAMONTES, R. M. 1981. Consideraciones sobre la clasificación de las cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 25(1);20-23.
11. BRAVO, H.H. 1937. *Las cactáceas de México*. UNAM. México. -
12. BRAVO, H.H. 1978. *Las cactáceas de México*. UNAM. México. Vol. I.
13. BRITTON y Rose. 1920. *The cactaceae*. Vol. IV. Dover Publications, Inc. Nueva York. pp 167-168.
14. CAREY, R.H. 1980. Safeguarding the cacti. *Garden*. 1(5):4-7.
16. CLIVES , I. 1977. *The complete handbook of cacti and succulent*. Ward - Lock Limited, Londres.

17. SARH- Comisión Nacional de Fruticultura. 1984. Curso de Propagación de plantas por cultivo de tejidos. México.
18. CORONA, N.E. V. y V.M. Chávez, A. 1982. Cultivo de cactáceas en medios asépticos. *Cact. Suc. Mex.* 27(2):17-23.
19. ----- y L.L. Yañes. 1984. Propagación de Cephalocereus senilis mediante cultivo de tejidos. *Cact. Suc. Mex.* 29(1):3-7.
20. DE FOSSARD, R. 1976. Tissue culture for plant propagators. Univ. New - England Printery. Australia. 409p.
21. DIAZ, G.P. 1985. Propagación de Astrophytum myrystigma. En: Resúmenes del simposium "La investigación el desarrollo experimental y la docencia en CONAFRUT - SARH durante 1984". Subdirección de Investigación y Docencia. Comisión Nacional de Fruticultura. Secretaría de Recursos -- Hidráulicos.
22. DODDS, J. y L.W. Roberts. 1982. Experiments in plant tissue culture.- Cambridge University Press. USA. 178 p.
23. FEARN, B. 1981. Seed germination: the modern aproach. *Cact. Suc. J. -- (G.B.)* 43(1):13-16
24. FRIEREDICH, H. 1985. Las primeras relaciones de las cactáceas en la -- vieja Europa. *Cact. Suc. Mex.* 20(2):53-67.
25. Gobierno del Estado de México. Secretaría de Desarrollo Agrícola. Di - rección de Recursos Naturales. 1982. Algunos usos prehispánicos de las cactáceas entre los indígenas de México.
26. GROENEWALD, E.G. , D.C.J. Wessels y A. Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of tha Agave specie (Agavaceae). *Z. pflanzenphysiol Bd.* 81 s. 369-373.
27. GUEVARA, G. A.A. 1986. Etapas iniciales en la propagación clonal in vi tro de Carica papaya L. Universidad Veracruzana. Xalapa Enriquez, Ver 69 p.
28. HAAGE, W. 1963. Cacti and Succulents. Vista Books, Londres pp 34-43.

29. HARTMAN, H. y D.E. Kester. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. CECSA. México 810 p.
30. HAVEL, L. y Z. Kolar. 1983. Microexplant isolation from cactaceae. - Plant Cell Tissue Organ Culture. 2:349-353.
31. HOLDGATE, D.P. 1977. Propagation of ornamentals by tissue culture. En: - Plan Cell, Tissue and organ culture. Reinert, J. y Y.P.S. Bajaj. Springer - Verlag. Berlin Heidelberg, Nueva York. pp 18-43.
- INGRAM, D.S. y J.P. Helgeson. 1980. Tissue culture methods for plant - pathologists. Ed. Federation of British Plant Pathologists. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña. 262p.
32. JOHNSON, J.L. y E.R. Emino. 1977a. Tissue culture propagation of - - Opuntia polyacantha as influenced by plant growth regulators. HortSci. 12(3):239.
33. ----- 1977b. Tissue culture propagation of Mammillaria elongatha as influenced by plant growth regulators. HortSci. 12(4):394.
34. ----- 1979a. Tissue culture propagation in the cactaceae. Cact. Suc. J. (US) 51:275-277.
35. ----- 1979b. Propagation "in vitro" of Mammillaria elongatha. Hort - Sci. 14(5):605-606.
36. ----- 1981. Axillary meristem developement in Mammillaria elongatha - D.C. (Cactaceae). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 (1):110-113.
- KENNETH, V.T. 1972. The natural plant hormones. En: PLant physiology - Ed. Steward F.C. Vol. VIB. Academic Press., Londres. pp 26-48.
37. KING, B.M. 1977. Studies in the culture of cacti. Cact. Suc. J (US) -- 29:102-104.
38. KOLAR, Z., Bartek, J. y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus Mammillaria woodsii . Craig through tissue culture. Experientia 32:668.
39. LARZATE, J.E. , M.S. Gaiser y O.R. Brown. 1982. In vitro propagation - of Epiphyllum crysocardium . Hort Sci. 17(1):84.

- LEOPOLD, A.C. y P. E. Kriedermann. 1975. Plant growth and development. ed. Mc. Grae-Hill, Nueva York. pp 199-206.
40. LINDS, B. 1978. Cactus and Succulent. Menlo Park, California 80 p.
41. LOPEZ, P.C. 1985. Medios de cultivo. En: Fundamentos teórico - prácticos de cultivo de tejidos vegetales. (Villalobos, A. V.M. ed.) Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Mex. pp 25-53.
42. MAUSETH, J.D. y W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis - in Opuntia polyacantha (Cactaceae) Amer. J. Bot. 62(8):869-877
43. ----- 1976. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the - structure and metabolism of shoot apical meristems in Opuntia - - - - polyacantha. Amer. J. Bot. 63(10):1295-1310.
44. ----- 1977. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the - determination and morphogenesis of leaf primordia in Opuntia polyacantha (Cactaceae) Amer. J. Bot. 64(3):337-346.
45. ----- 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. Cact. Suc. J. (US) 51:186-187.
46. MINOCHA, S.C. y P.N. Mehra. 1974. Nutricional and morphogenetic investigations on callus culture of Neomammillaria prolifera Mill. (cactaceae). Amer. J. Bot. 61(2):168-172.
47. MURASHIGE, T. y F. Skkog 1962. A revised medium for rapid growth and - bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
48. ----- 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann Rev. Plant Physiology. 25:135-166.
49. OCHOA, N.A. 1985. Establecimiento de cultivos in vitro. En: Fundamentos teórico - prácticos de cultivo de tejidos vegetales. (Villalobos, A.V.M. ed.) Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp64-71.
50. SACHAR, R.C. y R.D. Iyer. 1959. Effect of auxin, Kinetin and gibberellin on the placental tissue of Opuntia dillenii Haw. cultures in vitro. Phytomorph. 9:1-13.

51. SANCHEZ, M.H. 1982. Mexico's problems and programmes monitoring trade in common and endangered cacti. *Cact. Succ. J. (G.B.)* 44(2):36-38.
52. ----- 1984. El estado actual de las cactáceas en México, una sugerencia para su conservación. 5a. Reunión anual académica. Notas inéditas.
54. SCHULDENFREI, P. 1983. Cactus industry report. Slow Starters Moving -- faster. *Florost's Review*. Jun 30 21-23.
55. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1984. Boletín mensual 1981-1984. Depto. de comunicación de la D. G. E. A. México.
56. SILBERSTEIN, S.P., F.H. Huang y G. L. Klingaman. 1983. In vitro propagation of succulent Euphorbia flanaganii. *N. N. Br. Cac. Suc. J. (US)*-55:80-83.
57. STARLING, R. 1985. In vitro propagation of Leuchtenbergia principis. - *Cac. Suc. J. (US)* 57:114-115.
58. STEINHART, C.E. 1962. Tissue culture of a cactus. *Science*. 173:545-546.
59. STREET, H.E. 1977. Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publications. Inglaterra 641p.
60. THOMAS, E. y M.R. Davey. 1975. The history and development of plant - tissue culture. En: From single cells to plant. Wykettan Publ. LTD, Londres. pp 1-16.
61. THORPE, T.A. 1978. Regulation of organogenesis in vitro. En: Propagation of higher plant through tissue culture: a bridge between research and application. (Univ Tennessee ed.) pp 87-101.
- ----- y S. Biondi. 1981. Regulation of plant organogenesis. En: Advances in cell culture. ed. Karl Maramorosch. Vol I. Academic Press, Nueva York. pp 213-239.
62. TISCORNIA, J. 1976. Cactus y otras plantas de ornato. Ed. Albatros. - Buenos Aires. :
63. VILLALOBOS, A.V.M. 1985. Historia del cultivo de tejidos. En: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (Villalobos A. V.M. ed.) Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp1-89.

64. VOVIDES, A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en - peligro de extinción. *Biótica* 6(2):219-228.
65. ZAPIREN, M. 1981. Presentación de audiovisual de cactáceas. En: Segunda reunión nacional sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desarrollo. *Subdirección forestal* 20:53-67. ✓
66. ZAPIREN, M. 1981. Protección forestal de las especies ornamentales ame nazadas. En: Segunda reunión sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desarrollo. *Subdirección forestal*. INIF:109.