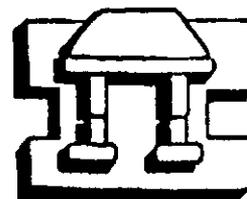


38



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA



IZTACALA

“Micropropagación de *Mammillaria conspicua*  
a través de areolas activadas  
*in vivo* por etiolación”.

291677

TESIS DE LICENCIATURA  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N:  
VLADIMIR FUENTES MAYO  
Y  
NALLELY M. MARTÍNEZ MONDRAGÓN

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. J. GERARDO ORTÍZ MONTIEL

LOS REYES IZTACALA,

MARZO DE 2001



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.

A mis padres, José y Aurora  
por su amor, dedicación  
y apoyo.

A mi hermano Erick  
ejemplo de fortaleza y esperanza.

A mi compañero Vladimir  
eje principal de mi vida,  
por su incansable paciencia,  
comprensión y amor.  
N. M. M.

A mis excepcionales padres,  
Carlos y Chela fuente inagotable  
de sabiduria, amor y solidaridad.

A mis hermanos Ivan y Kevin  
ejemplos de motivación  
y optimismo permanente.

A mi compañera Nallely por su amor  
y paciencia demostrados en el camino  
recorrido.

A las familias Suarez y Mayo  
por su apoyo siempre manifiesto.  
V. F. M.

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro profesor y amigo M. en C. J. Gerardo Ortíz Montiel por su valiosa orientación en la dirección de esta Tesis y su apoyo desinteresado mostrado en todo momento.

A nuestros revisores de Tesis, Biol. Antonia Trujillo H., Biol. Manuel Mandujano P., M. en C. Ernesto Aguirre L., y M. en C. Ismael Aguilar A. por su disponibilidad y sus acertadas sugerencias.

A la Biol. Rosa Maria Picaso de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Posgraduados, por su amabilidad y paciencia en la obtención del material fotográfico.

A el M. en C. José M. Mejía y al M. en C. Alejandro Manzo G. de la Universidad Autónoma de Chapingo, por su atención, dedicación y confianza.

A nuestros amigos, Karla, Lilia, Joel, Toño y Mario por compartir momentos inolvidables.

Y por último a todas las personas que han colaborado valiosamente en nuestra formación personal y profesional.

# ÍNDICE

Resumen .....	1
I.- Introducción .....	2
II.- Antecedentes.....	3
2.1.- Origen de la familia Cactaceae .....	3
2.2.- Distribución y hábitat .....	3
2.3.- Características .....	3
2.3.1.- Características generales.....	3
2.3.2.- Características morfológicas.....	4
2.3.3.- Hábitos y formas de vida .....	5
2.3.4.- Metabolismo .....	5
2.4.- Importancia .....	5
2.5.- Programas de conservación .....	7
2.5.1.- Métodos de propagación .....	7
2.5.1.1.- Cultivo de tejidos .....	7
2.5.1.2.- Elementos de cultivo.....	8
2.5.1.3.- Factores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo .....	8
2.5.1.4.- Tipos de cultivo.....	9
2.5.1.5.- Método de cultivo .....	9
2.5.1.6.- Respuestas morfogénicas .....	10
2.5.1.7.- Aclimatización y transplante.....	10
2.6.- Trabajos realizados .....	10
III.- Objetivos .....	13
3.1.- Objetivo general .....	13
3.1.1.- Objetivos particulares.....	13
IV.- Material y métodos .....	15
4.1.- Descripción de la especie.....	15
4.2.- Material vegetal .....	15
4.3.- Métodos .....	15
4.3.1.- Cultivo de tejidos .....	15
4.3.2.- Aclimatización y transplante .....	16
4.3.3.- Estudio estereológico .....	16
4.3.4.- Determinación de la actividad metabólica .....	17
4.4.- Diagrama de flujo .....	17
V.- Resultados .....	18
VI.- Discusión .....	24
VII.- Conclusiones.....	27
VIII.- Recomendaciones.....	27
Anexo .....	28
Literatura citada .....	32

## RESUMEN

Las cactáceas son plantas que en mucho caracterizan los paisajes mexicanos. Se localizan principalmente en las zonas áridas, aunque a algunas de ellas se les encuentra en las zonas tropicales, subtropicales y templadas. Presentan las características básicas de las demás dicotiledoneas; sin embargo, la extraordinaria diversidad de especies, la gran variedad de formas de vida, así como las diversas estrategias que evolutivamente han desarrollado para hacer frente a la escasez de agua, han hecho de ellas un grupo muy atractivo y por lo tanto vulnerable a la extinción.

Existen varios métodos para su propagación, entre ellos se encuentra el cultivo de tejidos o micropropagación que se considera uno de los más importantes, ya que representa una herramienta más que puede ser utilizada en la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Motivo por el cual, el presente trabajo se propuso desarrollar el cultivo *in vitro* de *Mammillaria conspicua* a partir de plantas etioladas, en un medio adicionado con reguladores de crecimiento.

Para ello se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino) purina (0.0, 1.0, 5.0, 10.0, y 20 mg/l) en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). A continuación se llevo acabo la aclimatización y transplante a suelo de las plántulas obtenidas hasta definir el porcentaje de supervivencia en un periodo de 2 meses. Posteriormente se realizó un Estudio Estereológico mediante Microscopía Electrónica de Barrido para establecer las diferencias morfológicas entre las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre. Y Por ultimo se realizó la determinación y comparación de la actividad metabólica con relación a su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> en los tres tipos de plantas.

Los tratamientos que presentaron una mejor respuesta (regeneración de plántulas) fueron los de 10 y 20 mg/l. El resto, incluyendo el grupo testigo sólo presentaron generación de callo. En cuanto a la aclimatización, todas las plántulas sobrevivieron alcanzando en promedio una talla de 3 cm. de alto x 2 cm. de ancho. Con el estudio estereológico se observó que las plantas originadas en laboratorio presentan una cutícula muy delgada, células muy hidratadas, y estomas más pequeños, que se encuentran abiertos en presencia de luz. Diferencias muy marcadas y contrarias a las que se han originado *in vivo* o de manera silvestre, e incluso de las que se han aclimatizado. Finalmente con la determinación de la actividad metabólica se estableció que tanto las plántulas obtenidas *in vitro*, como las aclimatizadas y la planta silvestre llevan acabo en condiciones de laboratorio un metabolismo de tipo C3.

## I.- INTRODUCCIÓN

México es uno de los siete países con mayor diversidad biológica en el mundo, privilegio que comparte con naciones de Latinoamérica, África y Asia (Toledo, 1988). Sin embargo, también comparten la desaparición de especies silvestres, resultado de su creciente actividad económica; así como por la intensa modificación y destrucción de su hábitat, en especial por la agricultura y ganadería (Rubluo et. al, 1993; Scheinvar, 1995).

En el caso particular de las cactáceas, México presenta cerca de 1500 de las 2000 especies conocidas hasta el momento de esta familia, donde un elevado número de ellas son endémicas (Scheivar, op. cit.). Las cuales por lo extraño de sus formas y lo colorido de sus flores son objeto de comercio internacional a través del tráfico ilegal, que las coloca como uno de los grupos más amenazados de la flora mexicana (Ceballos, 1993; Glass, 1998).

Un ejemplo de ello es *Mammillaria conspicua*, especie endémica del Estado de Puebla en especial de las zonas de Tehuacán y Zapotitlan de las Salinas (Bravo-Hollis, 1991), que aun cuando en la actualidad no se encuentra registrada ante la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994) presenta la posibilidad de estarlo en poco tiempo, debido a su colecta indiscriminada por su importancia ornamental y al consumo constante por ganadería menor (Álvarez, 1997).

Ante esta situación, es importante contar con alternativas que permitan la propagación y recuperación de especies silvestres que corren el riesgo de estar amenazadas o en peligro de extinción.

Una metodología que ha demostrado su utilidad es el cultivo de tejidos vegetales, ya que además de aventajar notablemente a otros métodos tradicionales, ayuda a impedir o disminuir las colectas de campo y sirve como fuente de recurso económico al establecer sistemas de comercialización basados en métodos de propagación controlados (Sánchez, 1993).

Dichas técnicas han sido ampliamente aplicadas con plantas ornamentales desde la década de los setenta, en cuanto a cactáceas, se han establecido medios de cultivo aptos para su propagación; se ha determinado la influencia de los reguladores de crecimiento; se han realizado experimentos sobre la estimulación de meristemas; y se han estudiado las condiciones óptimas para la activación areolar. Sin embargo pocos trabajos han reportado el cultivo de tejidos en cactáceas a partir de plantas obtenidas de campo y sometidas a etiolación.

La etiolación es un fenómeno que se induce en la planta al colocarla en total o parcial obscuridad. Durante esta, la planta disminuye su actividad fotosintética e incrementa su actividad invertasa, manteniendo altos niveles de actividad auxínica; observándose un alargamiento de la planta y proliferación de nuevos brotes (Flores y Ortíz, 2000). Por lo cual el presente trabajo se propuso desarrollar el cultivo *in vitro* de *Mammillaria conspicua* a partir de areolas activadas *in vivo* por etiolación.

## **II.- ANTECEDENTES**

### **2.1.- Origen de la Familia Cactaceae**

Hasta ahora, sólo se han encontrado en el continente Americano escasas evidencias fósiles que comprueban el origen y antigüedad de las cactáceas, por lo que se cree que son la familia vegetal más joven de todo el continente.

Sin embargo, estudios recientes consideran su origen en el llamado trópico seco centroamericano y antillano, ya que allá se encuentra el grupo de cactus antiguo, representado por la subfamilia *Pereskioideae*, quien todavía posee hojas laminadas, bien desarrolladas y crasas (León y Valinte-Baunet, 1994).

### **2.2.- Distribución y hábitat**

La familia cactaceae es considerada una de las más variadas de la Tierra, pues se encuentra representada en prácticamente casi todos los ecosistemas. Y aunque algunas de ellas como el género *Opuntia* llegan a habitar naturalmente latitudes tan frías como Canadá, y otras como el género *Rhipsalis* se encuentran en regiones tropicales, la mayoría se distribuye en zonas de clima árido y semiárido conocidas como desiertos (León y Valinte-Baunet, op. cit.).

Los desiertos son áreas donde el aire descendente se concentra y se calienta, en consecuencia reciben poca lluvia, en promedio llegan a tener menos de 25 cm. de lluvia al año. Y debido a que el aire contiene muy poca humedad, el clima es extremoso, en particular durante el día donde la insolación, la evaporación y la transpiración son muy intensas (Curtis-Barnes, 1999; Rzedowski, 1981).

En nuestro país, las regiones áridas y semiáridas se encuentran en el norte y parte del centro, destacando el desierto Chihuahuense, el desierto Sonorense, el Valle de Tehuacán, Puebla y la zona árida Querétaro-Hidalgüense (Hernández y Godínez, 1994).

### **2.3.- Características**

#### **2.3.1.- Características generales**

Son plantas suculentas o carnosas, cuyas formas son muy peculiares y variables como resultado de la adaptación a medios secos en que la mayoría crece, la adaptación posterior de otras a la vida epífita de las selvas tropicales, y posiblemente también a los diversos tipos de polinización que experimentan, principalmente por medio de insectos, aves y mamíferos (Bravo-Hollis, 1978). En general son plantas perennes, fanerógamas, y dicotiledoneas. Cuyo ciclo de vida va de los 2 a los 100 años o más, según la especie. Y su madurez sexual se lleva a cabo a los dos o tres años, aunque a algunas especies les puede tomar varios lustros (CONABIO, 1997).

### 2.3.2.- Características morfológicas

Cuentan con tres tipos de raíces. Una principal, las secundarias y las temporales. La raíz principal constituye el sistema de fijación, pues se introduce verticalmente en el suelo y su desarrollo es proporcional al tamaño y la fuerza de tracción del vegetal; las secundarias intervienen particularmente en la adsorción de agua y las sustancias nutritivas disueltas en ella; y las temporales que solo aparecen durante la "época de lluvia", estas llegan a alcanzar hasta varios Km. de distancia, ya que la longitud a la que llegan está en relación con el factor humedad, utilizándolas para buscar y aprovechar la poca agua que haya quedado bajo las piedras.

El tallo conforma básicamente el cuerpo de la planta. Es de color verde por que en el se concentra la actividad fotosintética (metabolismo tipo MAC). Su apariencia carnosa, es resultado del gran desarrollo del parénquima, lo que les permite conservar agua y nutrientes para sobrevivir durante prolongados periodos de sequía. Además de que, por estar cubierto por una cutícula gruesa donde los estomas se reducen, se hunden y se protegen se ve mas engrosado. Varían en forma, tamaño y ramificación, pero en ellos siempre se aprecian tubérculos o costillas.

Los tubérculos (característicos de las cactáceas globosas, como el genero *Mammillaria*) se consideran la base hipertrofiada de las hojas, que se forman a partir de la yema cotiledonar apical. Se ordenan en series espiraladas, así en las plantas ya desarrolladas, los tubérculos más viejos se encuentran en la base del tallo, en tanto que los recién formados están en el ápice. En las cactáceas columnares, los tubérculos se unen verticalmente para formar las costillas.

De dichos tubérculos o costillas nacen las areolas, estructuras de aspecto algodonoso consideradas como yemas homólogas a las yemas axilares de las otras dicotiledóneas. Las cuales debido a su meristemo dan origen a las espinas, cerdas, pelos, nuevos tallos y flores.

Las hojas bien diferenciadas existen solamente en los géneros primitivos: *Pereskia*, *Pereskopsis* y *Quiabentia*, en el resto se encuentran espinas, adaptación que permite a la planta reducir la superficie de transpiración.

Por ello se dice que las espinas son hojas modificadas. Estas se forman a expensas de los tejidos meristemáticos de las areolas de la misma manera que las hojas, su crecimiento se debe a un meristemo que existe en su base, y el endurecimiento a un proceso de lignificación de los tegumentos. Sus funciones consisten en proteger contra la depredación por animales herbívoros, producir sombra y protección al tallo reflejando los rayos solares o formando una verdadera coraza, condensar la humedad ambiental y dirigirla hacia las raíces donde es absorbida, y facilitar la propagación vegetativa cuando se adhieren a la piel de algún animal que dispersa los tallos (Bravo-Hollis, 1978; CONABIO, 1997).

La flor es hermafrodita. Su forma comúnmente campanulada. Sus colores variados y combinados. Las hay diurnas y nocturnas. Y su producción se restringe a una por areola. Las inflorescencias sólo tienen lugar en las especies primitivas.

El fruto puede ser carnoso, jugoso o seco, envuelto en una cubierta más o menos delgada. Consta de una cámara en cuyo interior se encuentran las semillas unidas por una estructura llamada funículo, la cual determina su carnosidad o succulencia. Su forma es variable desde globosos a alargados. Externamente son lanosos, espinosos, o escamosos. Y su coloración es blanca, verde, amarilla, púrpura, azul o casi negra (Bravo-Hollis, 1978; CONABIO, 1997).

### **2.3.3.- Hábitos y formas de vida**

Las cactáceas poseen formas de vida muy diversas, se consideran trepadoras (sus tallos al crecer buscan un soporte al cual adherirse a través de sus raíces adventicias), epífitas (viven sobre los árboles sin llegar a ser parásitas), rupícolas (viven sobre rocas calizas, basálticas o de granito), o gipsófilas (prefieren suelos ricos en yeso). Por su hábito de crecimiento, las hay arbóreas como *Carnegiea gigantea* (saguaro), arbustivas como *Opuntia cantabrigiensis* (nopal), y terrestres como *Mammillaria conspicua* (biznaga).

En general crecen solitarias, aunque algunas tienden a ramificarse en exceso, principalmente desde la base llegando a formar colonias (CONABIO, 1997).

### **2.3.4.- Metabolismo**

Poseen un metabolismo de tipo MAC o Metabolismo Ácido de las Crasuláceas. El cual se encuentra relacionado con plantas que suelen encontrarse donde el agua es escasa o de difícil acceso, incluyendo regiones desérticas y semidesérticas, marismas y sitios epífitos. En estos hábitats, las plantas MAC (como todos los vegetales), deben mantener el agua y obtener CO<sub>2</sub>, pero si abren sus estomas por completo durante el día para hacerlo, transpiran demasiada agua lo que trae como consecuencia la muerte. Por lo tanto, estas plantas abren sus estomas y fijan CO<sub>2</sub> en ácido málico durante la noche, cuando la temperatura es más baja y la humedad relativa es mayor (Salisbury, 1994).

### **2.4.- Importancia**

Las cactáceas representan para las zonas áridas un grupo ecológico muy importante, ya que proporcionan a la fauna factores como protección (hábitat) y alimento (frutos, semillas, néctar y polen). Además son un freno en la degradación de los suelos deforestados por la agricultura y el pastoreo, entre otros.

Para el ser humano, han sido y son parte primordial de sus actividades culturales (prácticas mágico-religiosas); pero principalmente una fuente económica, de alimento, medicinas y materias primas (CONABIO, 1997; Sánchez-Mejorada, 1982).

Un gran número de ellas son comestibles y las partes aprovechables suelen ser variables según las especies. Los tallos pueden ser utilizados como aporte de agua, ya que poseen sales minerales que evitan la deshidratación. Con otros se realizan mermeladas y dulces cristalizados, como son las pencas jóvenes de nopal y el acitrón. Y algunos más se comen a manera de verduras como los géneros *Opuntia* y *Nopalea* comúnmente conocidos como "nopalitos", los cuales se preparan de muy distintas maneras: al vapor, en escabeche, asados, crudos, etc. Las flores, son ingeridas principalmente por algunas etnias indígenas como complemento alimentario, por ejemplo los Seris comen las flores de *Opuntia versicolor* y los Otomíes utilizan los ovarios de *Nopalea auberi*. De la misma forma algunas comunidades rurales las consumen capeadas con huevo o mezcladas con diferentes guisos, como es el caso de las flores de *Mirtillocoactus geometrízans* en los estados de Puebla y Oaxaca. Entre los frutos, las tunas, xoconostles, garambullos, pitayas, pitahayas, jiotillas, alicoches, chichipies, pochas, chilitos, etc. son los más utilizados, pues se conocen desde la época prehispánica. Su valor alimentario se debe a su alto contenido de azúcares, proteínas, grasas y vitaminas. Y pueden ser ingeridos crudos, cocidos, secados al sol, en conserva, en aguas, jarabe, ates o mermeladas.

Por otra parte, este grupo vegetal ha sido utilizado ampliamente en la medicina tradicional indígena, representada por chamanes y curanderos; así como en las prácticas mágico-religiosas que hasta la fecha se siguen realizando, sobre todo en los grupos tribales asentados en la Sierra Madre Noroccidental, tales como los Taraumaras, Tepehuanos, Coras y Huicholes.

Actualmente gracias a su gran eficacia y a la persistencia de su uso como plantas "curativas", numerosos investigadores se han dado a la tarea de encontrar y aislar los agentes activos que poseen propiedades medicinales como: analgésicos, diuréticos, cardiotónicos, laxantes, astringentes, desparasitantes, desinflamantes, etc; y de esta manera incorporarlos a la medicina alopática, homeopática o naturista.

Hasta el momento sólo se han descrito algunos de los beneficios que la sociedad obtiene de esta familia, sin embargo, existen otros de igual importancia; por ejemplo: los haces vasculares de las cactáceas columnares (una vez desecadas) se emplean como madera de construcción y combustible; las espinas de muchas especies son usadas como agujas, palillos y como herramientas para grabar cerámica y cuero. Los pelos sedosos de algunas biznagas y columnares se ocupan para la confección de textiles. Del nopal se ha procesado caucho sintético (en España) y anticorrosivos (en E. U.); así mismo, su celulosa es empleada en la producción de pergaminos y la extracción de taninos (usados para el curado de pieles). Como setos vivos o para delimitar propiedades en forma de cercas son altamente prácticos y efectivos. Como forraje, abono verde, fijadores de insecticidas y pegamento también son utilizados. Del mismo modo, se han extraído diferentes pigmentos estables de una gran variedad de frutos, los cuales son altamente recomendables para teñir alimentos, medicamentos, juguetes y cosméticos, ya que no son tóxicos. Finalmente la demanda de cactáceas para su empleo como plantas de ornato ha ido en aumento a nivel mundial (CONABIO, 1997; Mizrahi et. al. 1997; Sánchez-Mejorada, 1982; Ríha y Subík, 1991).

## **2.5.- Programas de conservación**

Existen dos principales estrategias de preservación y conservación, las cuales están encaminadas a la protección de las especies en su hábitat (*in situ*) o fuera de las áreas donde crecen de forma natural (*ex situ*).

Las estrategias de preservación *in situ* están diseñadas para mantener el ambiente natural representativo del lugar; es decir, la diversidad genética de las especies silvestres en especial las endémicas, amenazadas y en peligro de extinción; asegurando el aprovechamiento sustentable para la población local.

Las estrategias de conservación *ex situ* pretenden mantener colecciones vivas que actúan como reservorios de germoplasma, en lo cuales se realizan actividades de investigación, propagación y educación, permitiendo la protección y supervivencia de una parte de la variabilidad genética. Estas constituyen las más importantes acciones que impiden o disminuyen la sobrecolección de especies silvestres. Además de que son una buena alternativa para los países (como México) que carecen de tecnologías y recursos económicos que les permitan aprovechar comercialmente (y de manera racional) sus recursos naturales, pues tienen la ventaja de ser métodos de muy bajo costo (CONABIO, 1997).

### **2.5.1.- Métodos de propagación**

Los métodos utilizados para la reproducción de cactáceas son variados, e incluyen la propagación sexual a partir de semilla o diferentes formas asexuales ya sean, hijuelos, esquejes, injertos o cultivo de tejidos (CONABIO, op. cit.).

#### **2.5.1.1.- Cultivo de Tejidos**

El cultivo de tejidos también conocido como cultivo *in vitro* o micropropagación es la obtención de plantas nuevas a partir de pequeños explantes, como embriones, semillas, granos de polen, tallos, meristemos apicales, o células aisladas, en un medio artificial y bajo condiciones asépticas. Tiene su fundamento en la "Teoría de la totipotencialidad" la cual establece que cada célula es autosuficiente y por lo tanto capaz de regenerar una planta completa, si se le coloca en un ambiente propicio para ello. Por lo que este tipo de reproducción se perfila como una de las técnicas más idóneas ya que posee muchas ventajas en comparación con otros métodos tradicionales: 1) Permite reproducir grandes cantidades de plantas a partir de pocos explantes, lo que facilita la propagación en casos donde las especies son escasas en la naturaleza. 2) Minimiza la necesidad de tener que intervenir las áreas naturales para obtener plantas madre o propágulos. 3) Reduce la mortalidad que presentan las plántulas en las primeras fases de desarrollo, en su ambiente natural. 4) Ya que se trata de un cultivo en condiciones asépticas, permite la obtención de plantas libres de patógenos; facilitando el movimiento de material vegetal entre zonas geográficas sometidas a regulaciones sanitarias. 5) Reduce considerablemente el ciclo de cultivo. 6) Y promueve la precocidad favoreciendo el florecimiento temprano (Pierik, 1990; Sánchez, 1993; Hurtado y Merino, 2000).

### **2.5.1.2.- Elementos de cultivo**

#### **a) Medio nutritivo**

Los ingredientes del medio de cultivo se clasifican en sales inorgánicas (macro y micro nutrientes) compuestos orgánicos y agentes gelificantes.

Las sales inorgánicas representan los minerales esenciales para el crecimiento y desarrollo de una planta. Los compuestos orgánicos, son la fuente de energía (carbohidratos), compuestos químicos indispensables para el metabolismo (vitaminas) y reguladores de crecimiento (hormonas). Los agentes gelificantes tienen como papel ser un soporte natural para el inóculo.

#### **b) Material vegetal**

Se pueden utilizar dos tipos de material vegetal para su cultivo *in vitro*, plantas cultivadas bajo condiciones controladas o plantas provenientes de campo (Pierik, 1990; y Hurtado-Merino, 2000).

### **2.5.1.3.- Factores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo**

#### **a) Luz**

La luz es indispensable para las cactáceas, ya que estimula su desarrollo, influyendo en la forma de los órganos y en la periodicidad de vida. Una luz insuficiente implica una mayor lentitud de crecimiento, deformación, cambio en la coloración típica, y menor resistencia a las enfermedades.

#### **b) Temperatura**

Las cactáceas requieren para un crecimiento óptimo en laboratorio de temperaturas relativamente elevadas (entre 23 y 35°C). Esto se aplica sobre todo a las de origen desértico y tropical; sin embargo, las plantas originarias de las regiones de gran altitud o de las zonas alejadas del ecuador, prefieren temperaturas menores

#### **c) Humedad**

Se conoce poco sobre la influencia de ésta en el crecimiento y desarrollo *in vitro*, sin embargo se sabe que una alta humedad relativa en la cámara de cultivo favorece una mayor producción infecciones.

#### **d) Oxígeno**

Por último, no debe olvidarse que la aireación es un factor importante para el crecimiento de las células, por lo que debe facilitarse disponiendo poca cantidad de medio en el frasco de cultivo (Pierik, 1990; y Hurtado-Merino, 2000).

#### **2.5.1.4.- Tipos de cultivo**

Existen diferentes tipos de cultivo, los cuales se basan en medios nutritivos específicos para el material vegetal que se utiliza, en relación con lo que se desea obtener. Estos son:

##### **a) Cultivo de plantas completas**

Este tipo de cultivo consiste en sembrar semillas intactas, para obtener plántulas y plantas completas.

##### **b) Cultivo de embriones**

Este cultivo implica el aislamiento y crecimiento de embriones inmaduros, con el fin de obtener plantas completamente desarrolladas.

##### **c) Cultivo de células aisladas**

Es el crecimiento de células individuales obtenidas a partir de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.

##### **d) Cultivo de protoplastos**

Es el cultivo de células sin pared, que se producen por la degeneración enzimática de esta.

##### **e) Cultivo de órganos**

Consiste en utilizar porciones de la planta como meristemos, yemas, vástagos, raíces, etc. para regenerar plantas completas (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

#### **2.5.1.5.- Método de cultivo**

##### **a) Esterilización del material vegetal**

Existen 2 fuentes principales de infección en la planta, su interior y su exterior. Si existen infecciones internas debe determinarse la causa y tratarse. Si no, se puede continuar con la desinfección superficial. La cual consiste en realizar un lavado con agua, y con sustancias químicas como etanol, hipoclorito sódico, hipoclorito cálcico, cloruro de mercurio, etc.

##### **b) Aislamiento**

Después de la esterilización, todo debe realizarse en un ambiente totalmente aséptico o en una cámara de flujo laminar. Ahí, el material vegetal se coloca sobre una placa de vidrio donde se llevara acabo la obtención de los explantes (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

### **c) Inoculación**

Durante esta fase, el frasco que contiene el medio, debe estar en posición horizontal y con la boca hacia el flujo de aire, lo que reducirá el grado de contaminación. Los explantes se ponen sobre el medio, hundiéndolos ligeramente. Para posteriormente colocarlos en incubación (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

#### **2.5.1.6.- Respuestas morfogenéticas**

##### **a) Formación de callo**

El callo es básicamente un tejido no organizado, formado por células diferenciadas y no diferenciadas, que se dividen de forma activa.

##### **b) Regeneración de órganos**

Un órgano es una parte de un organismo que se compone de varios tejidos especializados para cumplir determinada función. Dependiendo de la especie vegetal y de donde se haya originado el callo, se puede o no producir la formación de órganos. Los que más fácilmente se regeneran, son las raíces. La formación de vástagos se cree, esta influida por factores más complejos como las concentraciones hormonales.

##### **c) Regeneración de embriones**

El embrión es el organismo formado después de la segmentación. Cuando los embriones regeneran a partir de células o tejidos somáticos, se habla de una embriogénesis somática, que se considera opuesta a la embriogénesis cigótica, resultado de la fertilización de una célula gamética (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

#### **2.5.1.7.- Aclimatización y transplante**

Debido a que las condiciones de las plántulas dentro del frasco de cultivo difieren mucho de las del medio ambiente, es necesario someterlas a un tratamiento de aclimatización para evitar la pérdida de propágulos al ser transplantados a suelo. Es una de las etapas que tiene mayor importancia en la técnica de propagación *in vitro*, la cual consiste en la disminución paulatina de dichos factores de manera controlada, hasta que las plántulas son transportadas a un sustrato determinado y colocadas en invernaderos o en campo (Hurtado y Merino, 2000).

### **2.6.- Trabajos realizados**

Desde hace mucho tiempo, la técnica de cultivo de tejidos ha sido una parte muy importante para comprender más acerca de la fisiología vegetal. Entre los

trabajos más importantes se encuentran, el realizado por Skoog y Miller (1957) donde demostraron que las concentraciones de 2 clases de hormonas vegetales: las auxinas y las citocininas, determinan las respuestas morfogénicas de las plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, y que los requerimientos son específicos de cada especie.

Mauseth y Halperin (1975) publicaron un estudio sobre el control hormonal de la organogénesis en *Opuntia polyacantha*. Encontrando que cuando las areolas eran cultivadas en medio MS modificado y algunas hormonas de crecimiento (BAP, AG<sub>3</sub> y ANA) aumentaban en tamaño y producción de hojas.

Mauseth (1976) trabajó en los efectos de las citocininas y el AG<sub>3</sub> en la estructura y metabolismo de los meristemos de brotes apicales en *Opuntia polyacantha*. Estableciendo que al usar una citocinina (BAP) el meristemo aumenta de tamaño y los primordios producidos se desarrollan como hojas fotosintéticas. En cambio, el GA<sub>3</sub> produce que los primordios se desarrollen como espinas.

Mauseth (1977) estableció por primera vez las ventajas que representan las técnicas de micropropagación para la conservación de especies amenazadas. El trabajo estuvo enfocado a determinar un medio de cultivo apto para la propagación de 11 especies de cactáceas, todas con éxito. El medio utilizado fue tomado de Lin y Staba (1961) con la adición de 5 Mm. de nitrato de amonio y 40 Mm. de nitrato de potasio a una concentración del 50%.

Johnson y Emino (1979) realizaron 2 investigaciones. La primera destinada a la propagación *in vitro* de *Mammillaria elongata* usando medio MS y diferentes auxinas y citocininas (2,4-D, 2ip, ANA, AIB, AIA). Hubo formación de callo, raíz y brotes, siempre con la combinación de ambas hormonas. La segunda estuvo dirigida al cultivo de 8 especies de cactáceas, con el mismo medio. Obtuvieron callos en todas las especies, enraizamiento en 6 y diferenciación de tallos en 4.

Vyskot y Jara (1984) describen una técnica basada en la estimulación hormonal para el crecimiento y desarrollo de meristemos queiscentes en *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera* y *Astrophytum myriostigma*, cultivadas en un medio sólido MS enriquecido con AIA, ANA, BA y Kin, obteniendo tallos directamente de los meristemos axilares.

Ault y Blackmon (1987) llevaron acabo la reproducción de *Ferocactus acanthodes*, especie amenazada del desierto de Sonora. Utilizaron como material vegetal plantas obtenidas de semillas, y como medio de cultivo el MS, suplementado con fosfato de sodio, inositol, adenina, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, cinetina y ácido naftalenacético. Logrando la proliferación de tallos axilares, en un promedio de 6.6 plántulas por explante.

Clayton y colaboradores (1990) publicaron un estudio, sobre propagación *in vitro* de 11 especies de cactáceas raras y en peligro de extinción: *Escobaria*

*missouriensis*, *E. robbinsorum*, *Sclerocactus spinosior*, *Toumeyia papyracantha*; *Mammillaria wrighftii*, *Pediocactus bradyi*, *P. despainii*, *P. knowltonii*, *P. paradinei*, *P. winkleri* y *S. mesae-verdae*, pertenecientes a la subtribu Cactinae. Los explantes utilizados fueron obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*. Los cuales estuvieron sometidos a diferentes concentraciones de citocininas y auxinas, midiendo su efecto sobre proliferación de brotes axilares. Reportaron que se requirieron desde concentraciones bajas, moderadas y hasta altas de citoquinina para obtener la proliferación de dichos brotes y que todas las especies enraizaron espontáneamente utilizando un medio sin hormonas.

Dabekaussen y otros investigadores (1991) desarrollaron un sistema de cultivo para estudiar la activación areolar *in vitro* en explantes de *Sulcorebutia alba*; observaron que la citoquinina (BA) jugó un papel esencial previo a la activación areolar; y que la concentración de 0.25 mg de BA en el medio de cultivo tuvo buenos resultados. La utilización de la citoquinina 2ip no fue conveniente, ya que esta incremento la formación de callos. Las condiciones físicas óptimas para la activación areolar fue a una temperatura de 27°C y una irradiación de 2.3 W.

Fay y Gratton (1992) publicaron una revisión bibliográfica sobre el cultivo de tejidos en cactáceas y otras suculentas. Resumiendo los avances más importantes de las familias Agavaceae, Aizoaceae, Aloaceae, Asclepiadaceae, Cactaceae, y Euphorbiaceae.

Garay y Rubluo (1992) evaluaron las respuestas morfogénicas *in vitro* de una cactácea en peligro de extinción, *Aztekium ritteri*. Los explantes utilizados fueron pequeños fragmentos de tallo, que se colocaron en medio MS con vitaminas L2 y combinaciones de diferentes reguladores (BA, ANA, 24D, AIB y Kin). Obtuvieron formación de callo, brotes, y estructuras embrionarias.

Quintana (citado por Sánchez, 1993), mantiene desde 1992 un programa de propagación *in vitro* de especies ornamentales en el cual se reproducen 6 especies de cactus: *Leuchtenbergia principis*, *Strombocactus disciformis*, *Mammillaria aureilanata*, *M. bocasana*, *M. perezdelarosa* y *Melocactus dawsonni*. Donde por lo menos una ha alcanzado la fase de aclimatización y transplante en invernadero, así como su venta comercial.

Pérez y otros investigadores (1998) realizaron la micropropagación de 21 especies de cactáceas mexicanas de los géneros: *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*, todos con éxito. El material vegetal utilizado fue semillas y segmentos de brotes juveniles que fueron incubados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BA y ANA.

Bhau (1999) llevo a cabo la regeneración de *Coryphanta elephantidens* a partir de explantes de raíz que fueron cultivados en un medio MS adicionado con 3% de sacarosa y diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D, AIA, AIB, ANA) y

citocininas (BAP, Kin). Observaron que a altas concentraciones de 2,4-D promovieron una rápida formación de callo, mientras que el AIA un lento crecimiento. BAP provee un menor potencial en la formación de brotes que Kin con las otras auxinas.

Finalmente Flores y Ortiz (2000) realizaron la propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* a través de activación areolar por etiolación. Donde las plantas se colocaron en semioscuridad ( $5\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) por 8 semanas. Utilizaron como regulador de crecimiento una citocinina (BAP), obteniendo mejores resultados con la concentración de 10 mg/l después de 30 semanas de cultivo en medio MS.

Por otra parte, pocos trabajos se han dado a la tarea de medir indicadores fisiológicos en cactáceas propagadas *in vitro*. En general, están enfocados a estimar los factores que determinan el tipo de metabolismo que realizan las cactáceas en condiciones de campo (Ting y Rayder, 1985) y sólo algunos pocos como el realizado por Malda y colaboradores (1999) determinan el tipo de metabolismo *in vitro* comparando las fluctuaciones diarias de las concentraciones de ácido málico en plantas propagadas *in vitro* y cultivadas *ex vitro* de *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*. Determinando que las dos especies en ambos tipos de cultivo se comportaron como típicamente MAC.

Así mismo casi no existen estudios estereológicos en cactáceas, como el realizado por Scheinvar (1999) quien apoyándose en la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), describió las características morfológicas de células epidérmicas, estomas, tricomas y granos de polen, de una nueva especie de *Opuntia* encontrada en Ayutla, Municipio de Arroyo Seco, Estado de Querétaro.

### III.- OBJETIVOS

#### 3.1.- Objetivo general

Llevar acabo la micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de areolas activadas *in vivo* por etiolación.

##### 3.1.1.- Objetivos particulares

- a) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la citocinina 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino) purina [2ip], en explantes de *Mammillaria conspicua*.
- b) Efectuar la aclimatización y trasplante a suelo de las plántulas obtenidas *in vitro*.
- c) Realizar un estudio estereológico mediante Microscopía Electrónica de Barrido en las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre.
- d) Determinar y comparar la actividad metabólica en relación a su capacidad de fijar  $\text{CO}_2$  tanto en las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre.

citocininas (BAP, Kin). Observaron que a altas concentraciones de 2,4-D promovieron una rápida formación de callo, mientras que el AIA un lento crecimiento. BAP provee un menor potencial en la formación de brotes que Kin con las otras auxinas.

Finalmente Flores y Ortiz (2000) realizaron la propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* a través de activación areolar por etiolación. Donde las plantas se colocaron en semioscuridad ( $5\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) por 8 semanas. Utilizaron como regulador de crecimiento una citocinina (BAP), obteniendo mejores resultados con la concentración de 10 mg/l después de 30 semanas de cultivo en medio MS.

Por otra parte, pocos trabajos se han dado a la tarea de medir indicadores fisiológicos en cactáceas propagadas *in vitro*. En general, están enfocados a estimar los factores que determinan el tipo de metabolismo que realizan las cactáceas en condiciones de campo (Ting y Rayder, 1985) y sólo algunos pocos como el realizado por Malda y colaboradores (1999) determinan el tipo de metabolismo *in vitro* comparando las fluctuaciones diarias de las concentraciones de ácido málico en plantas propagadas *in vitro* y cultivadas *ex vitro* de *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*. Determinando que las dos especies en ambos tipos de cultivo se comportaron como típicamente MAC.

Así mismo casi no existen estudios estereológicos en cactáceas, como el realizado por Scheinvar (1999) quien apoyándose en la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), describió las características morfológicas de células epidérmicas, estomas, tricomas y granos de polen, de una nueva especie de *Opuntia* encontrada en Ayutla, Municipio de Arroyo Seco, Estado de Querétaro.

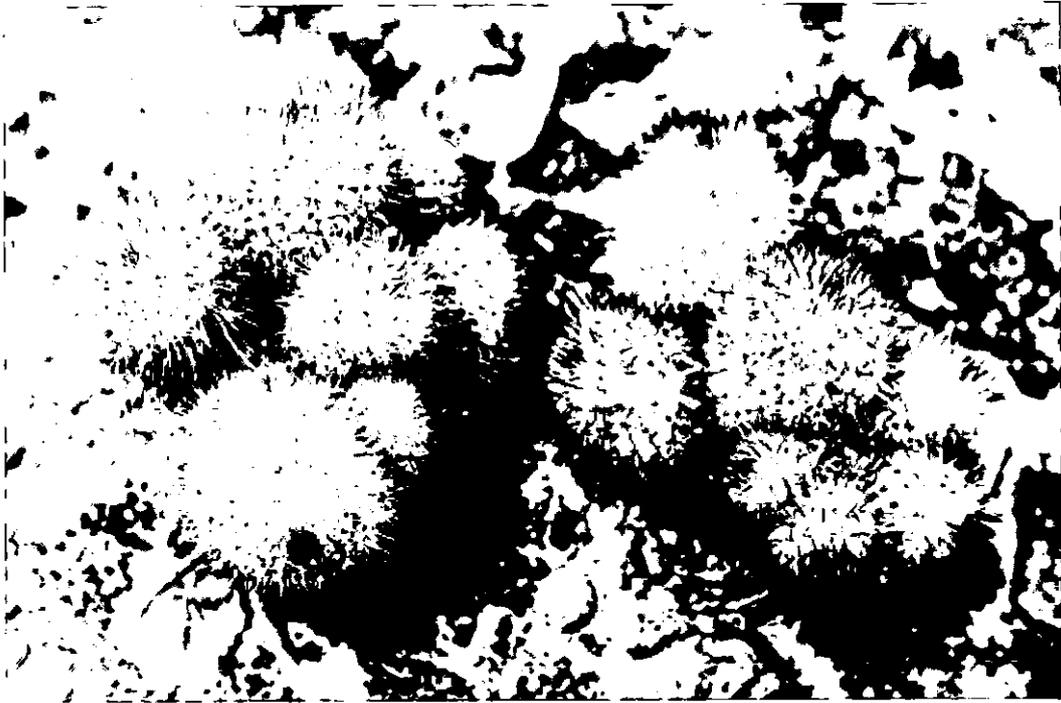
### III.- OBJETIVOS

#### 3.1.- Objetivo general

Llevar acabo la micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de areolas activadas *in vivo* por etiolación.

##### 3.1.1.- Objetivos particulares

- a) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la citocinina 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino) purina [2ip], en explantes de *Mammillaria conspicua*.
- b) Efectuar la aclimatización y transplante a suelo de las plántulas obtenidas *in vitro*.
- c) Realizar un estudio estereológico mediante Microscopía Electrónica de Barrido en las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre.
- d) Determinar y comparar la actividad metabólica en relación a su capacidad de fijar  $\text{CO}_2$  tanto en las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre.



**Figura 1.-** *Mammillaria conspicua* en estado silvestre,  
Valle de Tehuacán, Puebla.

## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Descripción de la especie

*Mammillaria conspicua*. Presenta un tallo simple, globoso de hasta 14 cm. de diámetro, con el ápice redondeado, y el centro ligeramente hundido. Los tubérculos se encuentran muy juntos, son generalmente cónicos, de 6 a 7 mm. de altura, de color verde grisáceo. Las axilas llevan lana y cerdas. Las areolas son pequeñas principalmente circulares, lanosas sólo en el ápice. Con 16 a 25 espinas radiales de hasta 6 mm. de longitud de color blanco, y 2 espinas centrales de 10 mm. de longitud del mismo color, pero con la punta castaño claro en las plantas adultas, y castaño rojizo en las jóvenes. Sus flores son de color rosa, con la franja media más oscura. Y el fruto es rojo carmín (Figura 1).

*Distribución*. Endémica del Estado de Puebla. Localidad tipo: Valle de Tehuacán, en especial de la zona de Zapotitlán de las Salinas.

### Clasificación.

Orden: Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Careoideae

Tribu: Cactinae

Subtribu: Cactinae

Género: Mammillaria

Subgénero: Mammillaria.

Especie: *Mammillaria conspicua* (Bravo-Hollis, 1991).

### 4.2.- Material vegetal

El material consistió en una planta joven de *Mammillaria conspicua*, de 5cm. de alto x 2.5cm. de ancho, y aproximadamente 3 años de edad, proveniente de campo (Valle de Tehuacán, Puebla).

### 4.3.- Métodos

#### 4.3.1.- Cultivo de Tejidos.

Para llevar acabo el cultivo *in vitro* el material vegetal fue sometido a etiolación, colocándose en parcial obscuridad ( $10\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) durante 20 semanas. Pasado dicho tiempo, las partes etioladas fueron cortadas y selladas con parafina. Posteriormente se procedió a la desinfestación superficial: las espinas fueron cortadas y eliminadas, a continuación se lavaron con agua corriente y un poco de detergente comercial durante 30 minutos, se colocaron en etanol al 80 % por un minuto, en hipoclorito de sodio al 3 % con 0.005 % de tritón X-80 por 25 minutos, y se enjuagaron cuatro ocasiones con agua destilada estéril.

La obtención de los explantes se realizó cortando fragmentos de tejido con areolas de aproximadamente 1 cm. de diámetro, que se colocaron en 50 frascos con 30 ml. de medio de cultivo estéril MS (1962) adicionado con 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de tiamina-HCl, 1 mg/l de piridoxina-HCl, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de glicina, 100 mg/l de inositol, 7 g/l de agar y concentraciones de 0.0, 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mg/l de 2ip (10 repeticiones por c/u); ajustados a un pH de 5.8; y esterilizados durante 15 minutos, a una presión de 1.05 Kg/cm<sup>2</sup>, y una temperatura de 120-121°C.

Todas las fracciones se incubaron bajo condiciones de: 16 horas luz, con 25 µm/m<sup>2</sup>/s de irradiación luminosa (PAR) y 8 de obscuridad; a una temperatura de entre los 23-26°C.

Después de 4 semanas las fracciones fueron subcultivadas a medio fresco con la misma composición al descrito anteriormente. Observando las respuestas morfogénicas. Los callos y las plántulas obtenidas fueron evaluados en: tiempo de formación, forma, apariencia y tamaño (Ver diagrama de flujo).

#### **4.3.2.- Aclimatización y transplante**

Finalizada la etapa de cultivo *in vitro*, las plantas pasaron a la fase de adaptación: fueron colocadas por una semana en un lugar donde la iluminación y la temperatura eran mayores (60µm/m<sup>2</sup>/s y entre 25-27°C respectivamente).

Una vez transcurrida dicha fase, las plantas fueron llevadas al invernadero, donde se sacaron del frasco, se lavaron las raíces con agua destilada y se sembraron en una mezcla de tezontle y tierra negra (1:1) estéril; colocada en charolas de germinación desinfectadas. Las cuales fueron cerradas para conservar la humedad relativa (80%).

Las plantas permanecieron así tres semanas. Posteriormente las charolas fueron perforadas poco a poco, para que las plántulas fueran desarrollando tolerancia a la baja humedad relativa. Después de 2 meses, se determinó el porcentaje de supervivencia (Ver diagrama de flujo).

#### **4.3.3.- Estudio estereológico**

Como primer paso, los fragmentos de callo y tallos de las plántulas obtenidas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre se sometieron a escarificación con alcohol al 96% por 15 segundos.

Hecho esto, se colocaron en el fijador (glutraldehído al 2.5%) durante 2 horas, después se lavaron 2 ocasiones con Buffer de fosfatos y se deshidrataron gradualmente con alcohol al 20, 30, 40, 50, 60, 70, y 80 (en cuya concentración se realizaron los cortes de aproximadamente 2mm<sup>2</sup>. de tejido), para continuar con alcohol al 90 y 100%, dejándolos 15 minutos en cada cambio.

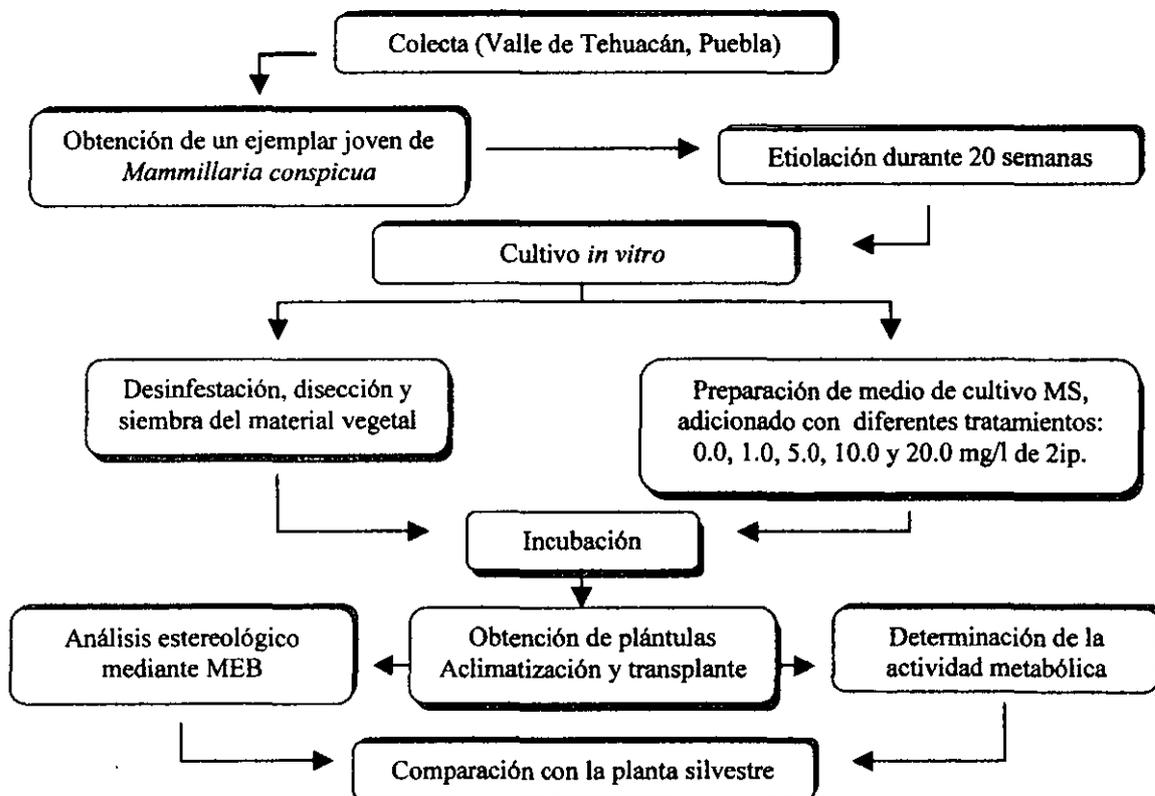
Ya deshidratados, los cortes se secaron a punto crítico; es decir, se introdujeron en una cámara de secado enfriada previamente a 0°C, donde el alcohol absoluto impregnado en los cortes de callo y tallos se sustituyó por CO<sub>2</sub> líquido, mediante varios lavados. A continuación la temperatura y la presión se elevaron hasta alcanzar 31.1°C y 1073 psi (72.8g/cm<sup>2</sup>). Temperatura y presión a las cuales, el CO<sub>2</sub> llega a su punto crítico. Después de 5 minutos el CO<sub>2</sub> se evaporó lentamente.

Posteriormente, se colocaron en un portamuestras cilíndrico de cobre, y se cubrieron con 8nm. de oro, usando una cámara ionizadora (Jeol Modelo Fine Coat ION Spotter JFC-1100) a 1200 voltios. Los cuales se observaron en el MEB y se registraron fotográficamente con película Verichrome para formato de 120 mm (Bozzola y Ruseell, 1992). Registros donde se estudio y comparo la morfología de las células y estomas de las diferentes muestras (Ver diagrama de flujo).

#### 4.3.4.- Determinación de la actividad metabólica

Esta consistió en la medición cada 2 hrs. del consumo de CO<sub>2</sub> a lo largo de 24 hrs. por medio de un analizador por infrarrojo (Modelo LI-6400), para establecer el tipo de metabolismo que realizaron las plántulas *in vitro*, las aclimatizadas y la planta silvestre (Ver diagrama de flujo).

#### 4.4.- Diagrama de flujo



## V.- RESULTADOS

A lo largo del experimento se observó que todos los tratamientos (0.0, 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mg/l de 2ip) mostraron crecimiento de callo sobre la superficie del corte, pero la primera evidencia de formación de éste fue en la concentración de 10.0 mg/l 2ip a la 3ª semana de incubación. El cual se caracterizó por ser de color verde, friable, cristalino, sin presencia de oxidación y vitrificación (Figura 2). Cuyo tamaño alcanzó hasta 2.5 cm. de alto x 3 cm. de ancho. En el resto de los tratamientos no fue evidente sino hasta después de la 7ª semana de incubación.

La formación de las plántulas ocurrió inicialmente en el mismo tratamiento (10.0 mg/l 2ip) en que apareciera por primera vez el callo a la 5ª semana de incubación, seguido del tratamiento con 20mg/l a la 8ª semana. Esta se inició con la agrupación de células con mayor definición morfológica que el resto de las células del callo, las cuales fueron diferenciándose hasta tener una apariencia semejante a la de la planta madre: \*forma globosa con el centro ligeramente hundido, tubérculos muy juntos, areolas circulares y gran cantidad de espinas blancas con la punta castaño rojizo, solo que en dimensiones pequeñas (Figura 2). No hubo presencia de oxidación; y los brotes progresaron hasta alcanzar un promedio de 1.5 cm. de alto x 1 cm. de ancho. El resto de los tratamientos solo mantuvieron la proliferación de callo.

Cuadro 1.- Respuestas morfológicas de los explantes de <i>Mammillaria conspicua</i> , cultivados en medio MS.						
Tratamientos (mg/l de 2ip)	Respuesta					
	Callo			Plántulas		
	Producción	Color	Consistencia	Producción	Color	Forma
0.0	100.0 %	Verde	Friable	0.0 %	Verde	Típica de la planta madre*
1.0	100.0 %	Verde	Friable	0.0 %	Verde	
5.0	100.0 %	Verde	Friable	0.0 %	Verde	
10.0	100.0 %	Verde	Friable	76.6 %	Verde	
20.0	100.0 %	Verde	Friable	90.0 %	Verde	

Independientemente de la talla, las plántulas que presentaron raíz fueron transferidas a suelo. Después de un periodo de 2 meses, todas presentaban buena apariencia en general, y alcanzaron en promedio una talla de 3 cm. de alto x 2 cm. de ancho (Figura 3).

Cuadro 2.- Aclimatización y transplante.	
Condiciones ambientales	Características
Sustrato	Tezontle y tierra negra (1:1)
Irradiación luminosa	60 $\mu\text{m}^2/\text{s}$
Humedad relativa	80.0 %
Temperatura	Entre 25-27°C
Resultado	
100.0 % de supervivencia	

En cuanto a las diferencias morfológicas observadas en las fotografías tomadas mediante MEB durante las diferentes etapas del cultivo y la planta silvestre, se encontró que:

En general, las células de la epidermis son planas, de tamaño uniforme, forma definida, estrechamente unidas entre sí. En cambio las células del callo son de diferentes dimensiones y redondeadas. En las plántulas obtenidas *in vitro* se encuentran hidratadas, dispuestas de manera alargada, sin la capa cerosa desarrollada, y sin partículas adheridas a su superficie. A diferencia de las células de las plántulas aclimatizadas y de la planta silvestre, que se aprecian deshidratadas, mayormente engrosadas, y con partículas unidas a ellas (Figura 4).

Los estomas, se observan como aberturas sobre la superficie de la epidermis, las cuales en las plántulas obtenidas *in vitro* se encuentran abiertas, en tanto que en las aclimatizadas y la planta silvestre están cerradas; y cubiertas en esta última por lo que parece ser una delgada capa de cera. Estas aberturas o poros estomáticos poseen en todos los casos un patrón de distribución homogéneo, sin embargo su tamaño varía de 2.2  $\mu$ . de diámetro en las plántulas obtenidas *in vitro* a 2.0  $\mu$ . en las plántulas aclimatizadas y 2.8  $\mu$ . en la planta silvestre. Dichos poros estomáticos se encuentran limitados por dos células oclusivas semejantes entre sí con 7.2  $\mu$ . de largo x 2.3  $\mu$ . de ancho en las plántulas obtenidas *in vitro*; y 5.3  $\mu$ . de largo x 2.4  $\mu$ . de ancho en las plantas aclimatizadas. Excepto en la planta silvestre, que presenta una de mayor dimensión que la otra: donde la más pequeña mide 5  $\mu$ . de largo x 2.3  $\mu$ . de ancho, y la más grande 7.12  $\mu$ . de largo x 2  $\mu$ . de ancho (Figura 5).

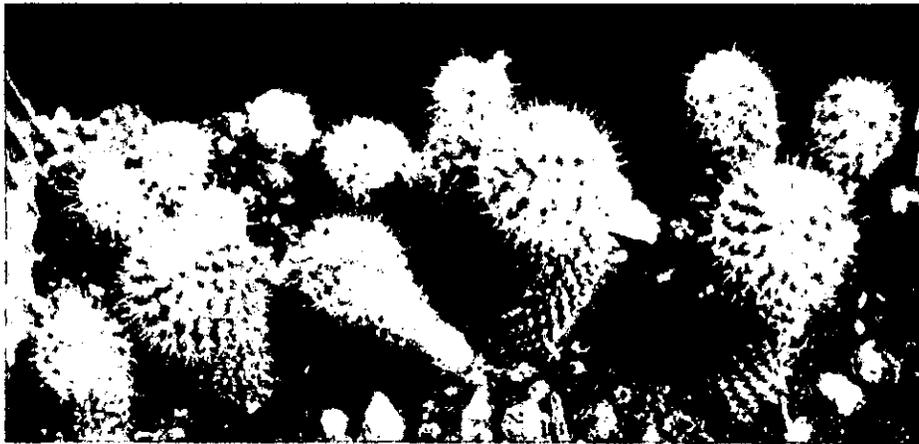
Por otra parte se determino que el número de estomas fue de 5.32/mm<sup>2</sup> en las plántulas obtenidas *in vitro*, 4.7/mm<sup>2</sup> en las aclimatizadas y 7.1/mm<sup>2</sup> en la planta silvestre.

Finalmente, durante la determinación de la actividad metabólica se observó que tanto las plántulas obtenidas *in vitro*, como las aclimatizadas y la planta silvestre presentan una tasa de fijación de CO<sub>2</sub> durante las horas de luz (Tablas 1, 2 y 3).

Esta tasa de fijación de CO<sub>2</sub> parece ser, en las plántulas obtenidas *in vitro*, más alta durante las primeras 10 hrs. de luz, siendo el pico máximo a las 2 hrs. después de que la luz se enciende; del mismo modo que en las plántulas aclimatizadas, aunque estas tuvieron su pico máximo 14hrs. después de que el fotoperiodo se inicia. Mientras que la planta silvestre presento 2 pequeños picos, uno a las 2hrs. y el otro a las 14hrs. de haber comenzado el periodo luminoso (Gráfica 1).



**Figura 2.-** Callo (a) y plántulas (b) obtenidas *in vitro* a las 12 semanas de incubación.



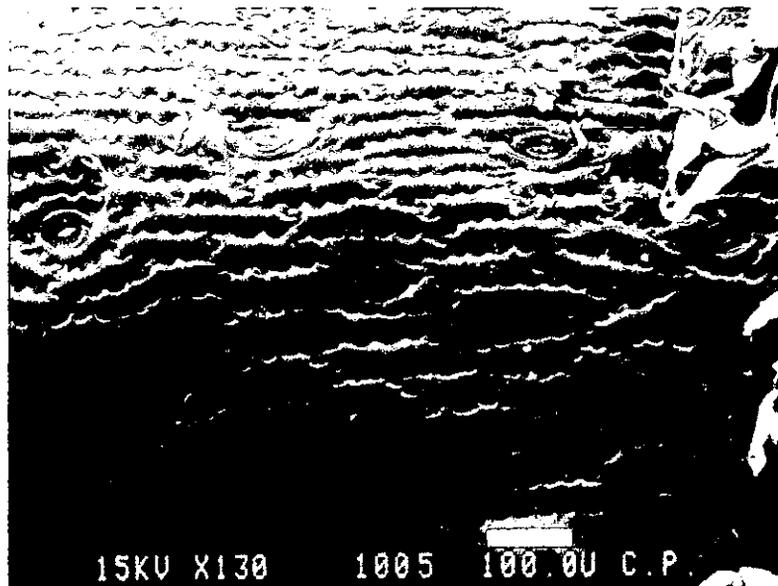
**Figura 3.-** Plántulas aclimatizadas dos meses después del trasplante a suelo.



A)



B)

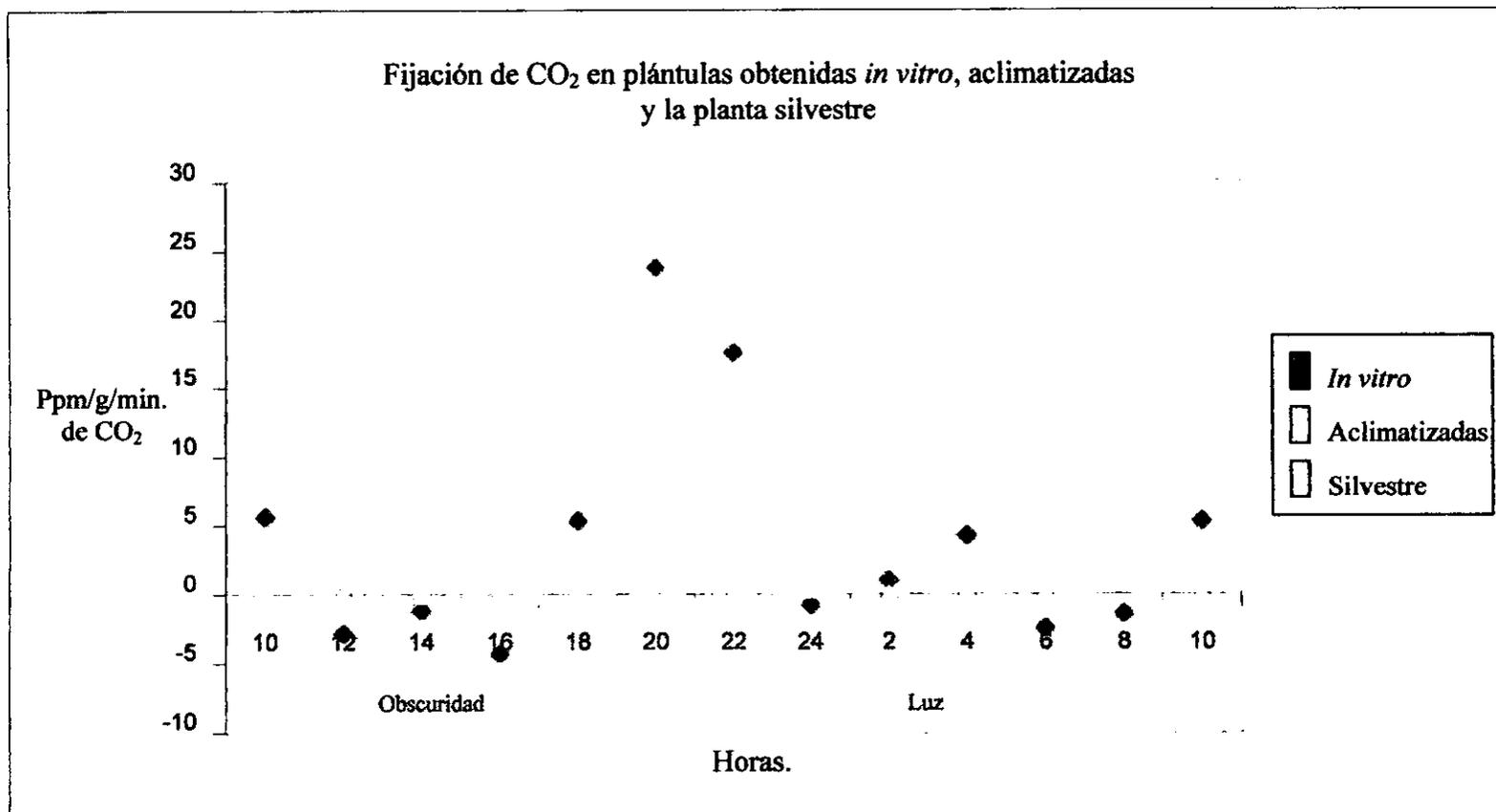


C)

**Figura 4.-** Imágenes tomadas mediante MEB donde se aprecia la forma de las células aun no diferenciadas o callo (A), las células epidérmicas de una planta *in vitro* (B) y de la planta silvestre (C).



**Figura 5.-** Imágenes de estomas tomadas mediante MEB de una plántula obtenida in vitro (A), aclimatizada (B) y la planta silvestre (C).



**Gráfica 1.-** Dinámica de fijación de CO<sub>2</sub> a lo largo de 24 hrs., donde el periodo de obscuridad fue de las 10 a las 18 hrs. y el de luz de las 18 a las 10 hrs.

## VI.- DISCUSIÓN

### a) Cultivo *in vitro*

El presente estudio mostró que, la utilización de medio de cultivo semisólido MS adicionado con diferentes compuestos orgánicos, permite la rápida proliferación de las células meristemáticas en *Mammillaria conspicua*, por lo que se considera como un medio efectivo para su cultivo. Esto concuerda con un gran número de trabajos, ya que es uno de los medios más usados desde hace tiempo con éxito en casi todas las especies (Mauseth, 1977; Johnson y Emino, 1979; Vyskot y Jara, 1984; Ault y Blackmon, 1987; Garay y Rubluo, 1992).

Sin embargo, el crecimiento de callo y la formación de plántulas pudo ser específicamente iniciado por el fenómeno de etiolación, el cual estimula a la planta a producir altos niveles de auxina, cuyos efectos sobre el crecimiento tienen como consecuencia el alargamiento celular. Estudios realizados con cultivos celulares, en medios artificiales, han determinado que una célula indiferenciada como una célula meristemática, tiene dos posibles trayectorias: puede crecer y dividirse o puede alargarse sin división celular. La célula que se divide continuamente permanece esencialmente sin diferenciar, mientras que la célula que se alarga tiende a diferenciarse y especializarse (Salisbury, 1994; Curtis-Barnes, 1999; Flores y Ortíz 2000). De modo que, las auxinas endógenas producidas *in vivo* por etiolación en combinación con las distintas concentraciones de la citocinina (2ip), promovieron la proliferación y desarrollo de una masa celular (callo), y con las concentraciones más altas (10 y 20 mg/l) la formación de plántulas o brotes (Cuadro 1). Respuestas que se obtuvieron de modo semejante en trabajos donde variaron las concentraciones de auxina y citocinina, pero que no sucedieron cuando estas eran utilizadas por separado, ya que en algunos de ellos la auxina sólo tenía un efecto de expansión (formación de células gigantes) y la citocinina tenía muy poco o ningún efecto (Skoog y Miller, 1957; Mauseth y Halperin, 1975; Mauseth, 1976). Demostrando que el proceso de morfogénesis está regulado en gran medida por la combinación hormonal auxina-citocinina (Skoog y Miller, 1957; Johnson y Emino, 1979; Vyskot y Jara, 1984; Clayton et. al., 1990; Rubluo et. al., 1993).

### b) Aclimatización y transplante

Durante la transferencia a suelo existe la posibilidad de pérdida de propágulos, debido a que las plantas deben enfrentarse a condiciones difíciles, donde la irradiación luminosa es mucho más alta, y la humedad relativa y el aporte nutricional son menores (Bhojwani y Dhawan, 1988).

En este caso, no hubo ninguna pérdida durante dicho periodo, siendo el porcentaje de supervivencia de 100% (Cuadro 2). Similar al obtenido por diversos autores como Vyskot y Jara, 1984; Garay y Rubluo, 1992; y Malda et. al., 1999. Hecho que se debió principalmente, a que las plántulas fueron transplantadas una vez que presentaron raíz; las cuales se desarrollaron naturalmente en el medio

utilizado. Parecido a lo observado en el cultivo *in vitro* de *Mammillaria wrightii* (Clayton et. al., 1990). Y a otros trabajos donde indujeron su formación por el uso de AIA en el medio (Vyskot y Jara, 1984; Clayton et. al., 1990; Pérez et. al., 1998). Lo cual se vio favorecido, por que dicha fase se realizó de manera gradual, reduciendo las condiciones de esterilidad y humedad relativa. Ya que las plantas obtenidas *in vitro* son muy susceptibles a dañarse fácilmente por cambios bruscos en las condiciones ambientales (Bolar et. al., 1998). Además de que fueron colocadas en un ambiente propicio, donde la intensidad lumínica y la temperatura estuvieron relacionados con las necesidades de la planta (Hayashi et. al, 1998).

Esto permitió a las plántulas desarrollar una mayor tolerancia a la baja humedad relativa del ambiente, lo que facilita su adaptación a condiciones autótrofas donde tendrán que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua (Hurtado y Merino, 2000 ).

### **c) Estudio estereológico**

Las plántulas que se obtuvieron *in vitro*, son distintas en muchos aspectos de las que se han aclimatizado y de las plantas silvestres. Debido a que la gran mayoría sufre cambios importantes en su morfología, al ser transplantadas o como consecuencia del medio en el que se desarrollan (Bravo-Hollis, 1978; Bolar et. al., 1998).

Las plántulas que se originaron *in vitro* generalmente no tienen la cutícula o capa de cera desarrollada, y sus células están muy hidratadas, resultado de la alta humedad relativa que se da en el interior de los frascos. Así mismo, como se encuentran bajo condiciones de esterilidad, no hay establecimiento de microorganismos (bacterias u hongos) o de otras partículas en su superficie.

Después de la transferencia, los cambios principalmente se observan en las características de la epidermis, en el grosor de los tallos u hojas, y en la estructura y número de estomas (Grout y Aston, 1977; Wetzstein y Sommer, 1983). Es decir, incrementan el grosor de la cutícula (Wetzstein y Sommer, 1983); disminuyen la salida de CO<sub>2</sub> y el índice de transpiración a través del cierre estomatal, como respuesta al cambio de humedad y a las condiciones de cultivo distintas (Malda et. al., 1999). Como en el caso de las plántulas aclimatizadas y la planta silvestre, en las cuales las células de la epidermis se observan deshidratadas y cubiertas por una capa de cera mayormente engrosada.

### **d) Determinación de la actividad metabólica**

La fotosíntesis es un proceso mediante el cual, los organismos incorporan bióxido de carbono de la atmósfera y lo transforman en compuestos orgánicos.

Las plantas MAC en condiciones de campo, llevan acabo esta incorporación de CO<sub>2</sub> durante la noche. Sin embargo, en el presente experimento tanto las plántulas

obtenidas *in vitro*, como las aclimatizadas y la planta silvestre fijaron continuamente CO<sub>2</sub> en el periodo de luz. Lo cual no concuerda con las fases típicas del metabolismo MAC descritas por Nobel (1998), donde los registros diarios de fijación de CO<sub>2</sub> en *Agave deserti* y *Ferocactus acanthodes* en condiciones de campo muestran que esta se lleva a cabo de las 18hrs. a las 6 de la mañana (periodo de obscuridad) y de las 6 a las 18hrs (periodo de luz) solo se observó una ligera incorporación del gas durante las primeras horas de luz, probablemente por la vía C3.

Lo observado en plantas pudo estar influenciado por las condiciones de laboratorio, ya que estudios recientes han comprobado que aun cuando la capacidad de una planta de realizar metabolismo MAC está genéticamente determinada, su control también es ambiental. Es decir, tienen la capacidad de cambiar hacia una mayor tasa de fijación de CO<sub>2</sub> mediante un modo fotosintético tipo C3 cuando las condiciones ambientales son favorables. Ya que hay una relación directa entre la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y los factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa o la PAR. (Gibson y Nobel, 1986; Salisbury, 1994).

Por lo que los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con algunos trabajos donde se observó que al colocar una planta MAC en un lugar con una humedad relativa alta (80%), una temperatura menor a 25°C y menos de 500  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  de irradiación luminosa (PAR), estas mantenían una tasa de fijación continua a lo largo del día, a través de la vía C3 (Gibson y Nobel, 1986; Malda et. al., 1999). Pero que difieren de otros, en los cuales las cactáceas obtenidas *in vitro* con metabolismo C3, una vez transferidas a condiciones *ex vitro* (invernadero) revirtieron al típico metabolismo MAC después de 2 meses de aclimatización (Altesor et. al., 1992; Malda et. al., 1999).

## VII.- CONCLUSIONES.

El proceso de etiolación al cual fue sometida la planta de *Mammillaria conspicua* tuvo probablemente un efecto directo en la proliferación de callo y plántulas *in vitro*.

El medio MS basal adicionado con 20 mg/l de 2ip resulto ser el más eficaz de los tratamientos para la micropropagación masiva de *M. conspicua*.

El procedimiento de aclimatización fue adecuado logrando un establecimiento del 100%.

Se encontraron notables diferencias morfológicas en la epidermis y en la composición estomática, tanto en las plántulas obtenidas *in vitro*, como las aclimatizadas y la planta silvestre, lo que demuestran la gran capacidad de adaptación y plasticidad que presenta este grupo vegetal, factores que son determinantes para su supervivencia.

Es muy posible que debido a las condiciones de laboratorio (alta humedad relativa, baja temperatura y baja iluminación) los tres grupos de plantas estudiados presentaron un tipo de metabolismo C3, fijando CO<sub>2</sub> durante las horas de luz.

## VIII.- RECOMENDACIONES

En base a resultados obtenidos en el presente estudio se dan las siguientes recomendaciones:

Evaluar el efecto de diferentes tiempos de etiolación en *Mammillaria conspicua* y su relación sobre la cantidad de auxinas endogenas producidas, de manera que permita establecer mas claramente su efecto en la morfogénesis *in vitro*.

Probar con diferentes concentraciones de otras citocininas (BA, KIN, Zeatina) para determinar cuales permiten obtener una mayor producción de plantas.

Comparar el efecto de diferentes tipos de sustratos sobre el proceso de aclimatización.

Medir algunos indicadores fisiológicos como peroxidasas, invertasas, acidez titulable, proteínas y clorofilas, para observar los cambios en el estado metabólico de la planta durante su establecimiento a suelo.

## VII.- CONCLUSIONES.

El proceso de etiolación al cual fue sometida la planta de *Mammillaria conspicua* tuvo probablemente un efecto directo en la proliferación de callo y plántulas *in vitro*.

El medio MS basal adicionado con 20 mg/l de 2ip resulto ser el más eficaz de los tratamientos para la micropropagación masiva de *M. conspicua*.

El procedimiento de aclimatización fue adecuado logrando un establecimiento del 100%.

Se encontraron notables diferencias morfológicas en la epidermis y en la composición estomática, tanto en las plántulas obtenidas *in vitro*, como las aclimatizadas y la planta silvestre, lo que demuestran la gran capacidad de adaptación y plasticidad que presenta este grupo vegetal, factores que son determinantes para su supervivencia.

Es muy posible que debido a las condiciones de laboratorio (alta humedad relativa, baja temperatura y baja iluminación) los tres grupos de plantas estudiados presentaron un tipo de metabolismo C3, fijando CO<sub>2</sub> durante las horas de luz.

## VIII.- RECOMENDACIONES

En base a resultados obtenidos en el presente estudio se dan las siguientes recomendaciones:

Evaluar el efecto de diferentes tiempos de etiolación en *Mammillaria conspicua* y su relación sobre la cantidad de auxinas endogenas producidas, de manera que permita establecer mas claramente su efecto en la morfogénesis *in vitro*.

Probar con diferentes concentraciones de otras citocininas (BA, KIN, Zeatina) para determinar cuales permiten obtener una mayor producción de plantas.

Comparar el efecto de diferentes tipos de sustratos sobre el proceso de aclimatización.

Medir algunos indicadores fisiológicos como peroxidasas, invertasas, acidez titulable, proteínas y clorofilas, para observar los cambios en el estado metabólico de la planta durante su establecimiento a suelo.

# ANEXO

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- AIA**    Ácido indol-3-acético.
- AIB**    Ácido indolbutírico.
- AG<sub>3</sub>**    Ácido giberélico.
- ANA**    Ácido naftalenacético.
- BA**      Benciladenina.
- BAP**    6-Bencilaminopurina.
- Kin**     Cinetina.
- MAC**    Metabolismo ácido de las crasulaceas.
- MEB**    Microscopía Electrónica de Barrido.
- MS**     Medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog, 1962.
- PAR**    Radiación fotosintéticamente activa.
- 2,4-D**   Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- 2ip**     6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina.

## TABLAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA

Parámetros estimados:

Hr: Hora.

M: Muestra.

TA: Temperatura ambiente.

HR: Humedad relativa.

CO<sub>2o</sub>: Unidades de Bióxido de carbono que salen.

CO<sub>2i</sub>: Unidades de Bióxido de carbono que entran.

Uu: Unidades de CO<sub>2</sub> utilizadas por la planta.

Ppm/g/min: Partes por millón/gramos/minutos de CO<sub>2</sub> fijado por la planta.

\* Tasa de respiración.

**Tabla 1.- Determinación de la actividad metabólica a lo largo de 24 hrs. en la planta silvestre.**

Hr	M	TA	HR	CO <sub>2o</sub>	CO <sub>2i</sub>	Uu	ppm/g/min
10	1	26.0°C	80.0%	33.4	34.1	0.7	0.015
12	1	26.3°C	80.0%	123.7	125.8	2.1	0.047
14	1	26.8°C	80.0%	3.7	2.5	1.2	0.027*
16	1	26.7°C	80.0%	61.3	63.4	2.1	0.047
18	1	26.0°C	80.0%	575.1	575.7	0.6	0.013
20	1	25.8°C	80.0%	4.5	5.5	1.0	1.0
22	1	25.3°C	80.0%	14.6	15.9	1.3	0.052
24	1	23.9°C	80.0%	58.0	63.9	5.9	0.23
2	1	23.7°C	80.0%	4.5	4.3	0.2	0.008*
4	1	23.5°C	80.0%	18.1	21.9	3.8	0.152
6	1	24.0°C	80.0%	561	563.2	2.2	0.088
8	1	25.0°C	80.0%	767	767.9	0.9	0.72
10	1	25.8°C	80.0%	42.5	43.2	0.7	0.015

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**Tabla 2.- Determinación de la actividad metabólica a lo largo de 24 hrs. en las plántulas Obtenidas *in vitro*.**

Hr	M	TA	HR	CO <sub>2</sub> o	CO <sub>2</sub> i	Uu	Ppm/g/min	Promedio ppm/g/min
10	1	26.0°C	80.0%	376	389	13	11.2	5.60
	2	26.0°C	80.0%	387	393	6	3.3	
	3	26.1°C	80.0%	636	644	8	2.31	
12	1	26.3°C	80.0%	337	328	9	7.75*	2.86
	2	26.5°C	80.0%	394	395	1	0.55	
	3	26.8°C	80.0%	509	508	1	0.28*	
14	1	26.8°C	80.0%	422	419	3	2.58*	1.23
	2	26.9°C	80.0%	487	488	1	0.55	
	3	27.0°C	80.0%	514	512	2	0.57*	
16	1	26.7°C	80.0%	432	427	5	4.31*	4.31
	2	26.4°C	80.0%	562	562	0	0.0	
	3	26.3°C	80.0%	513	513	0	0.0	
18	1	26.0°C	80.0%	499	510	11	9.48	5.29
	2	26.0°C	80.0%	513	515	2	1.1	
	3	25.9°C	80.0%	551	551	0	0.0	
20	1	25.8°C	80.0%	317	340	23	35.2	23.80
	2	25.7°C	80.0%	514	537	23	2.4	
	3	25.5°C	80.0%	273	301	28	33.8	
22	1	25.3°C	80.0%	306	330	24	36.7	17.61
	2	24.0°C	80.0%	309	405	96	10.1	
	3	24.0°C	80.0%	317	322	5	6.04	
24	1	23.9°C	80.0%	466	465	1	1.5*	0.85
	2	23.9°C	80.0%	626	624	2	0.21*	
	3	23.8°C	80.0%	514	514	0	0.0	
2	1	23.7°C	80.0%	578	579	1	1.5	1.01
	2	23.5°C	80.0%	591	586	5	0.52*	
	3	23.4°C	80.0%	518	518	0	0.0	
4	1	23.5°C	80.0%	577	581	4	6.1	4.25
	2	23.7°C	80.0%	560	560	0	0.0	
	3	23.8°C	80.0%	522	524	2	2.4	
6	1	24.0°C	80.0%	535	533	2	3.06*	2.52
	2	24.3°C	80.0%	583	563	20	2.10*	
	3	24.7°C	80.0%	524	522	2	2.41*	
8	1	25.0°C	80.0%	471	470	1	1.53*	1.48
	2	25.3°C	80.0%	475	470	5	0.52*	
	3	25.7°C	80.0%	464	466	2	2.41	
10	1	25.8°C	80.0%	375	387	12	10.34	5.31
	2	25.9°C	80.0%	388	394	6	3.30	
	3	25.9°C	80.0%	636	644	8	2.31	

**Tabla 3.- Determinación de la actividad metabólica a lo largo de 24 hrs. en las plántulas aclimatizadas.**

Hr	M	TA	HR	CO <sub>2</sub> o	CO <sub>2</sub> i	Uu	Ppm/g/min	Promedio ppm/g/min
10	1	26.0°C	80.0%	36.8	37.7	0.9	0.66	0.39
	2	26.0°C	80.0%	39.0	39.4	0.4	0.067	
	3	26.1°C	80.0%	38.1	40.6	2.5	0.47	
12	1	26.3°C	80.0%	135.6	138.1	2.5	1.85	0.95
	2	26.5°C	80.0%	147.0	150.4	3.4	0.57	
	3	26.8°C	80.0%	158.6	161.0	2.4	0.45	
14	1	26.8°C	80.0%	10.2	10.11	0.09	0.066*	0.13
	2	26.9°C	80.0%	6.0	7.8	1.8	0.30	
	3	27.0°C	80.0%	9.7	9.5	0.2	0.03*	
16	1	26.7°C	80.0%	71.8	72.5	0.7	0.51	0.48
	2	26.4°C	80.0%	79.2	82.5	3.3	0.55	
	3	26.3°C	80.0%	89.3	91.3	2.0	0.38	
18	1	26.0°C	80.0%	584	585.2	1.2	0.88	0.41
	2	26.0°C	80.0%	593.4	594.3	0.9	0.15	
	3	25.9°C	80.0%	588.5	589.7	1.2	0.22	
20	1	25.8°C	80.0%	13.1	13.9	0.8	0.8	0.65
	2	25.7°C	80.0%	15.7	16.3	0.6	0.54	
	3	25.5°C	80.0%	17.9	18.5	0.6	0.62	
22	1	25.3°C	80.0%	21.0	22.4	1.4	1.4	0.97
	2	24.0°C	80.0%	25.3	26.2	0.9	0.81	
	3	24.0°C	80.0%	28.3	29.0	0.7	0.72	
24	1	23.9°C	80.0%	81.2	85.6	4.4	4.4	3.87
	2	23.9°C	80.0%	99.7	103.8	4.1	4.09	
	3	23.8°C	80.0%	112.9	115.9	3.0	3.12	
2	1	23.7°C	80.0%	5.5	5.3	0.2	0.2*	0.71
	2	23.5°C	80.0%	6.5	5.6	0.9	0.8*	
	3	23.4°C	80.0%	5.0	3.9	1.1	1.14*	
4	1	23.5°C	80.0%	28.7	30.8	2.1	2.1	2.14
	2	23.7°C	80.0%	37.8	39.6	1.8	1.63	
	3	23.8°C	80.0%	45.9	48.5	2.6	2.70	
6	1	24.0°C	80.0%	565.3	566.5	1.2	1.2	1.04
	2	24.3°C	80.0%	569.8	570.9	1.1	1.0	
	3	24.7°C	80.0%	573.4	574.3	0.9	0.93	
8	1	25.0°C	80.0%	813.0	828	15.0	15.0	16.59
	2	25.3°C	80.0%	860.3	872.9	12.6	11.45	
	3	25.7°C	80.0%	904.2	926.6	22.4	23.33	
10	1	25.8°C	80.0%	40.8	41.8	1.0	1.0	1.34
	2	25.9°C	80.0%	38.5	39.2	0.7	0.63	
	3	25.9°C	80.0%	38.1	40.4	2.3	2.39	

## LITERATURA CITADA

- ALTESOR, A., Ezcurra E. y Silva C. (1992). Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. *Acta Occol.* 13 (6): 777-785.
- ALVAREZ, A. M. (1997). Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*. México, D. F. 40: 43-58.
- AULT, R. J. y Blackmon J. W. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes*. *HortScience*. 22: 26-27.
- BHAU, S. B. (1999). Regeneration of *Coryphantha elephantidens* from root explants. *Scientia Horticulturae*. 81 (1): 337-344.
- BHOJWANI, S. S. y Dhawan V. (1988). Acclimatization of tissue cultureraised plants for transplantation to the field. Dhawan V. (ed) *Aplication of Biotechnology in forestry and Horticulture*. Pp: 249-256.
- BOLAR, J. P. Norelli, J. L. Aldwinkle, y H. S. Hanke, V. (1998). An efficient method for rotting and acclimation of micropropagated apple cultivars. *HortScience* 37: 1251 -1252.
- BOZZOLA, J. J. y Russell D. L. (1992). *Electron microscopy*. Ed. Junes and Bartlett publishers. London, England. Pp: 542.
- BRAVO-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. (1978). *Las cactáceas de México*. Vol.1. 2ª edición. Universidad Autónoma de México. México, D.F. Pp: 743.
- BRAVO-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. (1991). *Las cactáceas de México*. Vol.3. Universidad Autónoma de México. México, D.F. Pp: 643.
- CEBALLOS, G. (1993) *Especies en peligro de extinción*. *Rev. de Ecología, UNAM*. México, D. F. Número especial de Mayo. Pp: 5-10.
- CLAYTON W. P., Hubstenberger F. J. y Phillips C. G. (1990). Micropropagation of members of the cactaceae Subtribe Cactinae. *J: Amer. Soc. Hort. SCL.* 115 (2): 337-343.
- CONABIO (1997). *Suculentas Mexicanas: cactáceas*. Ed. CVS. México, D. F. Pp: 141.

- CURTIS, H. y Barnes, S. N. (1999). *Invitación a la Biología*. Ed. Panamericana. Madrid, España. Pp: 862.
- DABEKAUSSEN M. A., Pierick R. L., Vander J. D. y Spaans H. (1991). Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Sci. Hort.* 46: 283-294.
- FAY, M. F. y Gratton J. (1992). Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and report on micropropagation at kew. *Bradleya*. 10: 33-48.
- FLORES L. R. y Ortíz M. G. (2000). *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* Pfeiffer through areole activation of etiolated plant. *Haseltonia*. Year book of the cactus and succulents of América. 7: 92-96.
- GARAY, R. B. y Rubluo A. (1992). *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri*. *Cactus and Succulents Journal*. 64: 116-119.
- GIBSON, C. A. y Nobel S. P. (1986). *The cactus primer*. Ed. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. London, England. Pp: 286.
- GLASS, E. CH. (1998). *Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México*. CANTE-CONABIO. México, D. F.
- GROUT, B. W. W y Aston M. J. (1977). Transplanting of cauli flower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17: 1-7.
- HAYASHI, M., Nakayama M. y Kozai T. (1988). An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants and for rooting and acclimatization of the plantlets. *Acta Hort.* 230: 189-194.
- HERNÁNDEZ, M. H. y Godínez A. H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.
- HURTADO, M. D. V. y Merino M. M. (2000). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ed. Trillas. 5ª reimpresión. México, D. F. Pp: 232.
- JOHNSON, J. L. y Emino E. R. (1979). *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience*. 14 (5): 605-606.
- JOHNSON, J. L. y Emino E. R. (1979). Tissue culture propagation in the cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*. 51: 275-277.
- LEÓN, L. J. y Valiente-Banuet A. (1994). Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominantemente mexicano. *Ciencia y desarrollo*. 65: 63-70.

- MALDA, G., Backhaus A. R., y Martín C. (1999). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 58: 1-9.
- MALDA, G., Backhaus A. R., y Suzán H. (1999). In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism (CAM). *Scientia Horticulturae*. 81: 71-87.
- MAUSETH, D. J. y Halperin W. (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha*. *American Journal of Botany*. 62 (8): 869-877.
- MAUSETH, D. J. (1976). Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha*. *American Journal of Botany*. 63 (10): 1295-1301.
- MAUSETH, D. J. (1977). Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cactus & Succulent Journal*. U.S.A. 49: 80-81.
- MIZRAHI, Y., Nerd A. y Nobel S. P. (1997). Cacti as Crops. *Horticultural Reviews*. 18: 292-319.
- NOBEL, S. P. (1998). Los Incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México, D. F. Pp: 211.
- PEREZ, M. E., Reyes P. M., Amador V. E., Rangel M. E., Ruiz M. L. y Viramontes L. H. (1998). Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *Society for in vitro Biology*. 34: 131-135.
- PIERIK, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. Pp: 325.
- RIHA, J. y Subik R. (1991). Enciclopedia de los cactus: cactus y otras plantas suculentas. Ed. Susaeta. Madrid, España. Pp: 351.
- RUBLUO, A., Chavez V., Martínez A. P. y Martínez-Vazquez O. (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological conservation*. 63: 163-169.
- RZEDOWSKI, J. (1981). Vegetación de México. Ed. Limusa. México, D. F. Pp: 432.
- SALISBURY, F. y Ross C. (1994). Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana. México, D. F. Pp: 759.

- SÁNCHEZ-Mejorada, R. (1982). Some prehispanic uses of cacti among the indians of Mexico. Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Dirección de Recursos Naturales. México, D. F. Pp: 41.
- SÁNCHEZ, M. E. (1993). Avances en la propagación *in vitro* de cactáceas. ITESM, Querétaro. México. Pp: 37.
- SCHEINVAR, L. y Bravo H. (1995). El interesante mundo de las Cactáceas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. Pp:233.
- SCHEINVAR, L. (1999). *Opuntia zamudioi*, una nueva especie del Estado de Querétaro. Rev. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Ed. Soc. Mex. de Cactología, D.F. Octubre-diciembre. 4: 88-93.
- SKOOG, F. y Miller C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- TING, P. y Rayder L. (1985). Regulation of C3 to CAM shifts in: Crassulacean Acid Metabolism Proceedings of the 5<sup>th</sup> Annual Symposium in Botany. Waverly Press. California. Pp: 193-209.
- TOLEDO, V. M. (1988). La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. México, D. F. 8: 7-16.
- VYSKOT B. B y Jara Z. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 59 (3): 449-452.
- WETZSTEIN, H. Y. y Sommer H. E. (1983). Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. Soc. Hort. Sci. 108: 475-480.