



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

MICROPROPAGACION DE *Mammillaria* spp.

295885

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A
ERNESTO GONZALEZ RODRIGUEZ

ASESOR: M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Micropropagación de Mammillaria con

que presenta al pasante: Ernesto González Rodríguez
 con número de cuenta: 9024072-4 para obtener el título de :
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de Julio de 2001

- | | | |
|------------------|---------------------------------------|--|
| PRESIDENTE | <u>Biol. Elva Martínez Olguín</u> | |
| VOCAL | <u>M.en C. Francisco Cruz Pizarro</u> | |
| SECRETARIO | <u>Ing. Aurelio Valdez López</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>Ing. Javier Carrillo Salazar</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>M.en C. Juan Roberto Guerrero</u> | |

GRACIAS.

A DIOS.

POR PERMITIRME ESTE LOGRO.

A LA UNAM.

LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS.

A LOS PROFESORES:

M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO.

M.C. J. ROBERTO GUERRERO AGAMA.

QUE ME APOYARON DURANTE EL SEGUIMIENTO DE LA TESIS Y
COMPARTIERON SU EXPERIENCIA Y CONOCIMIENTO.

Y A LOS PROFESORES DE LA CARRERA DE INGENIERIA AGRÍCOLA
QUE ME BRINDARON SU APOYO Y PRINCIPALMENTE SU CONOCIMIENTO.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES.

MARGARITA RODRÍGUEZ R. y TIMOTEO GONZÁLEZ Ch.

POR SU AMOR, CARIÑO Y COMPRENSIÓN EN TODO TIEMPO. LOS AMO.

A MIS HERMANOS.

ROSA, SILVIA, PATRICIA, MONICA, LETICIA, RAFAEL.

POR SU APOYO Y GRAN UNION QUE HAN MANTENIDO.

A MIS SOBRINOS.

JOSE JUAN, ETRHUZ, MIGUEL, LUIS ÁNGEL, AFRICA, AURORA
ALEJANDRA, PAMELA.

MI AMOR Y MI APOYO POR SIEMPRE.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

PAULINO, RUTH, ADRIANA TOVAR T., MONICA, ABEL, ANGELES, EDUARDO
SÁNCHEZ, MINERVA, IGNACIO, ISAAC Gtz., CARLOS ESPINOZA, LADISLAO,
FRANCISCO FLORES, VICTORIA DIAS, TOMAS , BELLO Hdz., KENIA ,
EMMMA.

DEDICADA

ESPECIALMENTE PARA:

ROSSE MARY

GRACIAS POR PERMITIRME SER LA PERSONA QUE SIEMPRE HAS

CONOCIDO Y TERMINAR ALGO DE LO QUE SIEMPRE QUISE SER.

LIBRE.

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE CUADROS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| RESUMEN | iii |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Objetivos..... | 3 |
| Hipótesis | 4 |
| II. REVISIÓN DE LA LITERATURA | 5 |
| Importancia de las cactáceas | 5 |
| Descripción. | 5 |
| Morfología. | 6 |
| Raíz. | 6 |
| Vástagos. | 7 |
| Hojas. | 7 |
| Costillas. | 7 |
| Tubérculos. | 9 |
| Areolas. | 10 |
| Espinass. | 10 |
| Tallo. | 11 |
| Flor. | 12 |
| Fruto. | 12 |
| Taxonomía. | 14 |
| III. ANTECEDENTES DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DE CACTÁCEAS..... | 15 |

| | | |
|-------|---|----|
| | Hormonas en el cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas. | 15 |
| | Agentes gelificantes en el cultivo <i>in vitro</i> | 20 |
| | Otras especies de interés económico. | 23 |
| IV. | MÉTODOS DE PROPAGACIÓN..... | 27 |
| | Reproducción sexual ó por semilla..... | 27 |
| | Multiplicación asexual. | 27 |
| V. | METODOLOGIA EMPLEADA EN MICROPROPAGACIÓN..... | 28 |
| | Medio de cultivo. | 31 |
| VI. | VITRIFICACIÓN. | 31 |
| | Causas de la vitrificación. | 32 |
| | Posible control de la vitrificación. | 32 |
| VII. | HORMONAS. | 33 |
| | Auxinas. | 33 |
| | Citocininas. | 34 |
| | Giberelinas. | 35 |
| | Etileno. | 36 |
| | Ácido abscísico. | 36 |
| VIII. | MATERIALES Y MÉTODOS. | 37 |
| | Material biológico. | 37 |
| | Medio de cultivo. | 37 |
| | Condiciones de incubación. | 38 |
| | Diseño experimental. | 38 |
| | VARIABLES DE EVALUADAS. | 39 |
| | Observaciones anatómicas..... | 41 |

| | | |
|-----|---|----|
| IX. | RESULTADOS Y DISCUSION. | 43 |
| | Variable número de brotes..... | 43 |
| | Variable longitud de brotes..... | 47 |
| | Disponibilidad de agua en el medio..... | 50 |
| | Plantas provenientes de campo..... | 54 |
| | Plantas provenientes de cultivo <i>in vitro</i> | 55 |
| X. | CONCLUSIONES. | 58 |
| | LITERATURA CITADA. | 60 |
| | ANEXOS. | 67 |

INDICE DE CUADROS

| CUADRO. | Página. |
|---|---------|
| 1. Tratamientos empleados en la micropropagación de <i>Mammillaria</i> sp. | 39 |
| 2. Comparacion de medias para las variables número y longitud brotes de <i>Mammillaria</i> sp. | 52 |
| 3. Disponibilidad de agua en el medio de cultivo..... | 52 |
| 4. Impurezas en los tipos de agar empleados en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria</i> sp. | 53 |

INDICE DE FIGURAS.

| FIGURA | PÁGINA |
|--|--------|
| 1 Promedio de número de brotes en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria</i> sp. | 56 |
| 2 Promedio de longitud de brotes en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria</i> sp. | 56 |
| Cortes anatómicos de <i>Mammillaria</i> sp. | |
| 3 Corte transversal de aréola <i>in vitro</i> | 57 |
| 4 Corte transversal de aréola en campo..... | 57 |
| 5 Corte transversal de tubérculo de tallo en campo..... | 57 |
| 6 Corte transversal de tubérculo <i>in vitro</i> | 57 |
| 7 Corte transversal de callo basal <i>in vitro</i> | 57 |
| 8 Corte transversal de haz vascular en campo..... | 57 |
| 9 Corte longitudinal de meristemo en campo..... | 57 |
| 0 Corte transversal de estoma en campo..... | 57 |
| 1 Corte transversal de estoma <i>in vitro</i> | 57 |

RESUMEN

En la micropropagación existen variaciones anatómicas y morfológicas que alteran el comportamiento del tejido vegetal empleado en esta técnica, lo anterior ha estado relacionado entre otros factores como el aporte nutrimental en el medio, las fuentes de carbohidratos, la concentración del agente gelificante, siendo este último el de interés en esta investigación para la cual se establecen los siguientes objetivos: Desarrollar la metodología para micropropagación de *Mammillaria* sp, además de identificar posibles cambios morfológicos y anatómicos de la planta, evaluar la influencia del tipo y concentración de agar que presenten el desarrollo de brotes de *Mammillaria* sp.

Se utilizaron brotes de *Mammillaria* sp. obtenidos del cultivo de ápices en el medio Cruz-Pizarro (2000) se modificaron las concentraciones de agar utilizando diferentes tipos (Bioxon y Sigma en 3.6, 5.4, 7.2 gL⁻¹ y Phytigel y Gelrite en 1.125, 2.250, 3.750 gL⁻¹). Resultando para la variable número de brotes con el agente gelificante Bioxon un promedio de 14.82, que mantuvo un incremento conforme aumentaba la concentración, seguido de Sigma con 30 % y Gelrite con 28 %, mientras que Phytigel se mantuvo 100 % por debajo de Bioxon con 7.2 brotes, atribuyendo esto a algunos factores como firmeza del gel, disponibilidad de

agua y pureza. Se encontraron diferencias anatómicas en el cultivo de tejido *in vitro* y en campo muy significativas, principalmente en la capacidad de almacenamiento al presentar un gran desarrollo en la parte areolar, el número de espinas en plantas cultivadas *in vitro* fue superior a las provenientes de campo, en tanto que la cutícula se presenta continua en la pared periclinal externa incluyendo la cámara sub-estomática en cortes anatómicos del tejido empleado.

I. INTRODUCCIÓN.

México cuenta con una amplia diversidad biológica debido a su localización geográfica y a las barreras orográficas que permiten contar con climas que van desde el tropical subhúmedo en la parte del barlovento hasta el clima árido seco en la parte del sotavento, siendo este último uno de los principales factores por lo cual, en la mayor parte del territorio mexicano se encuentra vegetación crasicaule misma que presenta gran diversidad de formas, vistosidad y colorido. Siendo en estas zonas, en las que se encuentran la mayoría de las especies de la familia Cactaceae con que cuenta el país. Por mucho tiempo, estas especies han sido saqueadas lo que ha perturbado el entorno, provocando la erosión, al realizar apertura de tierras que se han incorporado al cultivo de otras especies que en la mayoría de las ocasiones no permiten al productor mantener una fuente de ingresos para su subsistencia teniendo que tomar alternativas complementarias como lo son: recolección y venta que en los mercados; alcanzan un precio muy elevado.

Esto ha despertado interés en la investigación que permita desarrollar, de una manera rápida, la recuperación de estas especies en las zonas que han sido afectadas e incrementar los volúmenes de individuos, para su venta.

La micropropagación, es una técnica que se ha utilizado principalmente para la obtención de especies de interés económico, como lo son las hortalizas, especies arbóreas y florícolas. En la actualidad también se ha implementado para la propagación de especies en peligro de extinción, (Nom-Ecol-059-1994), Esta técnica de propagación permite el desarrollo de plantulas libres de enfermedades que se pueden adaptar a las condiciones del medio ambiente.

En México se han reportado trabajos en los cuales se implementa esta técnica para el desarrollo de especies libres de enfermedades y en algunos casos con resistencia a las mismas. En lo que respecta a las especies en peligro de extinción, se han trabajado en mayor proporción en especies de la familia Cactaceae, siendo propagadas en condiciones asépticas con la técnica de germinación de semillas, y por secciones de tejido como raíz, tallo, areolas y embriones. Aunque en mayor número, se encuentra en la micropropagación; por activación de areolas.

El objetivo general de la presente investigación es: Establecer la metodología para la micropropagación de *Mammillaria* spp; para lo cual se utilizaron cuatro tipos de agar en tres concentraciones e integrando observaciones anatómicas de raíz, tallo y callo morfogénico.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer la metodología para la micropropagación de Mammillaria spp.

Objetivos particulares

- Determinar el tipo y concentración de agar que proporcione el mejor desarrollo de brotes de la micropropagación de la especie.
- Evaluar algunas propiedades físicas de los diferentes tipos de agar en la micropropagación de la especie.
- Identificar posibles cambios morfológicos y anatómicos de las plantas

Hipótesis

1. El agente gelificante puede determinar el desarrollo de los explantes cultivados *in vitro* afectando los procesos de proliferación y longitud de brotes, entre otros aspectos.
2. La concentración del agente gelificante puede limitar el desarrollo de los explantes *in vitro*.
3. La anatomía de las plantas cultivadas *in vitro* pueden tener una expresión diferente de las cultivadas en campo.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Importancia de las Cactáceas

La vegetación de México es muy diversa, siendo su flora muy importante por la abundancia de organismos. Una de las familias más importantes son las cactáceas Rzedowski (1991), la cual a nivel nacional es considerada como la quinta más importante por el número de especies, albergando en el territorio 822 especies Hund (1999).

Los miembros de esta familia se han utilizado desde tiempos prehispánicos con fines medicinales y propósitos religiosos, como alimento, plantas de ornato y como forraje. Bravo - Holis, (1937,1995); Alvarez (2000); Franco (1997), reporta 257 especies cuya supervivencia permanece en riesgo, 24 en peligro de extinción, 96 amenazadas, 135 raras, y dos sujetos a protección especial (Nom-Ecol-059-1994).

Descripción.

El género *Mammillaria*, llamado comúnmente biznaga, presenta las características siguientes: mamelones cónicos piramidales, espinosa con tallo globoso de tres a cinco centímetros de diámetro, presenta axilas desnudas o con algunas cerdas largas y blancas, sus aréolas son ovaladas o circulares.

Las espinas radiales poseen de 6 a 20 mm de longitud, cespitosas, finas y suaves, sus flores están dispuestas cerca del ápice de la planta, de 13 a 22 mm de longitud, verde hacia la base; la flor con el borde de color crema hasta amarillo verdoso; sus frutos son claviformes, generalmente son comestibles y reciben el nombre de chilillos, los cuales tienen una longitud de 15 mm por 3 mm de diámetro; sus semillas son de 1 mm de longitud y de 0.6 mm de espesor; son de color café rojizo, reticuladas o corrugadas. Bravo-Holís (1937,1978).

Morfología

Raíz.

Es semejante a la de otras dicotiledoneas. La raíz principal constituye el sistema de fijación, pues se introduce verticalmente en el suelo y su desarrollo es proporcional al tamaño y a la fuerza de tracción del vegetal, las raíces secundarias intervienen particularmente en la absorción pues la longitud que alcanzan, la profundidad a la que llegan y el grado de ramificación que adquieren están en relación con el factor humedad y con las demás características del suelo. Cannon, 1913 (Citado por Bravo-Holís, 1978) reporta la existencia de tres tipos de raíces 1) cuando la raíz principal adquiere mayor desarrollo que las secundarias; 2) cuando las raíces secundarias crecen más que la principal. 3) cuando la raíz principal y las secundarias alcanzan aproximadamente el mismo desarrollo.

Vástago.

La mayoría de las especies presentan modificación de este órgano en forma de espina el vástago Consta de tallo, hojas tectrices y yemas, estos órganos están solo desarrollados en los géneros primitivos *Pereskia*, *Pereskiosis* y *Quiabentia*

Hoja.

En *Mammillaria* las hojas se encuentran modificadas en forma de espinas; las hojas bien diferenciadas solo se encuentran en los géneros primitivos: *Pereskia*, *Pereskiosis* y *Quiabentia*, en los que el limbo es grueso, carnoso, y de forma orbicular o elíptica, pudiendo distinguirse algunas nervaduras pennadas o más o menos palmeadas, a veces puede persistir transformado en espina cuando los tejidos se esclarifican. Bravo-Holis (1978).

Costillas.

Las costillas provienen de los podarios de la yema apical de la plántula que se ordenan en series ortósticas verticales; el número de costillas va aumentando con la edad, por lo que el tallo, en su ápice, presenta un mayor número de costillas que en la base. La forma también varía, desde angostas con arista aguda hasta anchas y de aristas redondas, altas y muy prominentes o aplanadas; las costillas rectas pueden tomarse espiraladas.

En algunas especies de la tribu Echinocereeae los tallos son cortos, suaves y por lo común cilíndricos, erectos, postrados o pendulosos, y los de la especie de la tribu *Echinocactae*, son casi siempre globosos, pero con frecuencia al crecer se vuelven cilíndricos (Bravo-Holís 1978).

El sistema tegumentario está constituido por los tejidos epidérmicos y peridérmico. La membrana de las células epidérmicas que se encuentran en contacto con el medio externo, se halla revestida de una gruesa película de cutina que impide la evaporación del agua y proporciona resistencia a las células; por excreción se deposita algunas veces un revestimiento ceroso en forma de escamas diminutas o de gránulos muy finos; debajo del sistema tegumentario está el tejido colenquimatoso que da consistencia y solidez al tallo; seguido de este, se encuentra el parenquima en empalizada o clorofiliano, semejante al de las hojas, pues está formado por varias capas de células prismáticas, grandes y alargadas, de paredes delgadas y con abundantes cloroplastos este tejido es muy importante porque en él se efectúa la fotosíntesis. Debajo de él se encuentra el parénquima colector que forma una zona bastante amplia, con células grandes, esferoidales y turgentes; a la gran cantidad de agua y diversos polisacáridos que almacena este tejido se deben las formas suculentas de las cactáceas. Los haces vasculares constituyen cuerdas gruesas y largas, se integran especialmente en la base del tallo y en la raíz en forma de un cilindro grueso y compacto. De estos haces salen paquetes vasculares hacia la corteza, que terminan en él parenquima o en los tejidos indiferenciados de las areolas.

La parte central del tallo está ocupada por la médula, tejido que forma una columna central cuyo diámetro varía con la edad y con las características de los distintos géneros. En algunas especies del género *Mammillaria* hay un sistema de vasos laticíferos de origen lisígeno que se ramifican en la corteza y en la médula a veces anastomosándose y el látex que contiene es una emulsión que se endurece cuando queda expuesta al aire.

Tubérculos (podarios).

EL meristemo de la yema cotiledonar apical forma los podarios o tubérculos durante el desarrollo de la planta base hipertrofiada de las hojas presentándose así en las plantas ya desarrolladas; los tubérculos más viejos se presentan en la base del tallo, en tanto que los recién formados están en el ápice. La forma, el tamaño y la consistencia de los tubérculos son variables; los hay esféricos, digitiformes, foliares, triangulares, cónicos ó prismáticos y en ocasiones muy pequeñas como en el caso de algunas especies de *Mammillaria*. En la parte superior de estos órganos se encuentran las aréolas.

Areolas.

Las aréolas son los órganos más característicos de las cactáceas, se les considera como yemas homólogas a las yemas axilares de las otras dicotiledóneas, las cuales también forman hojas reducidas, flores, nuevos tallos, y además espinas, glóquidas, cerdas y pelos y a veces, raíces adventicias. En casi todas las especies de cactáceas existe al centro de las aréolas, un meristemo de crecimiento integrado por dos porciones, la abaxial o externa que forma las espinas y la adaxial, que origina las flores.

Espinas.

Las espinas se forman a expensas de los tejidos meristemáticos de las aréolas, 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. En una aréola puede haber desde una hasta alrededor de 100 espinas. En cada aréola se aprecian por lo común dos tipos de espinas; las radiales más cortas y delgadas, dispuestas en la periferia y las centrales que son más largas y gruesas (Bravo-Holis 1937) Entre las espinas defensivas, están comprendidas las glóquidas, pequeñas, rígidas y, por lo común, muy numerosas. En el grupo de las espinas suaves se consideran las cerdas largas y rígidas, semejantes a las crines, pelos largos y más o menos sedosos.

Tallo.

Los tallos de las cactáceas tienen formas muy diversas, pero constantes, para cada entidad taxonómica, hasta la forma reducidas a un artículo globoso como las especies del género *Mammillaria*, considerado como el más evolucionado. En general son ramificados, o bien reducidos a una sola rama o artículo. y su altura, consistencia, tipo de ramificación y hábito ecológico son muy variables. Las especies del género *Pereskia* son arborescentes, arbustivas o trepadoras. Las primeras poseen un tronco bien definido, de donde salen ramas de primer orden que, a su vez, se ramifican hasta formar una copa muy amplia.

En el género *Cylindropuntia*, las especies tienen tallos arbustivos y generalmente poseen un tronco del que parten ramas cilíndricas o artículos provistos de series espiraladas de tubérculos, que casi se tocan entre sí por el acortamiento de los entrenudos (Bravo-Holis 1978).

En el subgénero *Opuntia* las especies son arbustivas si están provistas de un tronco bien definido, o rastreras si carecen de éste, el tronco es más o menos cilíndrico, pero las ramas a que da origen son aplanadas y discoides en forma de raqueta (cladodio). Las cactáceas de hábito epífita, que viven en las selvas tropicales húmedas y en los encinales, tienen tallos colgantes, en forma de cladodios (Bravo-Holis 1978).

Flor.

La estructura de la flor presenta caracteres típicos anatómicos, determinados posiblemente por adaptación al medio seco y por las diversas modalidades de la polinización zoófila. Se pueden apreciar dos tipos de órganos: los de origen axial, como las zonas pedicelar, el hipanto, o pericarpelo y el tubo receptacular, y los verticilos florales que constituyen el androceo y el gineceo. Por su organización de origen axial pueden desarrollar, en ocasiones, nuevos brotes.

En *Mammillaria*, el tubo receptacular está formado también por dos partes, de las cuales la inferior es receptacular y la superior parietal. El tubo parietal se distingue por su carencia de estambres (Bravo-Holis 1978).

Fruto.

En *Mammillaria*, género recientemente evolucionado, se presenta un fruto baya (chilito), en donde las aréolas han desaparecido, a veces presentando por atavismos, una o dos aréolas diminutas; el pericarpo está integrado por las paredes muy delgadas del ovario y por el pericarpelo. Cuando madura, sus paredes se engruesan, los podarios se hacen imperceptibles por la turgencia de los tejidos y la superficie se vuelve colorida, adquiriendo diversos matices del amarillo, anaranjado, rojo o púrpura, esta coloración tiene gran importancia para dispersar sus semillas ya que las aves las comen (Bravo-Holis 1978, 1995)

Semilla.

Las semillas de las cactáceas presentan variaciones en la forma, tamaño, estructura y color de la testa y en las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas. Las semillas están cubiertas por la testa, que procede de los dos tegumentos de los rudimentos seminales. Cada tegumento consiste de dos capas de células que aumentan en la región micropilar. El tegumento interno deja una pequeña abertura, que es el micrópilo, el extremo es más corto, no llega al micrópilo y sus células contienen abundantes taninos oscuros. La testa varía en color, resistencia y ornamentación y sus colores más frecuentes son el castaño, anaranjado, café y negro. La testa en *Mammillaria* se presenta corrugada o reticulada (Bravo-Holis 1978).

TAXONOMIA

La taxonomía del género *mammillaria* según Bravo Hollis (1995), es la siguiente:

| | |
|------------|----------------|
| Reino | Vegetal |
| Subreino | Embriofita |
| División | Traqueofita |
| Clase | Angiospermae |
| Subclase | Dicotiledoneae |
| Orden | Cactales |
| Familia | Cactaceae |
| Subfamilia | Cariodeae |
| Tribu | Cactinae |
| Subtribu | Cactinae |
| Genero | Mammillaria |
| Subgénero | Chilita |
| Serie | Lasiacanthae |

III. ANTECEDENTES DEL CULTIVO *in vitro* DE CACTÁCEAS

En la micropropagación de cactáceas se han realizado diferentes trabajos con diversos objetivos entre los que se encuentran variables como la respuesta hormonal, tipos de explantes, tipos y concentraciones de agar, respuesta a las condiciones de temperatura, humedad, fotoperíodo, pH, potencial mátrico y métodos de esterilización; A continuación se presentan algunos aspectos relevantes.

Hormonas en el cultivo *in vitro* de cactáceas

Sanderson et al. (1986) realizaron estudios sobre la respuesta al fotoperíodo y los reguladores de crecimiento BA 100 ppm y GA 200 ppm, BA-GA 50 -100 ppm. en *Mammillaria elongata*, *Chamaecereus silvestri* y *Opuntia microdasys*. por lo cual reportaron que para *Mammillaria* y *Chamaecereus* en fotoperíodo largo produjeron una considerable brotación de 21.6 unidades, mientras que GA+BA redujo el número de brotes en un 50 %. En *Chamaecereus* y *Opuntia* se produjo un mayor número de brotes en fotoperíodo largo y un mínimo crecimiento en la planta. Para *Opuntia* se obtuvo un mayor peso seco con 3.2 gr en fotoperíodo largo mientras que *Mammillaria* y *Chamaecereus* presentaron en fotoperíodo corto un mayor peso con 2.3 y 2.4 gr. respectivamente.

Ault et al. (1987) realizaron propagación de *Ferocactus acanthodes in vitro*. El medio utilizado fue MS, suplementados con 9 gr L⁻¹ de agar, KIN 46.5 mM, ANA 5.4 mM, y Adenina 0.2 mM. Encontraron que en cinco subcultivos se obtuvo proliferación de brotes y brotes con raíz. Reportan que el último subcultivo se realizó sin hormonas y se transfirieron al sustrato en condiciones de invernadero hasta su adaptación en el exterior.

Robert et al. (1987) evaluó la respuesta de NO₃⁻ y NH₄⁺ en *Agave fourcroydes* Lem. Emplearon el medio MS, con la adición de 2-4-D, AIA, AIB ó ANA en concentraciones de 0.0, 0.025, 0.25 y 2.5 mg L⁻¹ BA y KIN en concentraciones 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 mg L⁻¹, obtuvieron en altas concentraciones de KIN, la formación de brotes adventicios y éstos, al ser subcultivados, formaron nuevamente callo en su base formando nuevos brotes con un 90 % de supervivencia. El balance de NO₃⁻ y NH₄⁺ en el medio es un factor muy importante para controlar la formación de callo, organogénesis y cultivo de explantes. Los brotes de tejido del explante y callo del rizoma forman extensas raíces *in vitro* y fueron transferidas en sustrato con un 90 % de supervivencia.

Mandujano (1988) reportó la utilización de micropropagación con el fin de determinar el metabolismo ácido de las crasuláceas en las especies *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* para lo cual utilizó el medio MS Por medio de la activación de aréolas implementando citocininas en concentraciones de ANA. 0.0, 0.1, 0.5, y 1.0 mg L⁻¹. Y KIN. 0.0, 0.5, 1.0, 5.0, y 10.0 mg L⁻¹. Obtuvo en la concentración hormonal de 5.0 mg L⁻¹ de KIN. Y 0.1 mg

L^{-1} de ANA, que fue la adecuada para la propagación de estas especies, presentando brotación a los 25 días de cultivo.

Rodríguez-Garay et al. (1992) realizaron en *Aztekium ritteri* un estudio para evaluar la respuesta morfogénica de la especie con secciones del explante, incluyendo algunas costillas divididas en secciones basal y axial; el medio empleado fue MS, adicionado con BA 0.1 mg L^{-1} y BA + ANA 1.0 mg L^{-1} , 0.01 mg L^{-1} , respectivamente, obteniendo para los explantes producción de lana como cabello, estructuras como embriones y en algunos casos producción de una masa basal: en los cortes de costilla basal y axial no se presentó ningún cambio y murieron.

De Oliveira et al. (1995) realizaron investigaciones en semillas de *Cereus peruvianus* Mill, como un recurso para obtener tejido del explante resultante y determinar la efectividad para su inducción al mantenerlo como callo para su rápido crecimiento. El medio fue MS, en combinación factorial de 2-4-D y KIN, concluyendo que la concentración de 18.1 mM de 2-4-D y 18.6 ó 27.9 mM de KIN, fueron las óptimas para la inducción de callo, y se obtuvieron brotes en 13.9 ± 6.5 obteniendo alargamiento en las dos siguientes semanas de incubación, En el medio con 2-4-D con 18.6 mM de KIN, se obtuvieron brotes en 17.3 ± 7.9 por lo cual concluyen que esta metodología es recomendable para obtener individuos de esta especie con rapidez y en la cantidad deseada.

Machado et al. (1996) realizaron la micropropagación de *Cereus peruvianus* Mill. por activación de aréolas de explante apical y lateral, para lo cual utilizaron el medio MS en combinación factorial de Auxinas AIA, ANA, BA, y KIN, en concentraciones de 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 mg L⁻¹, presentando respuesta positiva para los explantes laterales en todas las combinaciones de prueba, mientras que para el explante apical no hubo respuesta en multiplicación *in vitro*. La formación de brotes axilares se presentó en el medio conteniendo BA en 1.0 mg L⁻¹ y IAA ó NAA en 1.0 mg L⁻¹.

Marín-Hernández et al. (1998) realizaron investigación en *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada, para lo cual utilizaron óvulos florales en anthesis, cultivadas en medio sólido Gamborg (B5), suplementado con 2-4-D(4 mg L⁻¹) más KIN (2 mg L⁻¹), donde obtuvieron la formación de callo en el integumento del óvulo durante los primeros tres meses de cultivo, observando los primeros periodos de embriogénesis somática, mientras que el análisis histológico demostró en la pared unicelular y multicelular la formación de estructuras pre - embrionarias y en la cual observaron que la presencia de fenoles afectó la etapa de embriogénesis somática.

Anicua et al. (2000) evaluaron los efectos de citocininas BA y KIN en concentraciones de 0.5, 1.0, 5.0, y 10.0 mg L⁻¹ en micropropagación para tres Especies de cactáceas: *Mammillaria bocasana*, *M. carmenae*, y *Echinocactus grasonii*, para lo cual utilizó el medio MS. El primer resultado fue la formación de callo a los 20 días de cultivo en *M. bocasana* en concentración de citocininas con KIN. 5.0 mg L⁻¹ BA. 5.0 y 10.0 mg L⁻¹, mientras que en los demás tratamientos se presento la formación de callo a los 25 días. *M. carmenae* presentó brotación y formación de callo basal a los 18 días de cultivo, solo que en concentraciones de citocininas con KIN. 1.0, y 10.0 mg L⁻¹, y BA. 5.0 y 1.0 mg L⁻¹ presentó un crecimiento rápido; mientras que para *Echinocactus grasonii* los primeros signos de morfogénesis se presentaron a los 25 días de cultivo con la formación de callo, pero sin presentar diferenciación alguna.

Flores (2000) con el fin de comparar la respuesta de plantas etioladas y no etioladas en *Cephalocereus cenilis* (Haworth) Pfeiffer, utilizó el medio MS (Murashige y Skoog. 1962) en concentraciones de BA, en 0.0, 0.1, 1.0. y 10 % adicionando 0.7% de agar. Las plantas no etioladas (en permanencia con luz natural) se tornaron de color café y murieron registrando esta respuesta en todos los tratamientos, mientras que las plantas etioladas a los dos días de cultivadas presentaron respuesta con un total de 63, 70, 50y 35 %. después de 44 semanas de cultivo en tejido diferenciado y activación de aréolas.

Agentes gelificantes en el cultivo *in vitro* de cactáceas

Debergh P.C. (1983) evaluó los efectos de agar y el medio MS, de tejidos de *Cynara scolimus* L. lo cual dio como resultado una disminución en la vitrificación al incrementar la concentración de agar, aunque en agar Difco bacto en concentraciones de 8-15 gr L⁻¹ la disponibilidad de citocinina disminuye por lo cual citocinina bajo condiciones de inducción y en concentraciones bajas de agar o alto potencial mátrico fue responsable de la vitrificación siendo las impurezas del gel inducidas por el agar, las responsables de una significativa diferencia en la concentración de los elementos del medio en diferentes concentraciones de agar. Al incrementar la concentración de agar se presentan diferencias en la rigidez del medio no solo en los tipos de agar sino en la concentración con diferentes marcas.

Dabekaussen et al. (1991) estudiaron los factores *in vitro* para la activación de aréolas en *Sulcorebutia alba*, para lo cual utilizaron concentraciones de sacarosa de 1 a 6%, y manitol en concentraciones de 0.0, 8.1, 16.3, 24.4, y 32.5 g L⁻¹, obteniendo que la concentración de sacarosa 2.5% dio el mejor resultado, mientras que el manitol en concentración de 32.5 g L⁻¹, redujo el número de plantas anormales y además redujo el peso seco y fresco de los tejidos normales a medida que el potencial osmótico disminuía. tomando como desventaja el uso de manitol en el medio de cultivo.

Brand (1993) evaluó la influencia del agar y nitrato de amonio en cultivo *in vitro* de *Amelanchier arborea*, para lo cual utilizó el medio MS y WPM en adición de BA 4.4 mM y agar 0.4, 0.6, 0.8 %. Dando como respuesta una disminución de hiperhidricidad en el cultivo y el incremento de nitrato en el tejido, al incorporar NH_4^+ al medio WPM en concentración de 0.4 %, el cual resultó ser el óptimo en el registro de las variables evaluadas.

Wetzstein et al. (1994) determinaron los efectos del proceso de esterilización, agente gelificante, firmeza con relación al pH y sales minerales, para lo cual utilizaron los medios MS: Woody Plant Medium (WPM) y Gamborg (B5) y los tipos de agar Phytigel en 0.8 %, Bacto Agar en 0.8 % y gel-gro en 0.4 % los cuales dieron como resultado que la firmeza del gel se vio afectada por el agente gelificante y medio basal; el medio MS se comportó con poca firmeza que en comparación con WPM y Gamborg (B5), el volumen del medio durante el proceso de esterilización en un tiempo de 40 minutos disminuyó, provocando en contraste que la firmeza del gelificante disminuyera significativamente con phytigel y bacto agar. mientras que gel-gro presentó gran firmeza gelificante y un volumen intermedio en el proceso de esterilización en tanto el pH disminuye en 0.2 a 0.5 unidades, relacionando esta disminución a la poca firmeza del gel.

Nairn et al. (1995) señalan la identificación de un constituyente responsable del posible control hídrico en la micropropagación de *Pinus radiata*, señalando que el término agar es usado para describir polisacáridos que pueden adquirir la estructura de un gel, ocurriendo de manera natural en ciertas algas, particularmente en las especies de *Gellidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, siendo la agarosa la forma pura, identificando un constituyente del agar, como un tipo de agaroido xilogalactano con constituyentes de piruvato y sulfato, el cual es soluble en agua y evita la presencia de plantas vitrificadas, el cual ocasiona que una menor cantidad de agua del gel sea liberada ($1045 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$) para el caso de agar Difco Bacto, en comparación con gelrite ($1396 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$) y con la agarosa tipo V ($2280 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$).

Urbina (1996) al analizar el efecto de tres agentes gelificantes en tres concentraciones cada uno en el cultivo *in vitro* de brotes de vid, en condiciones homogéneas tanto nutrimentales como de hormonas, reportó que la longitud de y calidad del brote se ve afectada por la concentración del gel, de tal forma que la longitud del mismo se incrementó conforme disminuyó la concentración del agente gelificante, con similar respuesta al utilizar gelificantes con mayor pureza; sin embargo, el inconveniente de estos tratamientos fue la presencia de vitrificación, la cual se presentó en una mayor proporción en los tratamientos donde se combinaron menor concentración con mayor pureza del gelificante, además encontró una correlación de 0.709 entre la longitud del brote y el potencial osmótico del medio, que mostró una tendencia a disminuir al incrementar la concentración de agar.

Otras especies de interés económico

Singha (1984) con el fin de determinar la influencia de dos marcas comerciales de agar en proliferación de manzano cv. Almey, y peral cv. Seckel. utilizó el medio MS, conteniendo BA. 2 mg L^{-1} y TC Agar y Bacto Agar en concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 0.9, y 1.2 %. obteniendo la mejor brotación en manzano en la concentración de 0.3 % en los tipos de agar, y al incrementar la concentración de agar se redujo la proliferación y brotes de crecimiento. mientras que en proliferación de brotes entre la concentración 0.3 % y 0.6 % de agar se presentó una diferencia en Bacto Agar pero no con TC Agar.

Lee et al (1986) compararon los efectos de brotes adventicios de *Liquidambar styraciflua* L. con medio líquido y agar en secciones de hipocotilo cultivados con agar en un medio modificado (Risser y White's) con 5.7 mM de AIA, y 25 mM 2iP en un medio líquido modificado (Blayde's) con 54 mM ANA, y 2.2 mM, obteniendo altos porcentajes (94 %) de formación de raíz en el medio líquido. mientras que en el medio solidificado con agar fue 46 % menor en las primeras seis semanas. el 95 % del tejido en medio líquido presentó raíces a las 10 semanas de cultivo, en comparación con 58 % en medio con agar.

Pâques y Boxus (1987) utilizaron un método de clasificación de acuerdo a los grados de vitrificación que se presentan en hojas: 1) hojas normales de color verde glauco sin apariencia vítrea; 2) hojas suculento-vitrificadas con hojas frágiles, suculentas, más o menos de color verde translúcidas dependiendo de su edad; 3) tipo humifi-vitrificado en la cual la epidermis adaxial está cubierta por agua y la epidermis adaxial puede ser translúcida de color verde oscuro.

Pasqualetto et al. (1988) a fin de determinar la influencia de K^+ en concentraciones de 20.05, 14.05, y 8.05 mm y Mg^{2+} en concentraciones de 1.5, y 3.0 mM, en manzano cv. Vermont Spur Delicious y York, el medio utilizado fue MS y agar (7.0 gr L^{-1} de Difco bacto agar) ó 1.5 y 2.0 gr L^{-1} de gelrite. En los medios que emplearon encontraron que los niveles bajos de K^+ indujeron una alta tasa de vitrificación en brotes afectando la apariencia del tejido y la actividad metabólica de los brotes, mientras que usando 7gr L^{-1} de difco bacto agar no indujo vitrificación, siendo menor el alargamiento, menores los brotes totales y una mayor cantidad de brotes útiles de manzano cv. York, siendo similar pero no relevante en el cv. Vermont Spur Delicious.

Turner et al. (1990) compararon proliferación de brotes y vitrificación de manzano y peral en el medio MS, complementado con 8.8 mM BA y concentraciones de 0.1 % a 0.4 % de gelrite y phitagel en el medio de cultivo y en concentraciones de 0.6 % en manzana y 0.8 % en pera. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de Gelrite en el medio provocó el 100 % de vitrificación en pera, aunque el número de brotes aumento con el consecuente

incremento en peso fresco, se presentó una disminución en peso seco. Para el caso de manzano, a mayor concentración de Gelrite disminuyó la vitrificación aunque el número de brotes y por consecuencia el peso fresco, se vieron disminuidos, pero el peso seco se incrementó al aumentar la concentración de Gelrite en estas especies.

Lowell et al, (1991) a fin de determinar la óptima producción de callo morfológico de hojas de remolacha azucarera clon. Rel¹ (*Veta vulgaris* L), emplearon el medio MS, conteniendo 3.0 % de sacarosa y 0.25 mg l⁻¹ de BA, y solidificado con Bacto Agar en concentración de 0.7 % en el cultivo inicial y subcultivando en períodos de 3 semanas, en las que emplearon cinco tipos diferentes de agar los cuales fueron BactoAgar, Gelrite, Phytigel, HGT y SeaPlaqué agarosa, en concentraciones de 0.9, 0.3, 0.3, y 0.7 % respectivamente. El resultado fue que al emplear Bacto Agar un 70 % y Gelrite un 12% de los explantes cultivados presentaron diferenciación, siendo los demás tipos de agar y concentraciones empleados no representativos, mientras que el potencial mátrico presentó gran diferencia entre los medios empleados pero no fue considerado un factor determinante.

Ladyman (1992) con el fin de determinar el desarrollo de embriones somáticos de melón *Cucumis sativus* L. cv Clinton, obtenidos de explantes cotiledonares. Utilizó para su inducción El medio MS, modificando los reguladores de crecimiento en concentraciones de 2-4-D. 1.1 mg L⁻¹, ANA. 0.2796 mg L⁻¹, BAP. 0.226 mg L⁻¹; agar en concentración de 0.35, 0.7, ó 1.4 %. Comparado con

Gelrite en concentración de 0.15, 0.3 y 0.6 %, adicionando sacarosa, fructosa, maltosa y azúcar comercial al 0.3 %. dio como resultado que los explantes anteriores con Gelrite, con la concentración de 0.15 %, presentaron una alta Vitrificación y expansión de las mismas. En el período de inducción, Gelrite en concentración de 0.6 %, produjo más tejido de embriones somáticos sin presencia de callo. cuando se empleó la sacarosa y fructuosa al 0.3 % y al ser comparadas en presencia de ambos tipos de agar la germinación de embriones somáticos fue muy alta, en comparación con el tejido que fue multiplicado con Gelrite en concentración de 0.3 %. Mientras que Maltosa en 0.3 % inhibió por completo la multiplicación de tejidos.

IV. Métodos de Propagación

La propagación de plantas incluye la reproducción sexual ó por semillas y la multiplicación asexual o clonación, además de una fase intermedia denominada parasexualidad que incluye lo relativo a apomixis y pseudomixis, Margara (1988).

Reproducción sexual ó por semillas

La propagación sexual se lleva a cabo cuando el gameto masculino es liberado en los estambres y se adhiere al estigma que es la parte receptora del pistilo. órgano femenino que realiza la polinización, ya sea entomófila, anemófila y hematófila. Esta polinización es cruzada, pues generalmente el polen de una flor madura antes de que los estigmas del estilo sean receptivos. Los óvulos fecundados se transforman en semillas y éstas son utilizadas para reproducir nuevos individuos, siendo esta propagación la más recomendada para las cactáceas Bravo-Hollis (1995).

Multiplicación Asexual.

Principalmente se realiza con técnicas por medio de esquejes, injertos, estacas, cultivo de tejidos, acodos y/o vástagos. siendo estos últimos, considerados como brotes alrededor de la planta madre, los cuales son los más utilizados para la propagación de cactáceas Márquez (2000), los cuales se

siembran por separado en el lugar deseado después de un período de cicatrización, Reyes, (1992), realizando esta actividad se obtienen ejemplares adultos sin enfermedades aparentes.

La técnica de injertos se realiza con especies que presentan poca supervivencia en el medio, o ejemplares que son llamativos por su colorido y floración. Marquez (2000), reporta a las técnicas de esquejes, estacado y acodo como utilizadas principalmente con especies leñosas o semileñosas en la micropropagación.

V. Metodología Empleada en Micropropagación.

El proceso de micropropagación comienza desinfectando el material extraído de la planta madre, siendo fundamental para el desarrollo de la técnica, posteriormente se fracciona y se guarda asépticamente en tubos de ensayo o frascos con medio, conteniendo una mezcla de sales minerales y reguladores de crecimiento, entre otros componentes. Se obtienen brotes después de un cierto período del cultivo para su propagación y obtención de material vegetal: una vez lograda, la regeneración de la planta, se comienza la aclimatación en condiciones de invernadero con las características ambientales naturales para que pueda sobrevivir.

siembran por separado en el lugar deseado después de un periodo de cicatrización, Reyes, (1992), realizando esta actividad se obtienen ejemplares adultos sin enfermedades aparentes.

La técnica de injertos se realiza con especies que presentan poca supervivencia en el medio, o ejemplares que son llamativos por su colorido y floración. Marquez (2000), reporta a las técnicas de esquejes, estacado y acodo como utilizadas principalmente con especies leñosas o semileñosas en la micropropagación.

V. Metodología Empleada en Micropropagación.

El proceso de micropropagación comienza desinfectando el material extraído de la planta madre, siendo fundamental para el desarrollo de la técnica, posteriormente se fracciona y se guarda asépticamente en tubos de ensayo o frascos con medio, conteniendo una mezcla de sales minerales y reguladores de crecimiento, entre otros componentes. Se obtienen brotes después de un cierto periodo del cultivo para su propagación y obtención de material vegetal; una vez lograda, la regeneración de la planta, se comienza la aclimatación en condiciones de invernadero con las características ambientales naturales para que pueda sobrevivir.

Al respecto, Zimmermañ (1991), menciona la existencia de cinco etapas en la micropropagación, siendo éstas:

Etapa 0. Selección de la planta madre.

Etapa 1. Iniciación del cultivo o establecimiento.

Etapa 2. Multiplicación óoproliferación.

Etapa 3. Enraizamiento.

Etapa 4. Aclimatación.

Etapa "cero " principalmente se desarrolla esta etapa para eliminar problemas de contaminación; la planta madre, al ser seleccionada bajo condiciones higiénicas y características genotípicas deseables, puede reducir algunas de éstas, especialmente las relacionadas con hongos. Debergh (1981). Al ser controlado el fotoperíodo se posibilita la producción de explantes con las mismas características deseadas, en algunas etapas es necesaria la temperatura para el caso de los bulbos las horas frío se necesitan para romper la latencia. Pierik (1973).

Etapa " 1" el desarrollo de un explante en esta etapa puede ser de gran importancia, en la cual la edad de la planta, la edad fisiológica del explante, el tiempo en que se desarrolla y el tamaño, son determinantes en la conducta del cultivo sucesivo. Al trabajar en micropropagación cuando el explante es sometido a estrés, se estimulan en el metabolismo compuestos fenólicos. Y esta

intervención deja reacciones de hipersensibilidad tal como el contenido de células rotas o la prematura muerte celular. Murashige (1991), reporta la etapa de establecimiento de inoculo cuando se selecciona y se somete a las condiciones del cultivo el material vegetal propuesto para su propagación.

Etapa "2" la etapa de multiplicación es en la cual se forman y se desarrollan brotes, los cuales pueden ser de origen axilar ó adventicio; esta etapa es particularmente estimulada por las citocininas debido a que al establecer el balance citocininas-auxinas, determinan el proceso organogenico del explante. Murashige (1991), reporta que en esta etapa se incrementa el número de propágulos, siendo muy importante la frecuencia de la transferencia con intervalos de tres a cuatro semanas (sub-cultivos ó recultivos)

Etapa "3" en esta etapa se desarrolla el sistema radical de los brotes previamente obtenidos, abarcando en este proceso la inducción, iniciación y diferenciación radical.

Etapa "4". La supervivencia de la planta obtenida depende de varios factores como la temperatura, humedad e intensidad luminosa para poder aclimatar los explantes obtenidos y es considerada como una etapa intermedia, para su transferencia a campo. Cruz-Pizarro (2000); Guerrero-Agama (2000), reportan que las plantas cultivadas *in vitro* presentan diversas características anatómicas y fisiológicas que difieren de las plantas cultivadas en campo, por lo cual es muy importante que las plantas cultivadas *in vitro* desarrollen

características morfológicas y fisiológicas similares a las que se desarrollan en campo.

Medio de Cultivo

Hartmann et al. (1990), definen el medio de cultivo como una mezcla compleja de sales minerales (macronutrientes y micronutrientes), compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento. Siendo el medio MS el que más se ha reportado para su utilización. murashige y Skoog (1962).

VI. Vitrificación.

Debergh. et al, (1992) definen el término vitrificación como un tejido u órgano con una apariencia morfológica y actividad fisiológica anormal. Las plantas vitrificadas producen tejido de tipo anormal y han sido descritas como translúcidas, vítreas, vitrescentes, y recientemente hiperhidratadas, Pâques y Boxus, (1987b), los síntomas dependen de varios factores entre los cuales se consideran características morfológicas; como: entrenudos cortos y arrosados hojas que pueden ser gruesas, alargadas, arrugadas, rizadas, quebradizas, frágiles, translúcidas, y presentan problemas en la iniciación de raíces y brotes.

Características anatómicas: tallos con hipertrofia de corteza y del parénquima localizado en la médula, espacios intercelulares abundantes y grandes, hipolignificación del sistema vascular y sistema vascular anormal.

características morfológicas y fisiológicas similares a las que se desarrollan en campo.

Medio de Cultivo

Hartmann et al. (1990), definen el medio de cultivo como una mezcla compleja de sales minerales (macronutrientes y micronutrientes), compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento. Siendo el medio MS el que más se ha reportado para su utilización. Murashige y Skoog (1962).

VI. Vitrificación.

Debergh. et al, (1992) definen el término vitrificación como un tejido u órgano con una apariencia morfológica y actividad fisiológica anormal. Las plantas vitrificadas producen tejido de tipo anormal y han sido descritas como translúcidas, vítreas, vitrescentes, y recientemente hiperhidratadas, Pâques y Boxus, (1987b), los síntomas dependen de varios factores entre los cuales se consideran características morfológicas; como: entrenudos cortos y arrosados hojas que pueden ser gruesas, alargadas, arrugadas, rizadas, quebradizas, frágiles, translúcidas, y presentan problemas en la iniciación de raíces y brotes.

Características anatómicas: tallos con hipertrofia de corteza y del parénquima localizado en la médula, espacios intercelulares abundantes y grandes, hipolignificación del sistema vascular y sistema vascular anormal.

Causas de la vitrificación.

Algunos trabajos realizados con respecto a la vitrificación señalan que los factores que la provocan son el exceso de nutrientes, el exceso de carbohidratos, las altas concentraciones de reguladores de crecimiento, la intensidad lumínica baja o alta y sobre todo, la alta humedad relativa ó la alta disponibilidad de agua en el medio, Martín et al. (1999) aunque es también considerado la composición del desinfectante, el proceso de desinfección, la excisión del explante, la posición del brote en el medio, el número de subcultivos realizados y el proceso de esterilización, Pâques y Boxus (1987a).

Posible control de la vitrificación.

La vitrificación resulta de varios factores que son manipulados por el investigador y sólo controlando éstos se podría tener el control sobre la vitrificación, algunos de ellos se presentan a continuación:

Incremento en la concentración de agar, Debergh (1981), indica que es posible controlar el potencial mátrico, es decir la disponibilidad de agua hacia el tejido, modificación del balance hormonal; la concentración de reguladores de crecimiento en especial la disminución de citocininas Lowell (1991). La pureza del agar, lo cual refiere que existen agar clasificados como: con impurezas, semipuros y puros al contener en su estructura residuos de macroelementos y microelementos. Siendo N y Ca^+ los elementos que principalmente deben ser

controlados al realizar el medio de cultivo. Por último la concentración de carbohidratos. Dabekaussen et al. (1991) indica que la concentración de carbohidratos mantiene una relación muy estrecha con el potencial osmótico y la disponibilidad de agua en el medio.

VII. Hormonas

Salisbury (1994), define a las hormonas como compuestos orgánicos que se sintetizan en alguna parte de la planta y que se translocan a otra parte, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica.

Existen 5 grupos de hormonas o reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas, Citocininas, Ácido Abscísico y Etileno, manteniendo cada grupo respuestas fisiológicas diferentes.

Auxinas.

El ácido indolacético (AIA) es considerado como sinónimo de auxina. Se pueden encontrar tres compuestos sintéticos estructuralmente similares al AIA que provocan las mismas respuestas que éste; considerando así como hormonas auxínicas a: ácido 4-cloroindolacético (4-cloro AIA), ácido fenilacético (APA) y ácido indolbutírico (AIB); existen otros compuestos que son sintetizados por el hombre y también causan respuesta fisiológica comunes a AIA y en general, también se les consideran auxinas. De ellos el ácido α -Naftalenacético (ANA),

controlados al realizar el medio de cultivo. Por último la concentración de carbohidratos. Dabekaussen et al. (1991) indica que la concentración de carbohidratos mantiene una relación muy estrecha con el potencial osmótico y la disponibilidad de agua en el medio.

VII. Hormonas

Salisbury (1994), define a las hormonas como compuestos orgánicos que se sintetizan en alguna parte de la planta y que se translocan a otra parte, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica.

Existen 5 grupos de hormonas o reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas, Citocininas, Ácido Abscísico y Etileno, manteniendo cada grupo respuestas fisiológicas diferentes.

Auxinas.

El ácido indolacético (AIA) es considerado como sinónimo de auxina. Se pueden encontrar tres compuestos sintéticos estructuralmente similares al AIA que provocan las mismas respuestas que éste; considerando así como hormonas auxínicas a: ácido 4-cloroindolacético (4-cloro AIA), ácido fenilacético (APA) y ácido indolbutírico (AIB); existen otros compuestos que son sintetizados por el hombre y también causan respuesta fisiológica comunes a AIA y en general, también se les consideran auxinas. De ellos el ácido α -Naftalenacético (ANA),

ácido 2,4-dicloroxiacético (2,4-D) y ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), clasificados como reguladores de crecimiento al no ser sintetizados por la planta.

Las auxinas tienen una forma diferente de transportarse de un órgano o tejido a otro. El AIA no suele translocarse a través de los tubos cribosos del floema o por el xilema, sino principalmente a través de las células parenquimatosas que se encuentran en contacto con los haces vasculares Jacobs (1979) citado por Salisbury 1994. Su transporte dentro de la planta es basipétalo aunque en la raíz es acropétalo (hacia los ápices) participan en el mecanismo de regulación del crecimiento, en el alargamiento celular Murashige, 1974, lo describe como una organización directa que incrementa la plasticidad de la pared celular en combinación con las citocininas; inducen morfogénesis en micropropagación, estimula el crecimiento generalizado de la planta, estimulando su alargamiento. Activa o inhibe las funciones en cualquier clase de tejido organizado, interviene en factores de juvenilidad, detención de senescencia en hojas y fruto entre otros. Salisbury (1994); Williamm (1995); además promueve la dominancia apical e interviene en la biosíntesis de etileno y en el alargamiento de las plantas (Bandursky et al. 1996).

Citocininas.

Salisbury (1994) define a las citocininas como compuestos de adenina sustituidas que promueven la división celular en algunos tejidos vegetales; existen tres tipos de citocininas que son fisiológicamente más activos y se encuentran con más frecuencia en varias plantas: zeatina, dihidrozeatina, isopentenil adenina (IPA) y una citocinina sintética, la benciladenina (BA). La síntesis de citocinina es probable que se lleve a cabo en semillas, frutos, hojas y en las puntas de raíces debido a que es el lugar en donde se les ha encontrado en mayor concentración y se cree que es el lugar en donde se sintetizan aunque también son transportadas por el xilema.

Skoog et al.(1962) encontraron que si se mantiene una relación alta de citocininas / auxinas, se producen células meristemáticas en el callo; éstas a la vez se dividen y generan otras para formar yemas, tallos y hojas, pero si se reduce la relación citocinina / auxina, se favorece la formación de raíces. Su principal función es la división celular, Salisbury (1974); Theodore (1974).

Giberelinas.

Bidwell, (1979) menciona que la acción principal de las giberelinas es promover el alargamiento de tallos (entrenudos), toman parte en la floración y encañe, principalmente en plantas con hábito de roseta, en ciertas fases de la germinación de la semilla, en el rompimiento del letargo y en varios efectos formativos.

Etileno.

Es un compuesto simple, gaseoso, que provoca un amplio rango de respuesta en las plantas. Se produce en las hojas, donde afecta en gran medida el proceso de maduración. El etileno también causa o reproduce muchos de los efectos de formación de la auxina. Su síntesis es estimulada por ésta y se relaciona con los efectos de malformación de la auxina, particularmente de la raíz. que se deben realmente a la producción de etileno causada por el estímulo auxínico, también puede causar o interferir con la respuesta normal a la auxina. por lo que es posible que existan complejas interacciones de ambas sustancias de crecimiento. Salisbury (1994)

Acido abscísico. (ABA)

Es transportado fácilmente tanto en el xilema como en el floema, y también en las células del parénquima fuera de los haces vasculares; la síntesis se lleva a cabo en forma parcial en los cloroplastos; los efectos que provoca ABA depende del tejido implicado; afecta sobre la membrana plasmática de las raíces, inhibe la síntesis de proteína y en la activación o desactivación de ciertos genes (efectos de transcripción)

VIII. Materiales y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales dentro de las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.

Material Biológico

El material vegetal utilizado fue obtenido de brotes provenientes del cultivo de ápices de *Mammillaria sp.*, de 2.0 a 2.5 cm. de longitud; proporcionado por el M.C. Francisco Cruz Pizarro en la Facultad de Estudios superiores Cuautitlan - UNAM. El explante se estableció bajo condiciones asépticas.

Medio de Cultivo.

La propagación de tejidos vegetal *in vitro* se realizó con material en aislamiento y en condiciones asépticas. se fragmentaron los explantes en fracciones de 1.0 cm³, incubándolos en tubos de ensaye, con un diámetro de 25 mm y el largo de 150 mm, con 15 ml de medio de cultivo el cual fue compuesto con sales inorgánicas del medio propuesto por Cruz-Pizarro (2000). (Anexo 1)adicionado con 1.0 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 gr L⁻¹ de sacarosa (sustituida con azúcar comercial) BA. 0.05 mg L⁻¹, y AIB. 0.01 L⁻¹ Se evaluaron las

concentraciones y tipos de agar, para Sigma y Bioxon en 3.6, 5.4, 7.2 gr L⁻¹. y para Gelrite y Phytigel en 1.125, 2.250, 3.750. gr l⁻¹, el pH se ajustó a 5.7 con HCl y NaOH. esterilizado en autoclave a 121° C (1.5 kg / cm²) durante 25 min.

Condiciones de incubación

Las fracciones incubadas en el medio de cultivo permanecieron durante 45 días. a una temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de obscuridad, la intensidad luminosa fue de $47 \text{ mMol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial 4x3 donde los factores fueron cuatro tipos de agar con tres concentraciones cada uno, con un total de 12 tratamientos y 15 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye. contenido en el explante y medio de cultivo. (Cuadro No. 1)

Cuadro. 1. Tratamientos empleados en la micropropagación de *Mammillaria* sp.

| Tratamientos | Tipo de Agar | Concentración grL ⁻¹ |
|--------------|--------------|---------------------------------|
| 1 | Agar Bioxon | 3.6 |
| 2 | Agar Bioxon | 5.4 |
| 3 | Agar Bioxon | 7.2 |
| 4 | Agar Sigma | 3.6 |
| 5 | Agar Sigma | 5.4 |
| 6 | Agar Sigma | 7.2 |
| 7 | Phytigel | 1.125 |
| 8 | Phytigel | 2.25 |
| 9 | Phytigel | 3.75 |
| 10 | Agar Gelrite | 1.125 |
| 11 | Agar Gelrite | 2.25 |
| 12 | Agar Gelrite | 3.75 |

Medio base: Cruz-Pizarro (2000).

Las variables a evaluar fueron:

Número de brotes obtenidos de cada una de las unidades experimentales.

Para la variable número de brotes, se realizó un conteo y en la cual se registraron los resultados.

Longitud de los brotes: esta se realizó colocando en un vidrio sobre un papel milimétrico en el fondo, contabilizando las interacciones de la longitud de los brotes con la cuadrícula. Se procedió a medir cada explante y los datos obtenidos se registraron por cada unidad experimental.

Se realizó la anotación del desarrollo de brotes de raíz en algunas de las unidades experimentales que lo presentaron, aunque esto no fue representativo en las demás unidades experimentales que se trabajaron.

La disponibilidad de agua en el medio con los diferentes tipos de agar propuestos se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Nairn et al. (1995) en donde utilizaron discos de papel filtro registrando el peso seco y posteriormente el peso en húmedo, al ser colocado el disco sobre el medio en una caja de petri; siendo la diferencia en peso la capacidad que tiene el agente gelificante de liberar agua en el medio. Para ello se hicieron discos de papel (Whatman #1) con una superficie de 3.46 cm^2 , registrando el peso seco y el peso húmedo reportado en diferentes tiempos 5, 10, 15, 20 minutos y midiendo la liberación de agua.

Observaciones anatómicas

Se realizaron observaciones anatómicas mediante microscopía fotónica, comparando las estructuras formadas *in vitro* con aquellas que se formaron en condiciones normales.

Los ápices de tallo y región basal del mismo y callo de plantas cultivadas *in vitro* y de plantas provenientes de campo de la misma especie se fijaron en FAA por 72 horas: se lavaron y se colocaron en un cambiador automático de tejidos (Fisher Tissuematon) en soluciones de Cellosolve (al 50 %, 70 % y cuatro cambios al 100 %) posteriormente pasaron a 4 cambios al 100 % de Xileno. El material permaneció 6 horas en cada solución, posteriormente se transfirieron a dos cambios de parafina líquida (55° C) por 36 horas en cada uno. En las bandejas con los tejidos en parafina fundida se aplicó vacío para una mejor inclusión. Los bloques de parafina se manejaron siguiendo la metodología descrita por Sass (1968) se hicieron secciones de un centímetro de grosor, posteriormente se colocaron en un micrótopo rotatorio (American Optical, modelo 820) haciendo cortes transversales y longitudinales de tallo además de callo y callo basal todos a 10 μm de grosor; los cortes fueron montados en portaobjetos, empleando el adhesivo de Haup y unas gotas de formaldehído comercial al 10 %.

Se tiñeron con safranina y verde fijo para lo cual se pasaron por tren de desparafinado que consistió en pasar por diferentes compuestos de 2 a 3 minutos, en el orden siguiente: 100, 90, 70, y 50 %; después se tiñó con safranina saturada (comunicación personal Engleman 1999) en solución acuosa por 24 horas (

tinción regresiva); posteriormente se lavó con agua y se pasó al tren de tinción: 2-propanol 50, 70, y 100 %, verde fijo (tinción progresiva), después se lavó con 2-propanol con ayuda de una piceta y se introdujo en la parte complementaria del tren: 2-propanol 100 %, Xileno 100 % (tres cambios). Se colocó una gota de resina de alto índice de refracción y el cubreobjetos y se dejó secar en platina de calor a 50-55° C por 48 horas realizando las observaciones.

Se hizo también una tinción para cutículas (solubilidad), donde se utilizó rojo 7B en plantas obtenidas *in vitro* y plantas procedentes de campo. Se hizo el desparafinado similar al descrito anteriormente hasta 2-Propanol al 50% (parte final del tren de desparafinado), posteriormente el portaobjetos con el espécimen fue colocado en una cámara con rojo de aceite 7B durante 24 horas; finalmente se enjuagó con 2-Propanol al 50% y se montó en jalea de glicerol, se dejó secar a temperatura ambiente y se realizaron las observaciones correspondientes, tomando fotomicrografías en el fotomicroscopio (Carl Zeiss modelo 67791).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Variable número de brotes.

La mayor tasa de proliferación se obtuvo al emplear agar bioxon con un promedio de 14.82 brotes por explante en las tres concentraciones empleadas, seguido de Sigma con 11.69 y para gelrite de 11.22, mientras que para Phytigel 7.2, es decir en agar Bioxon supera en 100% el número de brotes que al utilizar Phytigel.

En cuanto al número de brotes y considerando los tipos de agar Bioxon, fue el tipo de agente gelificante en el cual se obtuvo una mayor respuesta organogénica (Cuadro 2, 7, 4. Figura. 1) referido esto al número de brotes por explante, manifestando en este tratamiento una tendencia a incrementarse al aumentar la concentración de agar existiendo una correlación positiva entre esta variable y este tipo de agar. resultados similares reporta Wetzstein et al. (1994) Sin embargo, es importante considerar lo propuesto por Brand (1993) en el cual al incrementar la concentración de agar en el medio encontró un comportamiento similar en número de brotes. pero al emplear el WPM encontró mejor respuesta en la concentración media empleada, por lo que es importante considerar las sales minerales, específicamente los iones que las componen, ya que muchos de ellos tienen interacción con efectos de rigidez y solidificación del agar, debido a que los iones de K^+ , SO_4^{-2} , y Cl^- pueden incrementar la tasa de solidificación,

mientras que los iones de NO_3^- pueden retardar este proceso, aunado a que los cationes divalentes influyen al incrementar la firmeza del gel mientras que los monovalentes generalmente pueden dar una menor firmeza en una misma concentración (Wetzstein 1994).

Para el agar Sigma existe solo diferencia entre la concentración alta y las concentraciones medias y bajas debido a que entre éstas dos últimas no existieron diferencias (Cuadro. 2, figura. 1). Lo anterior puede estar relacionado con aspectos del mismo potencial hídrico y firmeza de gel, además de considerar otros aspectos como las impurezas del gel que en algunos casos pueden llegar a superar los requerimientos de una determinada especie. A este respecto Dabekaussen et al. (1991) al estudiar los factores que afectan la activación de aréolas de *Sulcorebutia alba*. Rausch encontró que al incrementar la concentración de agar por arriba del 0.5% o más tenía un efecto negativo en la activación de aréolas y crecimiento de los brotes, asociando este proceso a la limitación en el aporte de agua y nutrimento contenidos en ella, al disminuir el potencial mátrico e incrementar la concentración de agar (Urbina 1996), en este mismo sentido, Singa (1984) empleando dos marcas de agar, encontró que en la proliferación de manzano, al incrementar los niveles por arriba del 0.3% (que fue él óptimo que obtuvo) disminuyó la proliferación; sin embargo para el peral manifestó una tendencia a incrementar el número de brotes al aumentar la concentración de agar, lo que indica que los resultados obtenidos para este agente gelificante puede ser debido, entre otras cosas. además de las características del medio de cultivo, a características propias de la especie.

Para el caso de Phytigel, la tasa de proliferación más elevada se obtuvo en las concentraciones bajas del mismo, al ser considerado el de mayor pureza, por lo que al emplearlo en las concentraciones de agar con mayor impurezas como es el caso del Bioxon daría una rigidez extrema (Cuadro. 2, figura. 1).

Al utilizar la concentración más elevada de Phytigel se obtuvo la menor tasa de proliferación de todos los tratamientos que fue de 4.73 brotes. lo cual aunque es bajo, el número no demerita tomando en consideración lo reportado por Jones (1977) quien considera una tasa aceptable de 5 brotes por explante. En la micropropagación de algunas especies, al realizar la interacción existente entre los tipos de agar y concentración, se encontró de manera general un promedio mayor para la variable número de brotes en las concentraciones menores o bajas, decreciendo conforme aumenta la concentración de agente gelificante empleado.

Pasqualetto et.al. (1988) reportan para Gelrite que en la concentración baja y media registró el mayor número de brotes en manzano cv. York y Vermont de 8.3 y 8.9 respectivamente, en tanto que Bacto Agar en la concentración empleada obtuvo 6.8 brotes, lo que indicó también que el porcentaje de brotes vitrificados disminuye significativamente al incrementar la concentración del agente geifificante en manzano, señalando que la vitrificación en esa especie pudo estar relacionado con la variabilidad del explante.

Para el caso de Gelrite, los resultados obtenidos para los tres tratamientos se mantuvieron 32% menor que Bioxon siendo el que mejor resultado presentó, manifestando una tendencia a incrementar el número de brotes en la concentración baja y media con relación al comportamiento de los tipos de agar anteriores; es decir, existe una correlación negativa más entre esta variable y la concentración de este tipo de agar, por lo que en la concentración alta redujo el número de brotes hasta un 55%, en comparación con la concentración baja y media de Gelrite. Lo anterior puede estar relacionado con la rigidez del agente gelificante y con la pureza del mismo, además de considerar la disponibilidad de agua del agente gelificante que fue para este gel de $185 \text{ mg} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$ (Cuadro. 2, figura. 1) en comparación con Bioxon.

Los agentes gelificantes Bioxon y Sigma en concentración media ($5.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) presentaron brotación de raíces en algunas de las repeticiones (2 a 4 raíces) aunque no fue representativo, esto se relaciona con el estado fisiológico en el que se encuentra la planta al ser transferida en el medio nutritivo Debergh (1992); Robert et al.(1987) reporta en *Agave fourcroydes* Lem, en cultivo *in vitro*, la presencia y desarrollo de raíces en el cultivo aunque no fue representativo.

Variable longitud de brotes.

Pocos trabajos hacen referencia a parámetros de calidad de los brotes como la longitud, generalmente hacen referencia a otras variables como lo es el número de brotes (Ladyman et al. 1992; Sanderson et al. 1986; Singha 1984; Marín- Hernandez 1998; De Oliveira et al. 1995; Flores-León et al. 2000; Pasqualetto et al. 1988; Rodríguez-Garay et al. 1992; Robert et al. 1987).

En cuanto al tipo de agar, los resultados obtenidos indican que en el tipo de agar Gelrite, la respuesta a esta variable fue mayor, teniendo un promedio en este tipo de agente gelificante de 1.71 cm de longitud por brote obtenido (Cuadro. 7, figura. 2) obteniendo la máxima respuesta para la concentración media de 2.250 mg L⁻¹, con un promedio de 1.8 cm de longitud por brote obtenido (Cuadro. 2, figura. 2) con una tendencia a decrecer al aumentar o disminuir la concentración de este tipo de agar. Pudiendo tener también relación con la pureza y rigidez, entre otros aspectos, lo que concuerda con lo reportado por De Oliveira et al. (1995).

El agar Bioxon siguió con un promedio general de 1.22 cm de longitud de brotes por explante (Cuadro. 7, figura. 2) para este tipo de agar, se obtuvo una diferencia mínima para la concentración baja y media con 1.23 cm por explante y disminuyendo ligeramente para la concentración alta, esto puede estar relacionado con lo reportado por Debergh (1983) quien menciona que el agar es el

responsable de las diferencias significativas en la concentración de los elementos del medio con diferente concentración de agar, siendo afectada la rigidez, potencial hídrico entre otros. Lee et al (1986) reportan que al emplear medio líquido y solidificado en brotes de *Liquidambar styraciflua* L., obtuvo el mejor resultado en proliferación de raíz con el medio líquido mientras que el medio solidificado fue menor en 50 %, por lo que el agar puede limitar el desarrollo de los explantes obtenidos en el medio.

Para Phytigel el comportamiento se mantuvo ascendente hasta llegar a 1.15 cm de longitud por brote con la concentración máxima y manifestando una tendencia a disminuir conforme es menor la concentración de agar (Cuadro.2, 7) Resultados similares reportó Lowell (1991) quien utilizó este tipo de agar para producción de callo morfogénico en remolacha azucarera, en tanto que Steven (1990) reporta que en manzano y peral se obtuvieron resultados favorables en cuanto al número de brotes de ambos cultivares, pero al incrementar la concentración de agar (de 0.1 a 0.4 %) disminuyó el número de brotes. hasta un 30 % menos, similar a lo reportado por Ladyman (1992) quien al utilizar este tipo de agar en la concentración media (6 %) obtuvo el mejor resultado, aunque no superó a Gelrite que presentó 40 % más de respuesta en peso fresco en esta especie. concluyendo que a medida que existió un incremento en la materia seca acumulada en los brotes, el proceso de vitrificación disminuyó significativamente.

Para el agar Sigma el comportamiento fue diferente en el sentido que en la menor concentración empleada ($3.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) se obtuvo la mayor longitud de brotes (1.13 cm) con una tendencia a disminuir conforme aumenta la concentración de agar, lo cual pudo estar relacionado, entre otros factores, con la firmeza del gel, y la disponibilidad de agua. Esto concuerda con lo reportado por Urbina (1996), quien al analizar el efecto de tres agentes gelificantes en diferentes concentraciones, en el cultivo *in vitro* de brotes de vid, observó que la longitud y calidad del brote se vio afectada por la concentración del gel, de tal forma que la longitud del brote se incrementó conforme disminuyó la concentración del agente gelificante.

Disponibilidad de agua en el medio.

En cuanto al procedimiento para medir la cantidad de agua liberada por el agente gelificante se encontró un máximo de $671 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$ (Cuadro. 3) para la concentración más baja empleada de agar Sigma, teniendo una tendencia similar para todos los tratamientos, es decir, el gel liberó una mayor cantidad de agua en las concentraciones menores para todos los tratamientos, siendo en orden decreciente conforme aumenta la cantidad de agente gelificante empleado, siguiendo posteriormente el agar Bioxon en cuanto al máximo liberado con la misma tendencia que el anterior, con un máximo de $647 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$ y un mínimo de $509 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$; Phytigel con un máximo de $291 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$, y un mínimo de $182 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$. y el agente gelificante que menor cantidad liberó fue gelrite con un máximo de $247 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$, y un mínimo de $185 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$, que corresponde al 36% del agar Sigma en su más baja concentración y 38% del agar Bioxon. Lo anterior puede estar asociado a lo señalado por Nairn et al. (1995) en lo relativo a que existe diferencia en el agua que el gel libera en función de la concentración y tipo de agente gelificante empleado, teniendo particular importancia este aspecto en la vitrificación, la cual esta asociada a una pérdida del control hídrico por el explante (Debergh et al. 1992).

Sin embargo, para esta cactácea en particular no se presentó el proceso de vitrificación, con todas las características señaladas por Pâques y Boxus (1987) y la liberación de agua en que pudo influir más. Tomando en consideración la cantidad de agua liberada en el medio este proceso estuvo ligado a una mejor

respuesta en Bioxon mientras que una mejor cantidad se asoció en el uso de Gelrite a una mejor longitud de brotes.

Cuadro. 2 Comparación de medias de número y longitud de brotes de *Mammillaria sp* obtenida *in vitro* con diferente tipo y concentración de agar.

| TRATAMIENTO AGAR | [] (g) | NÚMERO DE BROTES PROM. COMPARACIÓN DE MEDIAS ^z | | | | | | LONGITUD DE BROTES PROM. COMPARACIÓN DE MEDIAS | | | | | | | |
|---------------------|------------|---|---|---|---|---|---|--|------|------|--|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| BIOXON | 3.6 | 13.13 | | b | c | | | | 1.23 | | | | d | | |
| | 5.4 | 14.2 | a | b | | | | | 1.23 | | | | d | | |
| | 7.2 | 17.2 | a | | | | | | 1.21 | | | | d | | |
| SIGMA | 3.6 | 10.13 | | | c | d | | | 1.13 | | | | | e | |
| | 5.4 | 10.47 | | | c | d | | | 1.11 | | | | | e | |
| | 7.2 | 6.2 | | | | | f | g | 0.96 | | | | | | g |
| PHITAGEL | 1.125 | 10.47 | | | c | d | | | 1.08 | | | | | | f |
| | 2.250 | 4.73 | | | | | | g | 1.11 | | | | | e | f |
| | 3.75 | 6.4 | | | | | e | f | g | 1.15 | | | | e | |
| GELRITE | 1.125 | 11.87 | | b | c | | | | 1.6 | | | c | | | |
| | 2.250 | 14.07 | a | b | | | | | 1.8 | a | | | | | |
| | 3.75 | 7.73 | | | | d | e | f | g | 1.75 | | b | | | |

^z Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Cuadro. 3 Disponibilidad de agua en el medio.

| Agar | mg 5min ⁻¹ a] |
|----------|--------------------------|
| BIOXON | 647 |
| | 628 |
| | 509 |
| SIGMA | 671 |
| | 577 |
| | 563 |
| PHYTAGEL | 291 |
| | 202 |
| | 182 |
| GELRITE | 243 |
| | 201 |
| | 185 |

a] Correspondiente a un promedio de 20 observaciones.

Cuadro. 4. Impurezas en los tipos de Agar empleados en el cultivo *in vitro* de *Mammillaria* sp.

| Impurezas | Agar Bioxon ¹ | Agar Sigma ² | Agar Phytigel ² | Agar Gelrite ³ |
|-----------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Cenizas | 4.50 % | 2.60 % | 2.60 % | 1.75 % |
| Calcio | 0.13 % | 0.23 % | 0.23 % | 0.27 % |
| Bario | 0.01 % | 0.01 % | 0.01 % | 0.01 % |
| Silice | 0.19 % | 0.01 % | 0.26 % | 0.09 % |
| Cloruro | 0.43 % | 0.18 % | 0.18 % | 0.13 % |
| Sulfato | 2.54 % | 1.90 % | 1.90 % | 1.32 % |
| Nitrogeno | 0.17 % | 0.10 % | 0.10 % | 0.14 % |
| Sodio | 1.8 % | - | - | 0.82 % |
| Magnecio | 0.01 % | - | - | 0.22 % |

Fuente:^{1,2,3} Datos del Fabricante.

Plantas provenientes de campo.

Presentan tubérculos con aréolas en una menor densidad de espinas; a lo largo de la aréola se presentó tejido vascular (vasos en xilema), prácticamente a lo largo de la areola en su parte media y es limitado por tejido de parenquima (figur.3) esta constituida por células alargadas de pared más gruesa que las provenientes *in vitro*; se encontró tejido meristemático en la región sub-apical de los brotes. estas células meristemáticas se encontraron en dos protuberancias en capas de hasta 15 células (figura.9).

La invaginación formada entre dos protuberancias es amplia y completamente diferente; además de inclusiones de taninos en el tejido fundamental (parénquima) en la región del tallo. A partir de la axila formada por los tubérculos, se formaron y desarrollaron los nuevos vastagos para esta especie.

El tejido vascular dentro del tallo presentó un xilema bien desarrollado con hileras de 20 a 25 células; además del floema en la región aferente del xilema endarco (fig. 8) y la cutícula se presentó continua y densa e inclusive estuvo presente hasta las criptas sub—estomáticas de la epidermis (figura.11) formando un campo continuo.

Plantas provenientes del cultivo *in vitro*.

Las plantas *in vitro* presentan aréolas con una mayor densidad de espinas que las plantas de campo (figura. 4) además de contar con un menor tejido vascular a lo largo del tubérculo en el cual está contenido principalmente xilema, el tubérculo esta constituido principalmente por células parenquimatosas a lo largo de toda la protuberancia, de pared delgada, una corta invaginación formada entre los tubérculos adyacentes, el espacio que existe entre ellas es reducido y el tubérculo tiene una capa epidérmica con una cubierta isodiamétrica. El callo formado en la base de los brotes presenta abundantes células de forma alargada e isodiamétricas con pared alargada. La tinción específica para cutícula presentó las células epidérmicas y mostró la presencia de la misma en la pared periclinal externa, la cual rebordea los estomas formando una capa continua.

Figura. 1. Promedio de Número de Brotes en el cultivo in vitro de *Mammillaria* sp.

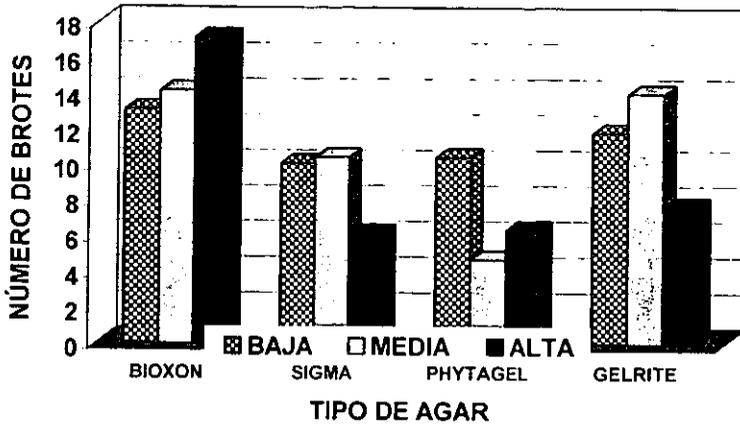
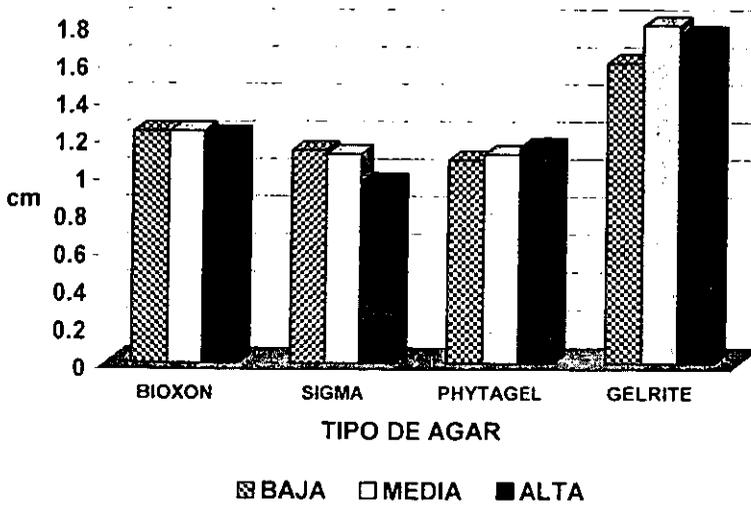


Figura.2. Promedio de Longitud de Brotes en el cultivo in vitro de *Mammillaria* sp.



Cortes anatómicos de *Mammillaria sp*

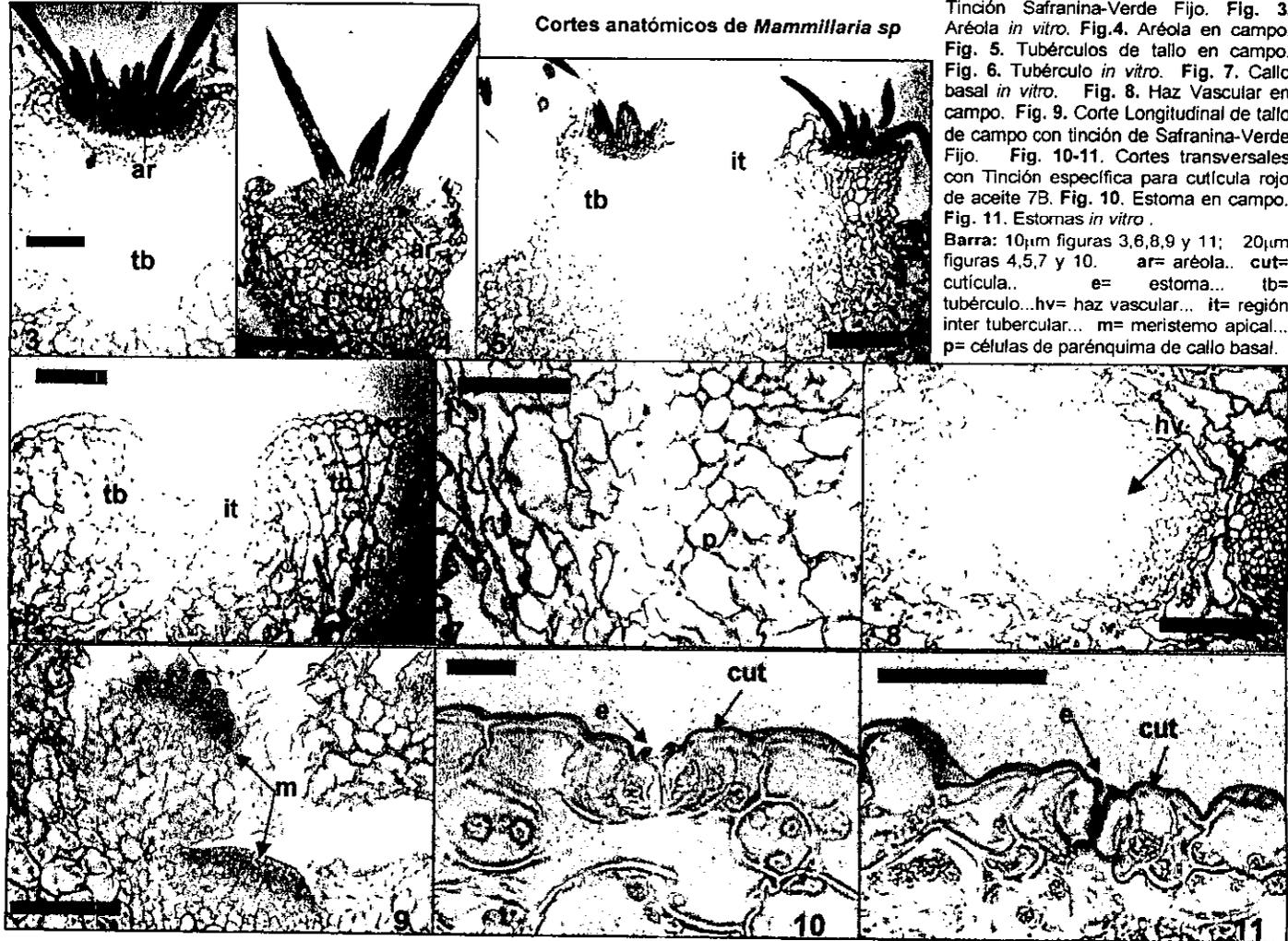


Fig. 3-8 Cortes transversales de tallo con Tinción Safranina-Verde Fijo. Fig. 3. Aréola *in vitro*. Fig.4. Aréola en campo. Fig. 5. Tubérculos de tallo en campo. Fig. 6. Tubérculo *in vitro*. Fig. 7. Callo basal *in vitro*. Fig. 8. Haz Vascular en campo. Fig. 9. Corte Longitudinal de tallo de campo con tinción de Safranina-Verde Fijo. Fig. 10-11. Cortes transversales con Tinción específica para cutícula para color rojo de aceite 7B. Fig. 10. Estoma en campo. Fig. 11. Estomas *in vitro*. Barra: 10µm figuras 3,6,8,9 y 11; 20µm figuras 4,5,7 y 10. ar= aréola.. cut= cutícula.. e= estoma... tb= tubérculo...hv= haz vascular... it= región inter tubercular... m= meristemo apical... p= células de parénquima de callo basal.

- Conclusiones

1. El promedio de brotes obtenidos por subcultivo en *Mammillaria* sp. se consideró con una tasa eficiente de 9.7 brotes por tratamiento empleado.
2. A los 45 días de cultivo el medio solidificado con agar Bioxon dio el mejor resultado para la variable número de brotes con 17.2 brotes para la concentración de 7.2 gL^{-1} .
3. La mayor longitud de brotes se presentó en el medio solidificado con Gelrite con 1.8 cm para la concentración de 2.250 gL^{-1} .
4. La disponibilidad de agua en el medio tendió a decrecer al aumentar la concentración del agente gelificante, de manera similar para los tipos de agar empleados.
5. Al emplear agar Bioxon, la cantidad de agua disponible fue mayor (promedio de $595 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$) y para Gelrite la disponibilidad de agua fue menor (promedio de $210 \text{ mg} \cdot 5\text{min}^{-1}$) debido a la naturaleza del gel y no se presentó en ningún caso vitrificación.

6. Las propiedades físicas y químicas atribuidas a la pureza del gel, influyen en la firmeza, disponibilidad de agua y aporte de algunos nutrimentos que determinan el desarrollo de los explantes.

7. Las plantas provenientes *in vitro* presentaron un mayor número de espinas en las aréolas, mayor número de células de tejido fundamental, menor desarrollo del tejido vascular y cutícula menos densa que las plantas provenientes de campo.

8. Las plantas cultivadas *in vitro*, presentaron una capa continua de cutícula que incluye la cripta estomática.

ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA

Literatura Citada

- Alvarez-Díaz, P. Alfonso. 2000. Elaboración de un manual técnico de horticultura para la propagación de huertos como complemento alimenticio en la dieta familiar. Tesis profesional UNAM-FES-C. Cuautitlan Izcalli. México. 150. p.
- Anicua, Farfan, J. y Rosenda Veronica Rivas Baltazar. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de catáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. Carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis profesional Biol. UNAM- ENEP Iztacala. Escuela de Estudios Profesionales. Edo. México. México.
- Ault, James R, and William J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (cactaceae) HortScience 22(1): 126-127.
- Azcon-Bieto, J. and M.Talon. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Ed Interamericana. Madrid. España.337. p
- Bandurski, R.S. 1996.Auxina. en Azcon-Bieto,J. Y M. Talon. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Ed. Interamericana. México. Pp. 285-298
- Brand, H.M. 1993. Agar and amonium nitrate influence hyperhydricity, tissue and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoot *in vitro*. Plant Cell. and Organ Culture. 35: 203-209.
- Brovo-Hollis. H. 1937. Las cactáceas de México. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico. pp 34-69.

- Brovo-Hollis. H. 1978. Las coctáceas de México, vol.1. Universidad Nacional Autónoma de México.México. pp. 31-95.
- Brovo-Hollis. H. y Scheinvar Léia. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 109-191.
- Cruz-Pizarro. F. 2000.Niveles de sacarosa y relación nitrato amonio $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de brotes de vid. (*Vitis Vinifera*) 'malaga roja'. Tesis de Maestria Colegio de Posgraduados Montesillo, Texcoco Edo. México.
- Dabekaussen, M.A., R.L.M. Pierik, J.D. Van der Laken, and H. Spaans. 1997. Factors affecting areole activation *in vitro* in cactus *Sulcorebutia alba*. Scientia Hort. 46: 283-294.
- De Oliveira, Aparecida. S., Maria de Fatima Pires da Silva Machado, Alberto José prioli, and Claudete Aparecida Mangolin. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (cactaceae) *in vitro* cell. dev. Biol. 31:47-50.
- Debergh, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
- Debergh, P.C., J.Aiken-christie. D. Cohen, B. Grout, S.Von Arnold, R. Zimmerman, and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, and Organ Culture* 30: 135-187.
- Debergh, P.C., Y. Harbaoui, and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of Globe ortichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol plant.* 53: 181-187.

- Flores-León R., and G. Ortiz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Howorth) Pfeiffer. Through areole activation of etioleted plants. Yearbook (haseltonia No. 7) of cactus and succulent society of América.
- Franco, I.S. 1997. Legislación y conservación en suculentas Mexicanas (cactáceas) Conabio. pp. 101-111.
- Guerero-Agama, J.R. 2000. Aclimatación de *Lilium longiflorum* con diferente relación nutrimental. Tesis de Maestria Colegio de Posgraduados Montesillo, Texcoco Edo. México.
- Ladyman, A.R. Juanita, and Brand Girard. 1992. Cucumber somatic embryos devepment on gelling agents and carbohydrate sources. *HortScience* 27(2): 164-165.
- Lee. Ni., Hazel.Y. Wetzstein, and Harry E. Sommer. 1986. The effect of agar vs. Liquid medium on roting in tissue-cultured Sweetgum. *HortScience* 21(2): 317-318.
- Lowell, D. Owens, and Chrys A. Wozniak. 1991. Measurement and effect of gel matric potential and expressibility on production of morphogenetic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 26: 122-133.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ed. Mundi-prensa. Madrid. España.230.p.

- Marín- Hernandez, T., Márquez-Guzmán, B. Rodríguez-Garay, A. Rubluo.1998. Early stages in the development of somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (cactaceae) a severely endangered species. International journal of experimental botany *Phyton*. 62: 181-186.
- Márquez-Díaz, Edgar. 2000. Manual técnico para propagar cactáceas. Tesis Profesional. UNAM-FES-C. Cuautitlan Izcalli. México. pp. 115.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nairn, B.J., R.H. Furneaux, and T.T. Stevenson. 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell. tissue Organ Culture.* 43: 1-11.
- Norma oficial Mexicana Nom-Ecol-059-1994.1994. Diario oficial de la federación,Organo del Gobierno Constitucional de los estados Unidos Mexicanos. México.
- Ostle, B. 1979 Estadística aplicada. Ed. Limusa. México. pp. 347-372.
- Pâques, M. And Ph. Boxus. 1987a. "vitrification" review of literature, *Acta Hort.* 212: 155-166.
- Pâques, M. and Ph. Boxus. 1987b. A model to learn "vitrification" the rootstock apple M.26 present results. *Acta Hort.* 212: 193-210.

- Pasqualetto, P.-L., R.H. Zimmerman, and I. Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 14:31-40.
- Pierik, R.L.M. 1990. *In vitro* culture of higher plants. 3thEd. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht Netherlands. pp. 325.
- Reyes-Santiago, Jeronimo., Absaf, Garcia Mandoza. 1992. Técnicas para la colecta de ejemplares vivos de cactáceas para un jardín botánico. *Boletín Arnananto* 5(4): 41-50.
- Robert, L. Manuel, J.L. Herrera, F. Contreras, and Keith, N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *agave fourcroydes* Lem. (henequen) *Plant Cell. and Organ culture*. 8:37-48.
- Rodríguez-Garay, B. and A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and succulent journal* 64:116-119.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y origen de la flora fanerogámica de México. *Acta Bot. Méx.* 114:3-21.
- Salisbury, B.F., and C.W. Ross. 1994. *Plant physiology*, 4thEd. Wadsworth pub. Santiago, California. pp. 319-339.
- Sanderson, Kenneth C., Yunn-Shy ho, Willis C, Martin Jr, and R, Bruce Reed. 1986. Effect of Photoperiod and growth regulators on growth of three cactaceae. *HortScience* 21(6): 1381-1382.

- Shinga, Suman. 1984. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of "Almey" crabapple and "Seckel" pear. HortScience 19(2): 227-228.
- Turner, R, Steven, and Suman Shinga. 1990. Vitrification of crabapple, pear, and geum on gellan gum-solidified culture medium. HortScience 25(2): 1648-1650.
- Urbina, Pastor. P. 1996. Efecto de agente gelificante en el cultivo *in vitro* de vid (*vitis vinifera*) cv. Málaga roja. Tesis profesional. UNAM-FES-C. Cuautitlan Izcalli, México. pp.45.
- Wetzstein, H.Y., C. Kim, and H.E. Sommer. 1994. Vessel volume, gelling agent, and basal salts effect pH and gel strength of autoclaved tissue culture media. HortScience 29:683-685.

Anexo.1

Composición del medio basal en el establecimiento *in vitro* de *Mammillaria* sp. ⁽¹⁾

| Compuesto Químico | Peso Molecular | Concentración (mM ó μ M) | Concentración (mgL^{-1} = ppm) |
|--|----------------|---------------------------------|---|
| NH_4NO_3 | 80 | 2.5 mM | 200 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 236 | 1.25 mM | 295 |
| KH_2PO_4 | 136 | 1.25 mM | 170 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246 | 1.50 mM | 369 |
| KNO_3 | 101 | 5 mM | 505 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 278 | 0.09 mM | 25 |
| Na - Edta | 380 | 0.10 mM | 38 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 169 | 5 μ M | 0.84 |
| H_3BO_3 | 62 | 100 μ M | 6.1 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 242 | 1 μ M | 0.24 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 287 | 30 μ M | 8.6 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 249 | 0.1 μ M | 0.0000249 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 238 | 0.1 μ M | 0.0000238 |
| Mio - inositol | 180 | 0.55 mM | 100 |
| Tiamina - HCl | 337 | 0.29 μ M | 0.1 |
| Piridoxina - HCl | 205 | 2.44 μ M | 0.5 |
| Ac. Nicotínico | 123 | 4.07 μ M | 0.5 |
| BA | 225 | 2.22 μ M | 0.5 |
| AIB | 203 | 0.49 μ M | 0.1 |
| sacaroza | 342 | 0.0878 M | 30 000 |
| Agar ⁽²⁾ | | | 6 000 |

⁽¹⁾El medio fue utilizado para la proliferación inicial.

pH ajustado a 5.7

⁽²⁾ Adicionado (en diferentes concentraciones) para su evaluación.

Fuente: Cruz-Pizarro 2000.

Anexo 2

Cuadro.5 Análisis de varianza de la variable Número de Brotes del cultivo *in vitro* de *Mammillaria* sp.

| FV | GL | Sc | Cm | Fc | Ft |
|--------------|-----|---------|-------|---------|-----------|
| Tratamientos | | | | | 0.05 0.01 |
| Agar | 3 | 1472.86 | 490.9 | 35.4 ** | 2.60 3.78 |
| Niveles | 2 | 131.03 | 65.61 | 4.7 ** | 3.69 4.61 |
| Agar x niv. | 6 | 99.8 | 16.6 | 1.2 n/s | 2.1 2.8 |
| Error | 168 | 2330.86 | 13.87 | | |
| Total | 179 | | | | |

Cuadro.6 Análisis de varianza de la variable Longitud de brotes del cultivo *in vitro* de *Mammillaria* sp.

| FV | GL | Sc | Cm | Fc | Ft |
|--------------|-----|---------|-------|----------|-----------|
| Tratamientos | | | | | 0.05 0.01 |
| Agar | 3 | 13.3791 | 4.46 | 9.54 ** | 2.60 3.78 |
| Niveles | 2 | 0.0568 | 0.028 | 0.06 n/s | 3.69 4.61 |
| Agar x niv. | 6 | 91.97 | 15.33 | 1.2 ** | 2.1 2.8 |
| Error | 168 | 78.533 | 0.47 | | |
| Total | 179 | | | | |

Anexo 3

Cuadro. 7. Promedio de Número y Longitud de Brotes en *Mammillaria* sp.

| Tipos de Agar [] | Bioxon | Sigma | Phytigel | Gelrite | TOTAL |
|-------------------|--------|-------|----------|---------|-------|
| Baja | 1.23 | 1.13 | 1.08 | 1.6 | 1.68 |
| Media | 1.23 | 1.11 | 1.11 | 1.8 | 1.31 |
| Alta | 1.21 | 0.96 | 1.15 | 1.75 | 1.21 |
| TOTAL | 1.22 | 1.06 | 1.11 | 1.71 | |

| Tipos de Agar [] | Bioxon | Sigma | Phytigel | Gelrite | TOTAL |
|-------------------|--------|-------|----------|---------|-------|
| Baja | 13.13 | 10.13 | 10.47 | 11.87 | 11.4 |
| Media | 14.2 | 10.47 | 4.73 | 14.07 | 10.86 |
| Alta | 17.2 | 6.2 | 6.4 | 7.73 | 9.38 |
| TOTAL | 14.8 | 8.93 | 7.2 | 11.22 | |