



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

PROLIFERACION *IN VITRO* DE *Wilcoxia* sp.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERA AGRÍCOLA**

**P R E S E N T A :**

**DANIA LORENA RUBI VAZQUEZ**

DIRECTOR: M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m344982



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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:

Prolíferación in vitro de Wilcoxia sp.

que presenta la pasante: Dania Lorena Rubí Vázquez  
con número de cuenta: 9627317-9 para obtener el título de :  
Ingeniera 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 17 de Febrero de 2005

|                  |                                       |  |
|------------------|---------------------------------------|--|
| PRESIDENTE       | <u>Biol. Elva Martínez Holguín</u>    |  |
| VOCAL            | <u>M.C. Francisco Cruz Pizarro</u>    |  |
| SECRETARIO       | <u>M.C. Roberto Guerrero Agama</u>    |  |
| PRIMER SUPLENTE  | <u>Inq. Aurelio Valdez López</u>      |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>Biol. María Victoria Herhández</u> |  |

No desesperes, ni siquiera por el hecho de que no desesperas.

Cuando todo parece terminado, surgen nuevas fuerzas.

ESTO SIGNIFICA QUE VIVES.

FRANZ KAFKA.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi **ALMA MATER** la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por haber fomentado mi psique y darme las bases necesarias para liberar a los espíritus que llevaba dentro.

A la persona que me permitió aprender y empaparme del grandioso conocimiento que adquirí al realizar este interesante tema y que me brindo su valioso tiempo al **M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO**.

Al **M.C. ROBERTO GUERRERO AGAMA** por haber hecho participe a mi raciocinio a que debe de observar para poder analizar y llegar a las conclusiones necesarias que explican el porque de las cosas.

**A MIS SINODALES**, por su tiempo y conocimientos.

A las personas que me formaron desde mi aparición a este geoido, aquellas que a pesar de las adversidades siempre han sido estoicos y nunca han permitido que las veladoras en mi altar se apaguen. A ellos que a pesar de ser humanos y por lo tanto de cometer errores forman parte primordial en mi vida, mi alma y mi mente; a los cimientos que me fortalecen **A MIS PADRES**.

## DEDICATORIAS

A aquellas personas que gracias a sus conocimientos fueron llenando los espacios vacíos de mi raciocinio y que me permiten objetar los alegatos necesarios para poder medrar hacia mis objetivos, **A MIS PROFESORES.**

A los entes que permiten que mis pasos por la arena no sean borrados y que cada vez que ejecute uno lo haga con raciocinio basándome en los hechos pretéritos que me permitirán dejar huella para fomentar mi camino ulterior, **A MIS GUÍAS ESPIRITUALES.**

A aquellas tres personas que por 24 años tal vez más tal vez menos eso depende de la edad, me han visto dar los escarceos para poder formar parte de este ecumene al que estamos destinados, que hemos compartido diversas experiencias para poder evolucionar, **ISAAC, NURY Y DIEGO, MIS HERMANOS.**

A aquellas personas que han estado conmigo a pesar de que el tiempo y la distancia son los factores que determinan el seguimiento de un sentimiento, que valoran más mis virtudes y que saben que cuentan conmigo, **A MIS AMIGOS** porque a pesar de cometer errores nunca han perdido la fe en mí y me dan alientos para seguir adelante.

## ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE CUADROS  | i   |
| LISTA DE FIGURAS  | ii  |
| RESUMEN   | iii |
| <br>  |     |
| I. INTRODUCCIÓN   | 1   |
| 1.1 Objetivos   | 2   |
| 1.2 Hipótesis   | 3   |
| <br>  |     |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA  | 4   |
| <br>  |     |
| 2.1 Importancia de las cactáceas                                  | 4   |
| 2.1.1 Descripción morfológica                                     | 5   |
| 2.1.2 Usos tradicionales  | 8   |
| 2.1.3 Descripción botánica de <i>Wilcoxia</i> sp                  | 10  |
| <br>  |     |
| 2.2 Métodos de propagación  | 11  |
| 2.2.1 Reproducción sexual o por semilla                           | 11  |
| 2.2.2 Multiplicación asexual                                      | 12  |
| <br>  |     |
| 2.3 Micropropagación  | 13  |
| 2.3.1 Fases   | 17  |
| 2.3.2 Inducción y proliferación de cactáceas                      | 21  |
| 2.3.3 Aspectos referentes al cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas | 25  |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 2.4 Hormonas del desarrollo vegetal | 28 |
| 2.4.1 Auxinas                       | 31 |
| 2.4.2 Citocininas                   | 33 |
| 2.4.3 Giberelinas                   | 35 |
| 2.4.4 Ácido Abscísico               | 36 |
| 2.4.5 Etileno                       | 37 |
| <br>                                |    |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS           | 38 |
| <br>                                |    |
| 3.1 Ubicación del área experimental | 38 |
| <br>                                |    |
| 3.2 Material biológico              | 38 |
| <br>                                |    |
| 3.3 Medio de cultivo                | 38 |
| <br>                                |    |
| 3.4 Condiciones de incubación       | 39 |
| <br>                                |    |
| 3.5 Diseño experimental             | 39 |
| <br>                                |    |
| 3.6 Variables evaluadas             | 40 |
| <br>                                |    |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN          | 41 |
| <br>                                |    |
| V. CONCLUSIONES                     | 59 |
| <br>                                |    |
| VI. BIBLIOGRAFÍA                    | 61 |
| <br>                                |    |
| VII. ANEXOS                         | 65 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO   | Página |
|--|--------|
| 1. Tratamientos empleados en la proliferación de <i>Wilcoxia</i> sp. ....  | 39     |
| 2. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los<br>tratamientos en la variable número de brotes. .... | 43     |
| 3. Comparación de medias de la variable longitud de brotes en los diferentes<br>tratamientos utilizados. ....                | 47     |
| 4. Comparación de medias de la variable número de raíces de los tratamientos<br>utilizados. ....                             | 52     |
| 5. Comparación de medias de la variable longitud de raíces en los tratamientos<br>utilizados. ....                           | 58     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>FIGURA</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 1.- Promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable número de brotes. ....                         | 43            |
| 2. Promedio de las respuestas obtenidas en los diferentes tratamientos con respecto a la variable longitud de brotes. .... | 46            |
| 3. Promedio de número de raíces obtenidos en los diferentes tratamientos. ....   | 50            |
| 4. Promedio de los efectos obtenidos en la variable longitud de raíces en los tratamientos. ....                           | 56            |

## RESUMEN

La micropropagación ha demostrado su utilidad práctica en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta (como sucede con las cactáceas) y en plantas que aunque sean fácilmente propagables asexualmente, su número se incrementa mucho más cuando se trabaja *in vitro* que con los métodos tradicionales de esqueje, estolón, bulbo, etc.

El presente trabajo se llevó a cabo para determinar cual es la citocinina y concentración de está que más influye en la proliferación de brotes de la cactácea *Wilcoxia* sp. Se evaluaron las citocininas Bencil Adenina (BA), Sulfato de Adenina (SA) y Kinetina (Kin). Las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg·L<sup>-1</sup>.

Las variables que fueron evaluadas para poder conocer los efectos de las citocininas sobre los explantes utilizados fueron; número de brotes, longitud de brotes, número de raíces y longitud de raíces.

La mayor tasa de proliferación se obtuvo en el tratamiento 4, donde se desarrollaron 11.4 brotes/tratamiento, la citocinina que se empleó en este tratamiento fue BA con una concentración de 1.5 mg·L<sup>-1</sup> correspondiente a una proporción de 15:1 citocinina/auxina, donde conforme se iba aumentando la concentración la tasa de proliferación marcaba también un incremento. También en esta citocinina se obtuvo la mayor longitud de brotes correspondiente al tratamiento 1 de concentración 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, en una proporción citocinina/auxina de 1:1, presentando una longitud de 6.5 mm.

El mayor número de raíces se obtuvo en la citocinina SA, en el tratamiento 6, al utilizar una concentración de 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, en una proporción citocinina/auxina de 5:1 con 0.3 raíces por explante y también se presentó la mayor longitud correspondiendo al tratamiento 6 con 3.04 mm.

## I. INTRODUCCIÓN

México posee una gran diversidad vegetal, en la que sobresale la familia Cactácea con gran cantidad de especies endémicas, con importancia ecológica, económica y ornamental. Sin embargo, existen causas que han propiciado la extinción de muchas de ellas y que otras estén en vías de desaparecer.

Algunas de estas causas son la extracción ilegal de plantas, el traslado de modelos de zonas templadas a zonas áridas, uso de la agricultura convencional y cambio en el uso de suelo.

Aunado a esas causas también se encuentra que la mayoría de estas especies son propagadas por semillas en las que el proceso de la germinación resulta difícil en su medio natural, aun cuando los frutos producen generalmente numerosas semillas, sólo unas cuantas logran germinar. Y si logran hacerlo tienen que sobrevivir en las adversidades que les proporciona las condiciones del desierto y tendrá que pasar demasiado tiempo para que puedan presentar las características apropiadas para llevar a cabo su reproducción y mantener la perpetuidad de la especie.

Por lo tanto es importante emplear nuevas técnicas que permitan el incremento de estos recursos fitogenéticos, en un tiempo relativamente corto, debido a que como ya se mencionó, las cactáceas juegan un papel importante en la economía de las personas que habitan zonas cercanas al hábitat de este tipo de plantas. Y que al no tener un buen ingreso con respecto al manejo de otros cultivos, llevan a cabo la práctica del saqueo de ejemplares para comercializarlas, las cuales alcanzan precios exorbitantes en los mercados.

Existen varios métodos para su rápida propagación, entre ellos se encuentra el cultivo de tejidos o micropropagación que se considera uno de los más importantes.

La técnica de micropropagación es una forma de propagar plantas con un potencial enorme, también es llamada cultivo de tejidos y cultivo *in vitro* (del latín vidrio) llamado así debido a que se cultiva en recipientes de dicho material. La micropropagación es el desarrollo de plantas nuevas en un medio artificial bajo condiciones asépticas, a partir de partes muy pequeñas de plantas, tales como embriones, semillas, tallos, meristemas apicales, callos, células aisladas o granos de polen.

Algunos de los factores fundamentales en el éxito de la técnica de micropropagación, son el establecimiento de un cultivo aséptico, la concentración y balance de los dos tipos de hormonas que pueden orientar una vía específica de organogénesis a partir del balance que se establece entre ellas, particularmente auxinas y citocininas.

Las hormonas más utilizadas en la técnica de micropropagación son las auxinas y las citocininas. Las auxinas participan en el mecanismo de regulación del crecimiento desde la alargamiento celular hasta la formación de órganos también inducen la multiplicación de propágulos y estimulan la elongación, en combinación con las citocininas, inducen la formación de callo, raíz y la división celular en los brotes. Las citocininas propician la formación de brotes en cultivo *in vitro* de cactáceas, promueven la citocinesis (división celular) en las plantas *in vivo* y en tejidos cultivados *in vitro* es de gran interés porque permite la micropropagación comercial de varias especies vegetales.

Por lo anterior, con esta investigación se pretende cubrir los siguientes objetivos:

- 1) Evaluación de tres tipos de citocininas en la proliferación de brotes de *Wilcoxia* sp., obtenidos *in vitro*.
- 2) Determinar el tipo y la concentración óptima para obtener la mayor tasa de proliferación.

3) Evaluar el comportamiento morfológico de los explantes mediante la aplicación de reguladores de crecimiento.

La hipótesis ha comprobar durante la realización de esta investigación será la siguiente:

El balance establecido entre auxinas y citocininas determinan la vía de organogénesis en este caso la proliferación de brotes a partir de explantes formados *in vitro*, por lo tanto, al aplicar Benciladenina (BA), Sulfato de Adenina (SA) y Kinetina (Kin) al medio de cultivo, se manifestará al máximo el potencial organogénico de los explantes de la cactácea *Wilcoxia* sp. obtenidos *in vitro*.

Deberá existir una concentración óptima para la mayor tasa de proliferación debido a que concentraciones elevadas pueden conducir a la vitrificación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de las cactáceas

Son varias las familias que se conocen con el nombre de planta suculenta que se concibe como una planta que durante un período de humedad acumula una reserva de agua en forma de jugos en su tallo, sus hojas o sus raíces, lo que le permite mantenerse sin agua durante un largo periodo de sequía (Nessman, 1994 citado por Moreno, 2003).

Algunas de las estrategias que emplean estas plantas para resistir la sequía son:

a) Entrar en actividad fisiológica, crecer y producir hojas sólo en los periodos con suficiente humedad, permaneciendo como semilla o en estado de letargo fisiológico el resto del tiempo.

b) Reducir al mínimo la pérdida de agua poseyendo hojas muy pequeñas que se calientan poco y aprovechan al máximo toda el agua disponible, aún la que se encuentra en forma de rocío.

c) Desarrollar raíces superficiales y fibrosas para alcanzar la humedad que difícilmente se traslada a capas más profundas del suelo.

d) Almacenar agua cuando esté presente y sobrevivir las sequías utilizándola de manera eficiente (Vázquez, 1997 citado por Moreno, 2003).

Un ejemplo de plantas suculentas son las cactáceas, familia de plantas que derivan su nombre del vocablo *Kactos* que significa cardo. Con esta palabra se designa por lo común a las plantas que tienen espinas y tallos suculentos o jugosos, aunque no todas las que reúnen estas características pertenecen a la familia botánica de las cactáceas (Arreola, 1997).

Las cactáceas son autóctonas del continente Americano en donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas (Bravo-Hollis, 1995).

México, por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y climas es un país que cuenta con aproximadamente 800 especies de las 2000 que existen en América (Moreno, 2003).

La República Mexicana cuenta con 48 géneros y más de 563 especies distintas de cactáceas de las cuales 20 géneros son casi endémicos a nivel específico y también con mayor número de especies bajo riesgo de extinción (Reyes, 1994).

### **2.1.1 Descripción morfológica**

Algunas de las características morfológicas que presentan las cactáceas según Bravo-Hollis (1995) son las siguientes:

La raíz de las cactáceas es semejante a la de otras dicotiledóneas, debido a que procede de la radícula del embrión y, en algunos casos, es adventicia; fija la planta en el suelo, absorbe el agua con las sustancias nutritivas disueltas en ella y en algunos géneros la almacena en sus tejidos.

Las raíces de las cactáceas presentan tres tipos que, según Cannon (1913) citado por Bravo-Hollis (1978), son:

- 1) cuando la raíz principal presenta un mayor desarrollo que las secundarias,
- 2) cuando las raíces secundarias crecen más que la principal y
- 3) cuando la raíz principal y las secundarias alcanzan un mismo desarrollo.

En algunas especies de *Wilcoxia* se presentan tipos de raíces tuberosas fasciculadas.

El vástago en las cactáceas consta, de tallo, hojas tectrices y yemas. Estos órganos, sin embargo; sólo están desarrollados en los géneros *Pereskia*, *Pereskiopsis* y *Quiabentia*.

Con respecto a las hojas, estas se encuentran bien diferenciadas solamente en géneros como *Pereskia*, *Pereskiopsis* y *Quiabentia*. El limbo es grueso, carnoso y de forma orbicular o elíptica, el pecíolo es muy corto y a veces falta.

Las cactáceas presentan yemas cotiledonares apicales, las cuales forman los llamados podarios o tubérculos que son la base hipertrofiada de las hojas. En la parte superior de estos órganos se encuentran las aréolas.

Las formas de los podarios son variables, los hay esféricos, digitiformes, foliares, cónicos o prismáticos, entre otros.

Las costillas provienen de los podarios de la yema apical de la plántula que se ordenan en series ortósticas verticales. El número de costillas es muy variable al igual que la forma que presentan; las hay muy angostas y de arista o anchas y de arista redondeada, en ocasiones son altas y muy prominentes o aplanadas. Cuando las costillas son de 2 a 5, planas y delgadas, se denominan alas, como sucede en las especies de *Acanthocereus* y *Epiphyllum*.

Uno de los órganos característicos de las cactáceas son las aréolas consideradas como yemas homólogas a las yemas axilares de las otras dicotiledóneas. Las aréolas forman hojas reducidas, flores, nuevos tallos y espinas, glóquidas, cerdas y pelos, y a veces raíces adventicias. En casi todas las especies están presentes, al centro de las aréolas, un meristemo de crecimiento abaxial o externo, el cual da origen a las espinas, y la adaxial, que origina las flores.

Las espinas son órganos presentes en casi todas las cactáceas, con excepción de los géneros *Lophophora* y *Aztekium* entre otras.

Los tipos de espinas que se encuentran en las cactáceas son muy diversas, según Ganong (1894) citado por Bravo-Hollis (1978), hay tres clases: gruesas o defensivas, suaves y glandulares.

Las estructuras homólogas a las espinas son las llamadas glándulas, las cuales son frecuentes en géneros como *Thelocactus*, *Coryphanta* y *Toumeyia*. El producto de su actividad secretora coincide con la desintegración de la capa epidérmica del ápice; el líquido eliminado queda acumulado en la base y es azucarado.

Con respecto al tallo, la forma que presentan es en general ramificado o bien reducido a una sola rama o artículo, y su altura, consistencia, tipo de ramificación y hábito ecológico son muy variables, por ejemplo:

- Las especies del género *Pereskia* son arborescentes, arbustivas o trepadoras.

- 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.

- 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.

La estructura de la flor presenta caracteres determinados posiblemente por adaptación al medio árido y por las diversas modalidades de la polinización zoófila.

Se pueden apreciar dos tipos de órganos: los de origen axial, como las zonas pedicelas, el hipanto o pericarpelo y el tubo receptacular, y los verticilos florales que constituyen el androceo y el gineceo. En ocasiones se pueden desarrollar nuevos brotes, debido a su organización de origen axial.

El fruto de las cactáceas es complejo, debido a que intervienen en su estructura el ovario y los órganos en que esté incluido como el tejido medular del eje y el cortical o pericarpelo. Su forma es muy variada así como su tamaño y color. Su anatomía depende del grado de desarrollo o reducción de los órganos del pericarpelo, como son: los podarios, las escamas y las aréolas con su producción o no de lana, cerdas y espinas y en ciertos géneros hojas más o menos desarrolladas.

Las semillas 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.

### **2.1.2 Usos tradicionales**

Las cactáceas, por su aspecto peculiar, han sido motivo de atención en nuestro país desde tiempos remotos. La historia y el folclor registran la importancia que adquirieron entre las culturas prehispánicas según se deduce de sus tradiciones y códices. Han sido utilizadas con fines medicinales y propósitos religiosos y también se les ha dado un uso tradicional en zonas rurales e indígenas. Algunos usos son los siguientes:

- Alimentos: Han sido un recurso alimenticio importante especialmente por el agua que contienen sus tejidos, los hidratos de carbono de sus frutos y las proteínas y las grasas de sus semillas.
  
- Madera de construcción: Los haces vasculares de las cactáceas columnares son como varillas largas, rígidas como vigas y una vez que se han desecado son usados por los indígenas para la construcción de muros, paredes o techos (Bravo-Hollis, 1999).
  
- Combustible: La leña de las cactáceas es utilizada como combustible por las tribus indígenas y la población rural.
  
- Agujas y herramientas: Las espinas de las cactáceas así como las puntas de las hojas de los agaves han servido como agujas para coser y bordar, grabar en cerámica y en cuero, como instrumentos de punción para limpiar los dientes y como ornamentos.
  
- Textiles: Los pelos sedosos que suelen producir algunas especies, han servido para rellenar almohadas y colchones.
  
- Setos vivos para delimitar los terrenos.
  
- Forraje: Varias especies entre ellas el nopal constituye un sustituto alimenticio para el ganado cuando escasean los forrajes de otra clase.
  
- Colorantes que se obtienen a partir del uso de los frutos de algunas cactáceas y que sirven para colorear alimentos y medicinas.
  
- Taninos para el curado de pieles los cuales son obtenidos de cactáceas con forma tubular.

- Adobes que son hechos desde épocas prehispánicas con nopales machacados y revueltos con lodo.
- Fijador de insecticidas, colorantes y como pegamento, esto debido a que el mucílago del nopal es muy pegajoso, en pencas fragmentadas con cal para pintar paredes y murales.
- Ornamental: La fascinación por las cactáceas como plantas de ornato existía desde hace siglos en los pueblos mesoamericanos (Vázquez, 1997).

### 2.1.3 Descripción botánica de *Wilcoxia* sp.

La taxonomía de el género *Wilcoxia* según Bravo-Hollis (1978) es la siguiente:

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| Reino      | Vegetal                      |
| Subreino   | Embriofita                   |
| División   | Traqueofita                  |
| Clase      | Angiospermae                 |
| Subclase   | Dicotiledoneae               |
| Orden      | Cactales                     |
| Familia    | Cactaceae Lindl.             |
| Subfamilia | Cereoideae Schum.            |
| Tribu      | Hylocereae Britt. et R.      |
| Subtribu   | Nyctocereinae Buxb.          |
| Línea      | Nyctocerei Buxb.             |
| Género     | <i>Wilcoxia</i> Britt. et R. |

El género *Wilcoxia* presenta plantas generalmente pequeñas y suaves, que producen raíces tuberosas o fasciculado-tuberosas.

Sus tallos son muy delgados, más o menos ramosos. Presentan pocas costillas.

Sus flores son de forma campanular-infundibuliformes, de color rojo púrpura o blanco. Se presenta una flor en cada aréola. Las flores también presentan un tubo corto el cual contiene aréolas con lana y espinas setosas.

El fruto presenta espinas setosas y lana. Las semillas son negras con hilum grande y basal.

## **2.2 Métodos de propagación**

La propagación de plantas implica el control de dos tipos de desarrollo del ciclo biológico básicamente diferentes, la reproducción sexual o por semillas y la multiplicación asexual.

### **2.2.1 Reproducción sexual o por semilla**

La reproducción sexual a la larga es necesaria, puesto que los genotipos deben ser fortalecidos con genes de plantas silvestres, y así se toman más resistentes a las plagas y enfermedades. La reproducción sexual es además importante por el aumento de variabilidad que resulta de la fusión del material hereditario de los cromosomas en la creación de un individuo nuevo.

La reproducción sexual implica que de un esporofito maduro, después de la fase esporofítica, en la fase gametofítica se da la fecundación de dos células sexuales masculinas y femeninas, la formación de semillas y la creación de una población de plántulas con genotipos nuevos y diferentes (Hartmann, 1988).

Cuando llega la época de la reproducción sexual de las cactáceas, que generalmente es en la primavera, las flores maduras se abren y entran en antesis; entonces están abundantemente llenas de jugo azucarado que producen los nectarios, y por la intensa brillantez de los colores de las flores o por el olor agradable o desagradable que producen las flores nocturnas de largos tubos,

como las de los órganos, presentes en los bosques caducifolios y subcaducifolios, llegan a ellas abundantes insectos, chupamirtos, murciélagos y/o mariposas nocturnas para aprovechar el néctar; revolotean entre los estambres o los remueven con los picos, para llegar a los nectarios, y se llenan de polen que transportan cuando visitan otras flores, y con ello realizan la polinización. Esta polinización es cruzada, pues generalmente el polen de una flor madura antes de que los estigmas del estilo sean receptivos (Bravo-Hollis, 1995)

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 y anemófila. Después de la fecundación, el ovario se transforma en fruto, y los óvulos, en semillas.

La germinación de las semillas de las cactáceas es un proceso difícil en su medio natural, y aun cuando los frutos producen generalmente numerosas semillas, sólo unas cuantas logran germinar.

Durante la germinación de las semillas, el agua con los nutrimentos en ella disueltos es absorbida a través del micrópilo por la radícula del embrión, ocasionando que las células se multipliquen y produzcan una plántula, que en las condiciones adversas del desierto tendrá que desarrollarse satisfactoriamente para llegar a su etapa adulta (Bravo-Hollis, 1995).

### **2.2.2 Multiplicación asexual**

La multiplicación vegetativa se produce por nuevas yemas, a partir de los tejidos meristemáticos, las que después de separarse de la planta integran un nuevo individuo.

Este tipo de propagación se lleva a cabo principalmente 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 citado por González, 2001).

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 (Márquez, 2000).

### **2.3 Micropropagación**

La micropropagación puede definirse como la multiplicación masiva de una especie a partir de células, tejidos u órganos en condiciones *in vitro*, lo que involucra la desinfección superficial del explante y su proliferación en un medio de cultivo sintético y bajo condiciones físicas controladas (Villalobos, 1990 citado por Medina, 2000).

Swann y Schleiden (1938) citados por Anicua (2000), postulan la "teoría de la totipotencialidad" en la que se establece que las células son autosuficientes y capaces de regenerar una planta completa.

El proceso de diferenciación celular no implica pérdida de material genético si no expresión diferencial de los genes. Por ello, la mayoría de las células vegetales pueden, en principio, considerarse totipotentes (Azcon-Bieto, 1993).

La morfogénesis es la génesis o iniciación de la forma y de la función de los organismos vivos.

Las células en cultivo manifiestan su totipotencia siguiendo dos rutas alternativas (Azcon-Bieto, 1993) :

➤ La Embriogénesis Somática, que es la generación de embriones a partir de células somáticas, similares a las originadas del cigoto.

➤ La Organogénesis, que se puede definir como la iniciación de la estructura y/o formación de un órgano en un tejido no diferenciado (callo o meristemo); o también como la iniciación de estructuras de raíces y tallo, conectados por sistemas vasculares (Villalobos, 1990 citado por Medina, 2000).

El proceso de la organogénesis suministra las bases para la propagación asexual en gran parte de los tejidos somáticos no meristemáticos.

Los tejidos vegetales *in vitro* pueden producir muchos tipos de primordios, incluyendo aquellos que se diferenciarán eventualmente dentro de embriones, flores, hojas, brotes y raíces. Estos primordios se originan de nuevo de un proceso de dediferenciación celular seguido por una iniciación de eventos en su formación.

La célula o células son los progenitores directos los cuales de alguna manera estimulan una experimentación de un número de divisiones celulares principales en la formación de un meristemoide (Pierik, 1990).

En la organogénesis están presentes dos eventos que dan paso a los orígenes para llevar a cabo la propagación *in vitro*. El primer evento es la regeneración de los brotes de los meristemos seguidos de un crecimiento y desarrollo respectivo que dan seguimiento a los procesos para que se pueda llevar a cabo el segundo evento, que es la inducción de la producción de meristemos de raíz (Trigriano, 2000).

Durante la organogénesis se llevan a cabo eventos morfogénicos que constituyen el desarrollo de órganos, ya sea en forma directa o en una etapa de transición de

callo, para la formación de tallo (caulogénesis) o bien el desarrollo de raíz (rizogénesis)

La organogénesis se clasifica en dos tipos directa e indirecta: según la presencia o ausencia de la formación de callo en forma intermedia.

Es indirecta cuando se produce la formación de callo, que es un tejido tumoral más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados (Pierik, 1990) y de aquí se da el desarrollo de las estructuras organizadas (Azcon-Bieto, 1993; Cubero, 2003; Trigriano, 2000). La formación de órganos vía indirecta puede incrementar la posibilidad de variación en la constitución cromosomal de las células, por lo tanto; la posibilidad de presentar variación fisiológica y morfogénica en los órganos resultantes (Trigriano, 2000).

Es directa cuando los órganos se originan directamente del explante en ausencia de la proliferación de callo. El tejido del callo contiene células que se han diferenciado dentro de una forma morfológicamente más flexible, ayudando al comienzo de una nueva organogénesis. Las células presentes dentro del explante, en la ausencia de la formación de callo, tienen la capacidad para actuar como los precursores directos de los nuevos primordios (Trigriano, 2000).

Durante la organogénesis se presentan procesos tales como la desdiferenciación, la inducción y la diferenciación.

La desdiferenciación implica una reversión del desarrollo del estado más flexible que puede o no puede dar un incremento en el tejido de callo. En la organogénesis directa, las células competentes que no han producido tejido de callo son los únicos progenitores, implicando con esto que ellos experimenten el proceso de la desdiferenciación y desarrollen individualmente o en pequeños grupos la producción de nuevos primordios.

El resultado de la terminación de esta primera fase es que el explante primario adquiere un estado de competencia, el cual es definido por su habilidad para responder a la estimulación organogénica (Trigriano, 2000).

La realización de la competencia de tejido no siempre es un paso simple del proceso, involucra la aplicación de reguladores del crecimiento o fitohormonas (Trigriano, 2000).

La expresión *in vitro* de una determinada respuesta organogénica viene determinada por la interacción de numerosos factores, tales como genotipo de la planta donadora, tipo de explante y estado fisiológico, composición química del medio nutritivo y ambiente físico del cultivo. De todos los factores implicados, las fitohormonas desempeñan un papel fundamental en el control de la organogénesis (Ahuja, 1993).

La formación de raíces tiene lugar en medios con concentraciones de auxinas relativamente elevadas, pero con concentraciones de citocininas bajas, y la formación de vástagos adventicios o axilares puede producirse si existe una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas (Pierik, 1990; Davies, 1995).

La fase de la inducción ocurre en un lapso intermedio cuando el tejido llega a ser competente y se convierte en un tejido determinado para la producción de primordios. La terminación de esta fase ocurre cuando una célula o un grupo de células llegan a producir brotes o raíces. Este punto es atribuido cuando el tejido del explante puede ser removido del medio que indujo la formación de raíz o brote; estos pueden ser colocados en un medio sin reguladores de crecimiento conteniendo sales minerales y vitaminas (Trigriano, 2000).

En la fase de la diferenciación, comienzan los procesos involucrados en la diferenciación morfológica y en el desarrollo de los nuevos órganos (Trigriano, 2000).

### **2.3.1 Fases**

En los sistemas de micropropagación se reconocen 4 etapas secuenciales (Robert, 1993 citado por Medina, 2000).

Etapa 0. Selección de la planta madre (acondicionamiento):

Se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience y abarca el pre-tratamiento correcto del material inicial, manteniendo las plantas, en la medida de lo posible, libres de enfermedades (ausencia de insectos en los invernaderos, agua exclusivamente en las macetas, etc.) (Pierik, 1990).

Etapa I. Establecimiento:

La función de esta etapa es establecer al explante en el medio de cultivo e inducir el desarrollo de brotes múltiples para la multiplicación posterior. El medio a seleccionar varía según la especie. El control del desarrollo se logra manipulando las concentraciones de auxinas y citocininas.

Etapa II. Multiplicación:

Una vez que los explantes generan brotes se separan los propágulos y se transplantan a un medio de cultivo fresco.

Las etapas de multiplicación pueden repetirse varias veces para aumentar la provisión de material hasta cierto número, para su enraizamiento y trasplante posterior a tierra (Invernadero y/o campo).

### Etapa III. Enraizamiento:

El objeto del pretransplante es preparar a las plantas para transplantarlas del medio artificial heterótrofo del frasco de cultivo para la existencia de vida libre autótrofa en el invernadero y luego a su sitio definitivo. Esta preparación implica el enraizamiento y cambio en la fisiología de las plántulas que estimule la fotosíntesis, la absorción de agua y nutrientes por las raíces y la resistencia a la desecación y a los organismos patógenos.

### Etapa IV. Transplante:

Las plantas enraizadas se sacan del recipiente de cultivo, se retira completamente el agar que llevan adherido en las raíces, para remover una fuente potencial de contaminación y se transplanta a una mezcla de suelo estándar en macetas pequeñas en una forma más o menos convencional.

La micropropagación ha demostrado su utilidad práctica en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta y en plantas que aunque sean fácilmente propagables asexualmente, su número se incrementa mucho más cuando se trabaja *in vitro* que con los métodos tradicionales de esqueje, estolón, bulbo, etc.; además, la utilización sistemática de esta técnica para fines comerciales también se enfoca hacia la uniformidad genética del material de siembra cuando el inóculo asexual está ya diferenciado (ápices, yemas axilares, ramas, brotes, etc.), evitándose las variaciones genotípicas propias de las poblaciones generadas por semilla sexual.

Otras bondades de la técnica son la factibilidad de propagación y la disponibilidad de la planta durante todo el año, así como la obtención de material de siembra de alta calidad fitosanitaria, pues además de eliminarse virus y otros parásitos obligados, el sistema exige asepsia absoluta, es decir, ausencia de otros

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

microorganismos no parásitos obligados fácilmente detectables (Lozoya, 1991 citado por Medina, 2000).

El problema estriba en hacer que unas células que han sufrido un largo proceso de diferenciación, adquiriendo caracteres tan especializados como los correspondientes a raíz, flores, etc., se desdiferencien volviendo a su condición primitiva de totipotencia, es decir, a adquirir de nuevo la capacidad de originar una planta completa (Cubero, 2003).

Existen factores que afectan la micropropagación, el cultivo de tejidos en general es un sistema de detalles, los cambios en las dosificaciones del medio, del fotoperíodo, de la temperatura y del pH entre otras cosas, pueden ocasionar alteraciones morfológicas, retraso de crecimiento, toxicidad, etc. Algunos de estos factores son:

a) Medio de cultivo: se compone de sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos (carbón activado, agua de coco, etc.), antioxidantes (como ácido cítrico y ascórbico), funguicidas y antibióticos.

b) Inóculo: también llamado explante, el cual es un fragmento extraído de la planta donadora, con el propósito de cultivarlo asépticamente. Cuanto más pequeño sea menos probabilidades hay de contaminación del medio por microorganismos adheridos al inóculo, pero también existen menos probabilidades de "prendimiento" o desarrollo.

Para la micropropagación se prefieren órganos o fragmentos grandes de la planta (ápices, yemas y ramas). La edad fisiológica determina el tipo y la velocidad de morfogénesis, obviamente en relación con el tipo de medio de cultivo en que se siembre, pues generalmente los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación que los viejos.

c) Luz: Tanto la duración diurna (fotoperíodo) como la calidad (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que al influir en la acumulación de almidón y en las hormonas endógenas, entre otras sustancias, afectan el desarrollo del inóculo.

d) Temperatura: Cuando el calor es un factor de variación o de estudio en los experimentos, una temperatura que oscile entre 25 y 30° C es aceptable para la incubación, aunque según la especie, las temperaturas específicas pueden estar entre 20 y 32° C.

e) Otros factores: El material con que se cierra el recipiente puede influir en el intercambio gaseoso. La posición de siembra, sobre todo de yemas, tiene efecto sobre la organogénesis pues influye en el gradiente químico y en el transporte hormonal (Villalobos, 1991 citado por Medina, 2000).

La micropropagación tiene aplicaciones muy diversas (Cubero, 2003):

→ En producción comercial: numerosas ornamentales se producen así, vendiéndose plantitas formadas en medios artificiales de cultivo en tubos o frascos, para su posterior trasplante a macetas.

→ En la producción de planta comercial libre de enfermedades, en particular de virus (fresa, frutales, etc.).

→ En conservación de germoplasma que de otra forma habría de conservarse en colecciones vivas.

→ En la producción de variación utilizable en mejora por medio de la variación somatoclonal.

→ El llamado rescate de embriones, esto es, la obtención de híbridos interespecíficos cuando el embrión degenera en condiciones naturales: su extracción temprana y cultivo *in vitro* posibilitan la consecución de la planta adulta.

→ En la obtención de híbridos somáticos.

→ En la obtención de haploides por medio del cultivo de anteras.

→ En selección *in vitro* a herbicidas, etc.

→ Asociada a la ingeniería genética, en la transformación de plantas superiores.

→ En la producción (aún experimental) de semillas artificiales, consistentes en un embrión obtenido por cultivo de tejidos rodeado de una capa de un material que admite la desecación y la rehidratación posterior.

→ En la investigación de los procesos de morfogénesis y embriogénesis.

### **2.3.2 Inducción y proliferación de cactáceas**

Los métodos convencionales de propagación son frecuentemente inadecuados para abastecer la demanda comercial que presentan las cactáceas, debido al bajo índice de germinación, al bajo índice de crecimiento o al bajo índice de ramificaciones laterales.

La propagación *in vitro* es una alternativa potencial para la producción de estas plantas. Cerca del 25 % de las especies de cactáceas son catalogadas como especies en peligro de extinción debido a que su hábitat se está perdiendo o son saqueadas. La micropropagación por medio de la proliferación de tallos o brotes axilares mantendrá la genética original de las plantas madre y se podrán obtener un número mayor de ejemplares.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La iniciación del cultivo de cactáceas se puede llevar a cabo con tubérculos o aréolas (meristemas axilares), ápices de tallos inmaduros provenientes de invernaderos que crecieron sobre esquejes, ápices maduros de tallos provenientes de material colectado en campo o epicotilos provenientes de esquejes germinados *in vitro*. El uso de estos últimos explantes tiene la ventaja de que elimina la contaminación por microbios. Estos explantes son usados para la propagación de especies raras donde la recolección en campo es imposible, o cuando los meristemas laterales no pueden ser obtenidos. Los ápices de tallos provenientes de invernaderos o especímenes maduros colectados en campo son catalogados como explantes satisfactorios.

Para llevar a cabo la micropropagación de las cactáceas, en primer lugar se debe esterilizar el explante a utilizar, debido a que el tamaño de los explantes es largo y así se garantiza una rápida transición para la multiplicación de brotes en corto tiempo.

Havel y Kolar (1983) citado por Bajaj (1992), desarrollaron un método para la no destrucción de muestras de plantas donantes por la remoción de cantidades pequeñas de tejido areolar con una jeringa esterilizada; con esto solo se obtuvo crecimiento de callo.

La escisión de tubérculos individuales intactos o aréolas es un método más efectivo de la no destrucción de muestras de plantas, cuando los meristemas laterales están listos para ser sacados de la dominancia apical.

La etiolación es a veces usada para inducir nuevo crecimiento en los explantes de especies que presentan dormancia en el verano. Para muchos tipos de cactáceas que no presentan ramificaciones, las aréolas basipétalas podrían ser altamente recalcitrantes a menos que los meristemas apicales sean primero separados.

La esterilización de las plantas es extremadamente importante debido a que las espinas y los pelos protectores guardan una importante población de microbios. Se han utilizado como agentes de esterilización soluciones de cloramina B al 3 %

o hipoclorito de calcio al 5 % por 10 minutos. El hipoclorito de sodio puede ser usado también. Los ápices de tallo intactos son sumergidos en etanol al 95 % durante un minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 2 % por 7 minutos y después se enjuagan en agua destilada por 3 minutos.

Los materiales colectados de campo que no están muy contaminados son empapados en agua que contiene detergente y después son enjuagados en agua por 5 minutos. Las raíces y las espinas son removidas y el tallo es puesto en etanol al 95 % por un minuto, seguido de una inmersión en cloruro mercuríco acidificado al 0.001 % por 2 minutos con agitación constante. Los explantes son entonces enjuagados en tres cambios de agua destilada.

Las condiciones de incubación han sido reportadas por Bajaj (1992) de un rango de 24 a 27° C, con un fotoperíodo de 16 horas. Clayton et al. (1990) citado por Bajaj (1992) reportó la temperatura de incubación de 29° C con luz fluorescente e incandescente en exceso de 10,000 luxes. Bajo estas condiciones el problema de brotes vitrificados es eliminado. Debido al ambiente natural en que se desarrollan las cactáceas, la intensidad muy baja de luz causa una etiolación considerable y fomenta la proliferación de callo.

Con respecto al medio de cultivo, el más usado para la proliferación de brotes ha sido el implementado por Murashige y Skoog (1962).

Las investigaciones realizadas en la micropropagación de cactáceas han demostrado que los reguladores de crecimiento en combinación requeridos para la proliferación de brotes axilares son únicos para cada especie.

En general, niveles bajos de auxina o sin el uso de esta son requeridos, en combinación, con niveles moderados de citocininas, para la proliferación de brotes axilares de cactáceas. Muchas cactáceas presentan la capacidad para producir excesos de auxinas *in vitro*. Hay especies que interactúan más fuertemente con las citocininas que con las auxinas (Clayton et al., 1990 citado por Bajaj, 1992). La zeatina fue la mejor citocinina usada en muchas especies.

Estos estudios concluyen que la combinación de reguladores de crecimiento deberían o podrían ser determinados empíricamente para cada especie.

Basados en los resultados de Clayton et al. (1990), una serie de tres medios de cultivo podrían ser usados para comprobar el potencial de micropropagación de especies de cactáceas aún no tratadas. Esta comprobación podría ser basada en medios como el L2 ( medio de cultivo que contiene altos niveles de iones de magnesio y calcio) o el medio MS, los cuales son suplementados con 5 a 10 mg · L<sup>-1</sup> de zeatina, en combinación con 0 a 0.02 mg · L<sup>-1</sup> de NAA. En suma se han encontrado combinaciones de 2-ip o kinetina con picloram o IAA, para ser utilizados en varias especies de cactáceas.

Después de la fase de multiplicación de brotes, las plantas individuales son colocadas en otro medio de cultivo para el enraizamiento. Este paso es el último estado donde la calidad, tamaño y vigor de los brotes pueden ser manipulados antes del re-establecimiento. Algunas especies se benefician de un tratamiento específico de auxina/citocinina para aumentar el tamaño y calidad antes de la inducción de raíz.

Ault y Blackmon (1987) citado por Bajaj (1992) reportan el enraizamiento espontáneo en un medio de cultivo sin auxina con *Ferocactus acanthodes*. La especie *Opuntia amyclaea* enraizó inclusive sin la aplicación de auxinas exógenas. Generalmente, hay una correlación entre el enraizamiento *in vivo* y los tratamientos requeridos *in vitro*. Especies que enraízan libremente *in vivo* como ciertas especies de *Opuntia* y *Chamaecereus*, enraízan también espontáneamente en medios libres de auxinas. Algunos tipos de cactáceas que crecen en colonias, como ciertas especies de *Escobaria* y *Mammillaria*, pueden enraizar fácilmente en medios sin auxinas. Las especies que no enraízan tan fácilmente en medios de cultivo sin auxinas, pueden enraizar después de ser sometidas en tratamientos iniciales de auxinas.

La transferencia inmediata a un medio de cultivo sin hormonas después de haber sometido a los explantes a tratamientos con auxinas provocan el desarrollo de las raíces.

Los altos niveles de citocininas usados para la proliferación provocan problemas en el enraizamiento. Este problema puede ser eliminado colocando los brotes o explantes en un medio de cultivo sin hormonas para ayudar a reducir la cantidad excesiva de citocininas antes de la aplicación de tratamientos que ayuden a iniciar el enraizamiento.

Las plantas enraizadas deberán ser protegidas de los intensos rayos solares y de la desecación. Esto se puede evitar utilizando como protección un plástico de polietileno (Ault y Blakcmon, 1987 citado por Bajaj, 1992) o colocar a las plantas bajo sombra y controlando la humedad.

Especies adaptables, como *Opuntia*, toleran una extensa variedad de condiciones para su re-establecimiento.

El género *Pediocactus* requiere temperaturas frías en verano, baja humedad y un excelente sistema de drenaje durante su re-establecimiento.

Aunque algunas cactáceas muestren un índice rápido de crecimiento durante la etapa de proliferación de brotes axilares, los propágulos enraizados pueden presentar una regresión de índices normales o más bajos de crecimiento.

#### **2.3.4 Aspectos referentes al 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 origen y método de esterilización del explante, evaluación de medios de cultivo, la respuesta hormonal, tipos de explantes, tipos y concentraciones de agar, respuestas a las condiciones de temperatura, humedad, fotoperíodo, pH. Entre las que sobresalen las siguientes:

Anaya (1990) empleó la técnica de cultivo de tejidos a partir de plántulas germinadas "in vitro", obteniendo desarrollo de callo y posterior diferenciación en plántulas de *Astrophytum myriostigma* var. potosina. En esta investigación aplicó dos cuadros de tratamientos: en el primero ocupó el nivel hormonal  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Kn y  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2-4 D que promovió el desarrollo de callo de consistencia desmenuzable, de buen tamaño y coloración verde intensa. Este callo se sometió a un segundo cuadro de tratamiento en que se empleó un nivel hormonal que favoreció el desarrollo del mayor número de brotes en el menor tiempo, siendo éste  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2iP y  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de IAA. La inducción de brotes se obtuvo en el medio basal utilizado para el desarrollo de callo. El tiempo de inducción de los 46 brotes del tratamiento seleccionado fue de aproximadamente 6 meses y medio correspondiendo un mes para la obtención de los explantes de las plántulas germinadas, dos meses y medio para la inducción y crecimiento de callo y tres meses en la diferenciación de brotes.

Roy et al. (1991) obtuvieron una rápida propagación para la formación de brotes de callo de *Aloe vera* L. La formación de callo fue inducida en segmentos de tallos provenientes de brotes axilares jóvenes que crecían en tallos rizomatosos bajo tierra. El medio usado fue MS el cual contenía  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2-4 D y  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de kinetina, en el cual se obtuvo la mejor inducción de callo. Los brotes se iniciaron del callo con concentración reducida de 2-4 D y una concentración alta de kinetina.

Rodríguez-Garay et al. (1992) citado por González (2001) realizaron en *Aztekium ritteri* un estudio con el fin de 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  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y BA + ANA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  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) citado por González (2001) llevaron a cabo 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  $13.9 \pm 6.5$  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  $17.3 \pm 7.9$  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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> y AIA ó NAA en 1.0 mg · L<sup>-1</sup>.

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<sup>-1</sup> en micropropagación para tres especies de cactáceas: *Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*, para lo cual utilizaron el medio MS. El primer resultado fue la formación de callo a los 20 días de cultivo en *Mammillaria bocasana* en concentración de citocininas con KIN 5.0 mg · L<sup>-1</sup>, BA 5.0 y 10.0 mg · L<sup>-1</sup>, mientras que en los demás tratamientos se presentó 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<sup>-1</sup> presentó un crecimiento

rápido; mientras que para *Echinocactus grusonii* 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 senilis* (Haworth) Pfeiffer, utilizó el medio MS 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 tomaron 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, 50 y 35 %, después de 44 semanas de cultivo en tejido diferenciado y activación de aréolas.

Fuentes et al. (2001) desarrollaron la investigación de el cultivo *in vitro* de *Mammillaria conspicua* a partir de plantas etioladas, en un medio adicionado con reguladores de crecimiento. Para ello evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (0.0, 1.0, 5.0, 10.0 y 20 mg·L<sup>-1</sup>) en un medio de cultivo MS. A continuación se llevó a cabo la aclimatización y transplante a suelo de las plántulas obtenidas. Los tratamientos que presentaron una mejor respuesta (regeneración de plántulas) fueron los de 10 y 20 mg · L<sup>-1</sup>, el resto, incluyendo el grupo testigo sólo presentaron generación de callo. En cuanto a la aclimatización, todas las plántulas sobrevivieron alcanzando en promedio una talla de 3 cm de alto x 2 cm de ancho.

#### **2.4 Hormonas del desarrollo vegetal**

La reducida cantidad de sustancias naturales del crecimiento que se encuentran en las plantas controla su crecimiento y desarrollo. Existen procesos como la iniciación de las raíces, el establecimiento y terminación de los periodos de letargo y reposo, la floración, formación y desarrollo de los frutos, abscisión, senescencia y ritmo de crecimiento que se encuentran bajo control hormonal. Con frecuencia

en muchas plantas agrícolas pueden modificarse esos procesos, en provecho del hombre mediante la aplicación de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

Salisbury (1994) postula que una hormona vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de la planta y que se trasloca a otra parte donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica. De acuerdo a esta definición se desglosan los componentes que dan origen a tal determinación. En primera instancia la respuesta en el órgano blanco no necesita ser promotora, ya que procesos como crecimiento o diferenciación en ocasiones se ven inhibidos por hormonas, en especial el ácido abscísico. Como la hormona debe ser sintetizada por el vegetal, iones inorgánicos como  $K^+$  o  $Ca^{2+}$ , que causan respuestas importantes, no son hormonas. Tampoco lo son los reguladores orgánicos del crecimiento sintetizados sólo por químicos orgánicos (por ejemplo 2,4-D, que es una auxina) o los sintetizados sólo en organismos no vegetales.

La definición también postula que una hormona debe traslocarse en la planta, pero nada se dice acerca de cómo o cuán lejos; esto no significa que la hormona no deba causar respuesta alguna en la célula en donde se sintetiza. La sacarosa no se considera una hormona, aún cuando es sintetizada y traslocada por vegetales, ya que provoca el crecimiento sólo a concentraciones relativamente elevadas.

Con frecuencia, las hormonas son eficaces a concentraciones internas cercanas a  $1 \mu M$ , mientras que azúcares, aminoácidos y otros metabolitos necesarios para el desarrollo y el crecimiento (excluyendo enzimas y la mayoría de las coenzimas) casi siempre se presentan en concentraciones de 1 a 50 mM.

Las hormonas regulan procesos de correlación, es decir que; recibido el estímulo en un órgano, lo amplifican, traducen y generan una respuesta en otra parte de la planta.

Interactúan entre ellas por distintos mecanismos:

⇒ Sinergismo: la acción de una determinada sustancia se ve favorecida por la presencia de otra.

⇒ Antagonismo: la presencia de una sustancia evita la acción de otra.

⇒ Balance cuantitativo: la acción de una determinada sustancia depende de la concentración de otra.

Tienen, además dos características distintivas de las hormonas animales:

- a) Ejercen efectos pleiotrópicos, actuando en numerosos procesos fisiológicos
- b) Su síntesis no se relaciona con una glándula, sino que están presentes en casi todas las células y existe una variación cuali y cuantitativa según los órganos (Azcon-Bieto, 1993).

En la actualidad sólo son generalmente reconocidos cinco grupos de hormonas, estos grupos incluyen cuatro auxinas, 84 giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno (Salisbury, 1994).

Se han determinado otras sustancias que eventualmente pueden clasificarse como fitohormonas, las cuales son: las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinosteroides y la sistemina (Salisbury, 1994).

Las hormonas que se utilizan más en la micropropagación son las auxinas y las citocininas. Las giberelinas el etileno y el ácido abscísico no son esenciales para la inducción de órganos, pero actúan como moduladores de la respuesta morfogénica.

### 2.4.1 Auxinas

El término auxina (del griego *auxien*, incrementar, Salisbury, 1994), es un término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células de los brotes (Salazar, 1994).

En la actualidad se sabe que la auxina es el ácido indolacético (IAA); por otra parte, las plantas contienen otros tres compuestos que son estructuralmente similares al IAA y provocan muchas de las mismas respuestas que éste.

- El ácido 4-cloroindolacético (4-cloro IAA), que se encuentra en semillas jóvenes de varias leguminosas.
- El ácido fenilacético (PAA), está difundido entre plantas y con frecuencia es más abundante que el IAA, aunque es mucho menos activo para causar las respuestas típicas del IAA.
- El ácido indolbutírico (IBA), de más reciente descubrimiento, que en un principio se pensó que sólo una auxina sintética activa, pero se presenta en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas, por lo que es probable que esté difundida en el reino vegetal (Salisbury, 1994).

La auxina ha sido aislada a partir de plantas superiores y hongos y, posteriormente, de la orina humana; se forma en las plantas, se desplaza en su interior, y después desaparece.

Las hojas adultas, sometidas a la luz, sintetizan un precursor de la auxina que varía según la especie vegetal de que se trate: el triptófano, que por transaminación y descarboxilación da origen al IAA o la triptamina por oxidación (Azcon-Bieto, 1993) u otra sustancia de núcleo indólico.

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas como las yemas terminales o ápices vegetativos, las cuales están en crecimiento activo, siendo éste el sitio de síntesis.

El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del peciolo parece también prevenir la abscisión. Las auxinas asperjadas sobre las hojas en concentraciones bajas, pueden ser absorbidas, penetran en los elementos cribosos, pero posteriormente se trasladan al parénquima vascular, las auxinas sintéticas, aplicadas en altas concentraciones, se trasladan por floema, junto a los fotoasimilados (Azcon-Bieto, 1993).

Existe acuerdo en que las auxinas actúan a nivel génico al desreprimir o reprimir la expresión de los genes. El IAA se liga a un receptor de naturaleza proteica, formando un complejo receptor-hormona de carácter reversible, específico, con alta afinidad y saturable. Este complejo activa un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadoras de los compuestos de la pared.

El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas.

La estructura que presentan cada uno de los compuestos tipo auxinico conocidos se parece al IAA debido a que tienen un grupo carboxilo unido a otro grupo carbonado (por lo común -CH<sub>2</sub>-) que, a su vez, está unido a un anillo aromático (Salisbury, 1994).

Algunos de los efectos fisiológicos que presentan las auxinas en las plantas son que actúan en la mitosis, provocan el alargamiento celular, dan origen a la formación de raíces adventicias, provocan la dominancia apical, tienen propiedades para ser utilizados como herbicidas, partenocarpia, gravitropismo, diferenciación del xilema, regeneración del tejido vascular en tejidos dañados, inhibición del crecimiento radical en concentraciones bajas, inhiben el crecimiento de las raíces, regulan la abscisión retardándola, retrasan el comienzo de la maduración, influyen en la senescencia, inducen la síntesis del etileno (Salazar, 1994).

El mecanismo de acción de las auxinas se lleva a cabo debido a que éstas incrementan la plasticidad y la flexibilidad de las paredes celulares, disminuyendo la presión exterior a la célula. La presión de turgencia hace que entre agua en las células y se provoque la expansión celular, por ruptura de enlaces cruzados entre las microfibrillas de celulosa de las paredes celulares.

También las auxinas activan un ARNm que provoca la síntesis de enzimas específicas. Estos enzimas no se conocen, pero se han detectado cambios en los patrones proteínicos al aplicar auxinas. Las enzimas específicas producen la inserción de nuevos materiales en la pared celular, provocando la expansión celular. Las auxinas provocan y fomentan la síntesis de ARN y proteínas. La síntesis de ARN y proteínas es un requisito previo al crecimiento provocado por las auxinas, siendo el crecimiento un efecto secundario (Salazar, 1994).

#### **2.4.2 Citocininas**

En 1913, Gottlieb Haberlandt, descubrió en Austria que un compuesto desconocido, presente en los tejidos vasculares de diversas plantas, estimulaba la división celular que produce la formación del cambium del corcho y la cicatrización de las heridas en los tubérculos de papa cortados (Salisbury, 2000).

Del producto de someter al autoclave DNA de esperma de arenques, se obtuvieron los primeros cristales de una sustancia que inducía división celular. Por su acción sobre la citocinesis se le denominó kinetina o quinolina identificándose como 6-(furfurilamino) purina (Barceló, 2001).

Las citocininas estimulan el alargamiento de células en discos de hojas etioladas, también ejercen una acción morfogénica, ya que inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos en condiciones apropiadas. En general, las citocininas exógenas inhiben la elongación del eje principal de las raíces.

Existen otros procesos en los que las citocininas actúan influyendo sobre la diferenciación, como en la maduración de proplastos en cloroplastos, inducción de la partenocarpia en frutos, inducción de la floración en plantas que normalmente requieren frío o días largos para florecer (Barceló, 2001).

Las citocininas se mueven poco o nada en las plantas. La presencia de estas hormonas en el xilema y en el floema de las plantas indica que se transportan a través de ambos tejidos; se ha indicado que las citocininas se sintetizan en los ápices de las raíces, y se ha comprobado que se detectan en el contenido de los tubos del xilema y que su nivel disminuye si se someten las raíces a situaciones de estrés. La cantidad de citocininas que se extraen de los ápices es mayor que la que se extrae de zonas próximas (Barceló, 2001).

Las citocininas más frecuentes y fisiológicamente más activas en varias plantas son la zeatina, la dihidrozeatina y la isopentenil adenina (IPA). También aparece la cinetina y otra citosina sintética, la benciladenina, ambas muy activas.

Todas las citocininas tienen una cadena lateral rica en carbono e hidrógeno unida al nitrógeno que sobresale en la parte superior del anillo de purina (Salisbury, 2000).

Skoog y colaboradores descubrieron que si se corta el parénquima del tallo del tabaco, de la soya o de otras dicotiledóneas y se cultiva asépticamente en un medio de agar con auxina y los nutrientes adecuados, se forma una masa de células no especializadas, típicamente poliploides a la que se conoce como callo. Si se añade además una citocinina, se estimula la citocinesis. Si se mantiene alta la relación citocinina-auxina se producen células meristemáticas en el callo. Células que se dividen y generan otra que, a su vez, forman yemas, tallos y hojas. Pero sí se reduce la relación citocinina-auxina se favorece la formación de raíces (Salisbury, 2000).

La citocinina es más activa si la cadena lateral contiene cerca de cinco carbonos y su actividad se incrementa con la presencia de un anillo de benceno o con la cadena lateral insaturada (Bidwell, 1990).

La kinetina y la zeatina son las más usadas en el cultivo de tejidos, debido a que son muy activas

### **2.4.3 Giberelinas**

Las giberelinas se descubrieron en Japón en la década de 1930 a partir de estudios con plantas de arroz enfermas que alcanzaban grandes alturas; debido a un hongo patógeno (*Gibberella fujikuroi*).

Todas las giberelinas tienen 19 o 20 átomos de carbono, agrupados en sistemas de 4 a 5 anillos. Todas las giberelinas tienen también un grupo carboxilo unido al carbono 7, u algunas poseen un carboxilo adicional unido al carbono 4 (Salisbury, 1994).

Los posibles mecanismos de acción de las giberelinas es resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes:

- En primer lugar, la división celular es estimulada en el ápice del tallo , en especial en las células meristemáticas más basales a partir de las cuales se desarrollan las largas filas de células corticales y de la médula.
- En segundo lugar, en ocasiones las giberelinas promueven el crecimiento celular debido a que incrementan la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa, con lo que originan moléculas de fructosa o glucosa.
- En tercer lugar, con frecuencia las giberelinas incrementan la plasticidad de la pared celular (Salisbury, 1994).

La acción principal de las giberelinas es promover el alargamiento en las plantas. También toman parte en la floración y el encañe que la precede en las plantas con hábito de roseta, en ciertas fases de la germinación de la semilla, en el rompimiento del letargo y en varios efectos formativos.

Las giberelinas parecen moverse libremente por toda la planta y su patrón de transporte y de distribución no es polar. Se sintetizan en muchas partes de la planta, pero más especialmente en las áreas en activo crecimiento o los tejidos meristemáticos o en desarrollo (Bidwell, 1990).

#### **2.4.4 Ácido abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es un regulador esencial del crecimiento vegetal que se encuentra presente en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales.

Es un sesquiterpeno apocarotenoide, que se sintetiza mediante escisión oxidativa de los epoxi-carotenoides neoxantina y violaxantina.

En semillas y frutos, la regulación de la biosíntesis de ABA está controlada específicamente durante las distintas etapas del desarrollo.

En las hojas, la pérdida de turgencia celular es la señal que induce la biosíntesis de ABA.

El ABA se cataboliza por oxidación a ácido faseico, o por glucosilación al éster glucosílico de ABA.

El ABA interviene en muchos procesos fisiológicos como: la regulación de las relaciones hídricas controlando el cierre estomático, la maduración de semillas, la prevención de la germinación precoz y la adaptación a estreses ambientales como la sequía, salinidad, frío y heridas y lesiones mecánicas.

El ABA se compartimentaliza y redistribuye en las células en base a los gradientes de pH (Azcon-Bieto, 1993).

#### **2.4.5 Etileno**

El etileno es una de las moléculas reguladoras más sencillas de las plantas superiores. Su actividad biológica afecta a numerosos procesos del desarrollo y de la senescencia, y su acción tiene un papel central en la regulación de la maduración de frutos de numerosas especies, marchitamiento de flores, abscisión y en las respuestas a distintas situaciones de estrés.

Aunque la acción del etileno induce numerosas alteraciones en el hábito normal del crecimiento, estas respuestas pueden considerarse como parte de los mecanismos adaptativos desarrollados por las plantas frente a las alteraciones de las condiciones ambientales o ante las etapas finales de desarrollo.

La ruta de biosíntesis del etileno ha quedado establecida en la siguiente secuencia: metionina → S – adenosilmetionina → ACC → etileno. La síntesis de ACC, catalizada por la enzima ACC sintasa, constituye la etapa limitante de la producción de etileno (Azcon-Bieto, 1993).

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del área experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, que está ubicado en el Campo 4.

#### 3.2 Material biológico

El material vegetal fue obtenido de brotes provenientes del cultivo de ápices de *Wilcoxia* sp., de 1.5 a 2.0 cm de longitud; el cual fue previamente establecido y subcultivado *in vitro*, proporcionado por el M.C. Francisco Cruz Pizarro en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Los explantes se establecieron bajo condiciones asépticas.

#### 3.3 Medio de cultivo

La propagación de los tejidos vegetales *in vitro* se realizó con material en aislamiento y en condiciones totalmente asépticas.

Se fragmentaron los explantes en fracciones de 0.5 cm de largo, incubándolos en tubos de ensaye que contenían 12 ml de medio. El medio de cultivo que se utilizó fue el medio desarrollado por Cruz- Pizarro (Anexo 1).

Se evaluaron las citocininas Bencil Adenina (BA), Sulfato de Adenina (SA) y Kinetina (Kin) utilizando concentraciones 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg · L<sup>-1</sup>. Se maneja una concentración de AIB de 0.1 mg · L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.7 con HCl y NaOH, esterilizado en autoclave a 121° C (1.5 kg/ cm<sup>2</sup>) durante 25 min.

### 3.4 Condiciones de incubación

Los explantes incubados 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 oscuridad, la intensidad luminosa fue de  $47 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.5 Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar, con un total de 13 tratamientos y 19 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensaye, contenido en el explante y medio de cultivo (Cuadro 1).

El desarrollo operacional del diseño experimental se llevó a cabo por medio del programa estadístico SAS.

Cuadro 1. Tratamientos empleados en la proliferación de *Wilcoxia* sp.

| Tratamientos | Tipo de Citocininas | Concentración<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | Auxina<br>$\text{AIB mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | Relación<br>Cit/Aux |
|--------------|---------------------|--|---|---------------------|
| 1            | BA                  | 0.1  | 0.1   | 1 : 1               |
| 2            | BA                  | 0.5  | 0.1   | 5 : 1               |
| 3            | BA                  | 1.0  | 0.1   | 10 : 1              |
| 4            | BA                  | 1.5  | 0.1   | 15 : 1              |
| 5            | Sulfato de Adenina  | 0.1  | 0.1   | 1 : 1               |
| 6            | Sulfato de Adenina  | 0.5  | 0.1   | 5 : 1               |
| 7            | Sulfato de Adenina  | 1.0  | 0.1   | 10 : 1              |
| 8            | Sulfato de Adenina  | 1.5  | 0.1   | 15 : 1              |
| 9            | Kin                 | 0.1  | 0.1   | 1 : 1               |
| 10           | Kin                 | 0.5  | 0.1   | 5 : 1               |
| 11           | Kin                 | 1.0  | 0.1   | 10 : 1              |
| 12           | Kin                 | 1.5  | 0.1   | 15 : 1              |
| 13           | Sin Hormonas        | 0.0  | 0.1   | 0 : 0               |

Medio base: Cruz- Pizarro.

### 3.6 Variables evaluadas

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 a continuación se registraron los resultados.

Longitud de brotes, se observaron los brotes obtenidos de los explantes, los cuales se procedieron a medir por encima del tubo y los datos se registraron por cada unidad experimental.

Número de raíces, se realizó la anotación del desarrollo de brotes de raíz en las unidades experimentales, todo esto por medio de un conteo.

Longitud de raíces, se realizó midiendo con un escalimetro y por encima del tubo de ensaye, esto debido a que las raíces que se presentaron eran muy cortas.

Cabe señalar que la toma de resultados se llevó a cabo después de 45 días, tiempo en que los explantes estuvieron sometidos a los diferentes tratamientos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Número de Brotes

En la proliferación de acuerdo al análisis de varianza realizado (anexo 2) se encontraron diferencias altamente significativas para esta variable. Al analizar el tipo y concentración de citocinina, la máxima respuesta fue para la Bencil Adenina (BA), aún cuando esta se empleó a la mínima concentración se obtuvo 1.3 brotes por explante, en el nivel medio fue 4.0 brotes y al utilizar el máximo nivel considerado se desarrollaron 12 brotes en una proporción de BA/AIB de 15:1.

Durante el proceso de organogénesis Clayton et al (1992), mencionaron que uno de los aspectos para que se lleve a cabo este proceso es el empleo de niveles bajos de auxinas en combinación con niveles moderados de citocininas que son requeridos para la proliferación de brotes de cactáceas. Aun cuando emplea BA y AIB en la misma proporción se presentó respuesta en cuanto a proliferación se refiere, atribuido lo anterior quizás al efecto de la proliferación con la que se obtuvieron previamente los brotes lo que se ha denominado habituación como se observa en la gráfica 1 (Zimmerman, 1991). En la que se señala la capacidad espontánea, que es adquirida por los tejidos para sintetizar citocininas, aun en medios sin la presencia de la misma o bien en reducidas cantidades de ellas (Hopkins, 1999).

La anterior respuesta tiene como base que uno de los efectos en la relación que se establezca entre citocininas/auxinas es el desarrollo de brotes, es decir la caulogénesis en un proceso de organogénesis directa.

El modo de acción de los reguladores del crecimiento en la organogénesis indica de que el proceso está regulado por los cambios en los niveles hormonales endógenos de auxinas y citocininas (Azcon-Bieto, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La organogénesis puede ser explicada desde diversos puntos de vista como son la respuesta a la aplicación de hormonas y la interacción o relación que se establece entre ellas, así como estudios del desarrollo del explante, osmorregulación y competencia y determinación celular.

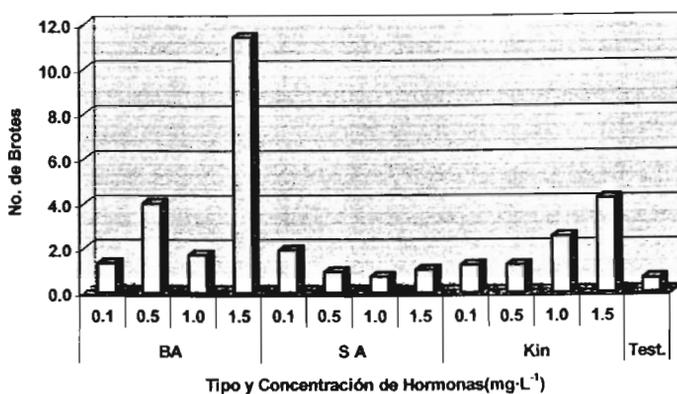
Al emplear el sulfato de adenina (SA) como fuente de citocinina, se registró el menor número de brotes por explante en comparación con los tratamientos evaluados con un número máximo de hasta dos brotes por explante para la relación citocinina/auxina 1:1 y un mínimo de 0.7 brotes para la relación 10:1. Tomando en consideración lo citado por Bajaj (1992) en lo referente que las hormonas empleadas para proliferación de cactáceas son específicas para cada especie, es importante señalar que no existen reportes sobre el uso del sulfato de adenina en las cactáceas.

La respuesta al uso de la Kinetina (Kin) en la proliferación mostró una correlación positiva, es decir al aumentar la concentración se incrementó la respuesta de 1.2 brotes para las concentraciones bajas y relaciones citocinina/auxina de 1:1, 5:1 hasta valores de 2.5 y 4.2 brotes/explante en las proporciones 10:1 y 15:1 lo que nos da una respuesta lineal (gráfica 1), sin embargo Anaya (1990) reportó que aun cuando empleó  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Kin solo logro el desarrollo de callo de *Astrophytum myriostigma*, al igual que Roy et al. (1991) en la propagación de Aloe vera, solo se indujo la formación de callo al emplear como fuente de citocinina la Kin  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , al igual Anicua et al. (2000) donde obtuvieron una respuesta máxima en la concentración de  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para el desarrollo de callo.

Cabe hacer mención que aún a su máxima respuesta solo representó el 33% de la respuesta máxima obtenida con la BA.

Se realizó la comparación de medias para la variable número de brotes (cuadro 2) donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

Gráfica 1. Promedio de las respuestas obtenidas de los tratamientos en la variable Número de brotes.



Cuadro 2. Comparación de medias que muestran las diferentes respuestas de los tratamientos en la variable Número de brotes.

| Tratamiento | Promedio (Número) |                |   |   |
|-------------|-------------------|----------------|---|---|
| 4           | 11.447a           |                |   |   |
| 12          | 4.275             | b <sup>z</sup> |   |   |
| 2           | 4.068             | b              | c |   |
| 11          | 2.553             | b              | c | d |
| 5           | 1.926             | b              | c | d |
| 3           | 1.737             |                | c | d |
| 1           | 1.368             |                |   | d |
| 9           | 1.268             |                |   | d |
| 10          | 1.216             |                |   | d |
| 8           | 1.068             |                |   | d |
| 6           | 0.932             |                |   | d |
| 7           | 0.779             |                |   | d |
| 13          | 0.653             |                |   | d |

<sup>z</sup> Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey (≤ 0.05)

En esta variable el número de brotes más bajo que se obtuvo se dio en el tratamiento testigo con 0.6 brotes, se tuvieron resultados a pesar de que se consideró una relación citocinina/auxina de 0:0. Al no utilizar citocinina o auxina no estimuló la proliferación de brotes, la organogénesis en menor grado se llevó a cabo, quizás al referido proceso de habituación. Al respecto Tran Thanh Van (1978) estudio la morfogénesis en capas celulares y encontró que el pasado del explante determina la respuesta morfogénica hacia sustancias exógenas aplicadas y que este pasado resulta de las características inherentes de la planta donadora u origen.

Durante el desarrollo del experimento en los registros de los resultados, se observó que el 60% de las unidades experimentales mostraban en las primeras etapas del desarrollo de los brotes de las cactáceas y que en este caso se utilizó *Wilcoxia* sp., hacia la base de los explantes, masas de células que constituyen un callo del tipo friable de color blanquecino y con la presencia de clorofila. Este tipo de tejido se presentó en explantes que presentaban brotes y también en los que no.

## Longitud de brotes

Para la variable longitud de brotes se obtuvieron diferencias significativas debido al análisis de varianza (anexo 3). La mayor longitud de brotes se presentó en términos generales al emplear BA como fuente de citocinina, la máxima respuesta que fue de 6.5 mm se dio en el tratamiento 1 correspondiente a una proporción citocinina/auxina de 1:1 seguido del tratamiento 4 con una proporción 15:1 con 5.3 mm y teniendo una diferencia de 1.2 mm entre este tratamiento y el 1. Y valores menores se mostraron en los tratamientos 3 y 2 con 4.9 y 4.8 mm respectivamente (gráfica 2).

Generalmente la brotación y la longitud del brote presentan inhibición correlativa es decir a menor número de brotes una mayor longitud potencial de los mismos (Zimmerman 1991, Cruz-Pizarro 2000, Hartmann 1988).

Anicua et al. (2000) obtuvieron respuesta de una mayor longitud en *Mammillaria* a  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de BA, contrastando con lo obtenido en esta investigación.

Otros factores que pueden influir en la respuesta a la longitud del brote es el tipo de agente gelificante y la concentración del mismo en donde González (2001) obtuvo la mejor respuesta al emplear Agar Gel-rite, comparado con Agar Bioxon, Agar Sigma y Phytigel.

Al utilizar como fuente de citocinina el SA fue el que presentó una menor respuesta para esta variable, comparable incluso al testigo (gráfica 2).

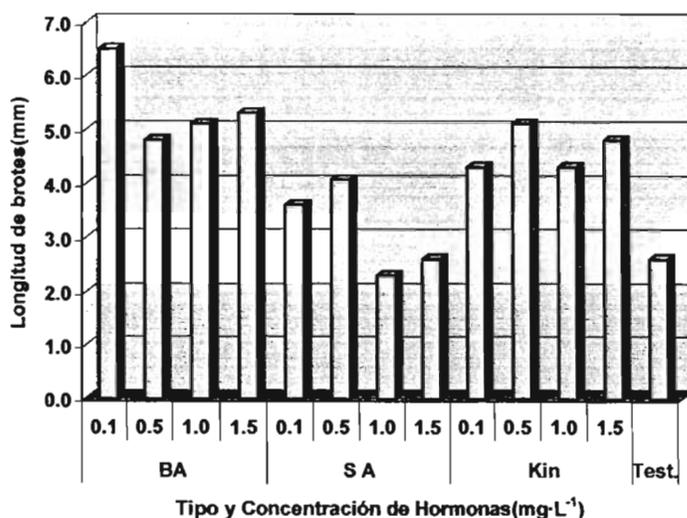
De acuerdo a la revisión de literatura y lo expresado por Ladyman et al. (1992); Sanderson et al. (1986); Singha (1984); De Oliveira et al. (1995); Flores-León et al. (2000); citados por González (2001) pocos trabajos hacen hincapié en parámetros de calidad de los brotes como la longitud, generalmente hacen referencia a otras variables como lo es el número de brotes y presencia de brotes vitrificados (Anicua et al, 2000).

Las proporciones mayores de SA/AIB (10:1 y 15:1) reportaron la menor longitud del brote (2.3 y 2.6 mm respectivamente) lo que representa un 35% del testigo. La tendencia que mostraron en general para esta hormona, en cuanto a las

respuestas obtenidas nos indica una correlación negativa entre el SA y la longitud de brote. Para las especies de cactáceas no existen reportes en los que se haya empleado el SA y se haga referencia de la longitud del brote obtenido.

Con respecto a Kin la mayor longitud de brotes se dio en el tratamiento 10, con una proporción citocinina/auxina de 5:1 con 5.1 mm, los tratamientos precedentes fueron el 12 con una proporción 15:1 (4.8 mm), el 9 y el 11 (ambos con 4.3 mm) no manifestando una tendencia definida, teniendo mejor respuesta en las concentraciones menores. Sin embargo Anicua et al. (2000) mencionaron que los brotes que se generan *in vitro* son de longitud inferior a los que se presentan en condiciones *in vivo*, obteniendo respuesta con Kin a  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  situación que no se presenta en el presente trabajo

Gráfica 2. Promedio de las respuestas obtenidas en los diferentes tratamientos con respecto a la variable Longitud de brotes.



La comparación de medias mostró que presentan resultados estadísticamente diferentes entre sí (cuadro 3) y se tiene que el tratamiento 1 es 19% mayor que el

que le precede. Este mismo tratamiento en comparación con el 2 que fue el de más bajo valor, es 64% mayor.

Cuadro 3. Comparación de medias de la variable Longitud de Brotes en los diferentes tratamientos utilizados.

| Tratamiento | Promedio (mm) |                |   |   |   |
|-------------|---------------|----------------|---|---|---|
| 1           | 6.558         | a <sup>z</sup> |   |   |   |
| 4           | 5.316         | a              | b |   |   |
| 3           | 5.179         | a              | b |   |   |
| 10          | 5.116         | a              | b | c |   |
| 2           | 4.832         | a              | b | c | d |
| 12          | 4.800         | a              | b | c | d |
| 11          | 4.358         | a              | b | c | d |
| 9           | 4.300         | a              | b | c | d |
| 6           | 4.079         | a              | b | c | d |
| 5           | 3.668         |                | b | c | d |
| 8           | 2.629         |                |   | c | d |
| 13          | 2.612         |                |   | c | d |
| 7           | 2.368         |                |   |   | d |

<sup>z</sup> Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey ( $\leq 0.05$ )

Como sucedió en la variable anterior el tratamiento testigo obtuvo resultados a pesar de no contener ningún nivel de hormonas (cuadro 3) y quedando en penúltimo lugar con 2.6 mm, quedando arriba del 7 con una diferencia de 0.2 mm.

En los tratamientos donde la proliferación de brotes fue mayor, se presentaban brotes delgados, debido probablemente a la competencia existente entre ellos, tal y como hacen mención Ault y Blackmon (1987), citados por Anicua et al. (2000) sobre la competencia en la proliferación de brotes.

En la mayoría de los tratamientos especialmente en el 4, se observó un brote más alargado que los otros. Al respecto Hartmann (1988) señala que con frecuencia una masa proliferante de tallos tiene un brote alargado que tiende a inhibir al número mayor de brotes más cortos.

## Número de raíces

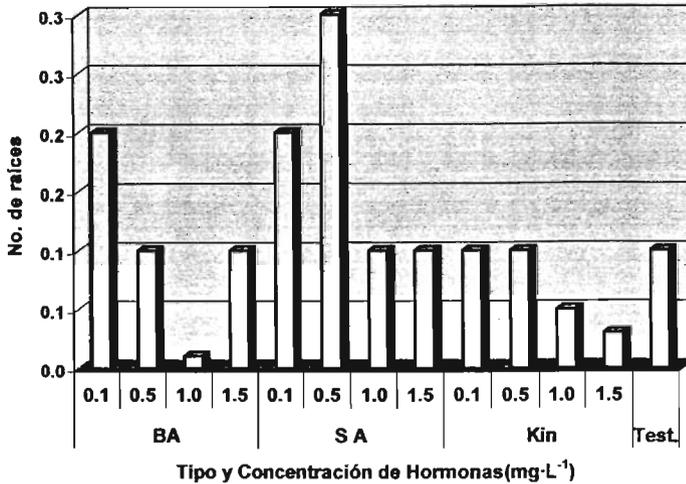
De acuerdo al análisis de varianza (anexo 4) se encontraron diferencias significativas en cuanto a número de raíces se refiere. Cabe hacer mención que el objetivo del presente trabajo fue lo relativo a la proliferación, sin embargo de manera general se presentó la emisión de raíces en todos los tratamientos, presentando variación en cuanto a número y longitud, aunque no se empleara medios específicos para el enraizamiento.

Con respecto a BA, el mayor número se encontró en el tratamiento 1 con una proporción citocininas/auxinas 1:1 (0.2 raíces en promedio por tratamiento), seguido del 4 con una proporción 15:1 (0.18 raíces), el 2 con una proporción 5:1 (0.10 raíces) y el 3 con una proporción 10:1 (0.01 raíces).

Si bien en aspectos de proliferación al emplear BA se registró los mayores parámetros del mismo, como lo son el número y longitud de brotes, para el enraizamiento, específicamente en lo relativo al número de raíces formadas por explante no tuvo la misma respuesta (gráfica 3).

Al llevar a cabo la correlación de la variable y la concentración, se determinó un valor negativo significando que al incrementar la concentración de BA los resultados obtenidos para la variable fueron decreciendo (gráfica 3).

Gráfica 3. Promedio de Número de Raíces obtenidos en los diferentes tratamientos.



En la rizogénesis que es otro de los factores involucrados en la organogénesis vegetal, ocurren una serie de eventos de tipo anatómico y fisiológico, los que comprenden la inducción, iniciación y diferenciación radical, requiriendo de una modificación en la proporción citocinina/auxina, a favor de estas últimas involucradas directamente en el proceso de enraizamiento (Azcon-Bieto 1993, Salisbury 2000, Hartmann 1988) particularmente en la inducción radical sin embargo, concentraciones elevadas inhiben el proceso de diferenciación y crecimiento de las raíces, pudiendo estar asociado este proceso a la producción de etileno estimulada por una determinada concentración de auxinas.

Típicamente las citocininas se observan como inhibidores del proceso de enraizamiento (Van y Harty, 1988 citados por Anicua et al, 2000); sin embargo, las investigaciones en este campo todavía no hacen posible explicar la respuesta, debido a que no se conocen plenamente los diversos efectos de las citocininas en el metabolismo de la planta. En oposición a lo citado, de Llano (1989) citado por

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Anicua et al. (2000), señalo que las citocininas también llegan a inducir formación de raíces considerando el umbral de concentraciones de las auxinas., del tal forma que el porcentaje primordios de raíz fue mayor cuando se adiciona al medio BA (88%), en comparación con Kin (36%) y Zeatina (46%).

Jonson y Emino (1979) citado por Anicua et al. (2000), mencionan que trabajando con diversas especies de cactáceas obtuvieron una buena proliferación de callo y desarrollo de raíces en la mayoría de los cultivos.

Sin embargo, algunas especies solamente respondieron formando callos pequeños e incluso algunos no presentaron respuesta. Estos resultados sugieren que cada especie requiere de una relación específica y única de auxina y citocinina para ciertas respuestas, de igual manera Mauseth (1977) observó que con varias combinaciones de BAP se estimuló el crecimiento de callo en cactáceas produciendo ocasionalmente raíces tal y como sucedió con los explantes de *Wilcoxia* sp.

Para SA, los valores obtenidos fueron los mayores registrados. Teniendo que el tratamiento 6 con una proporción citocinina/auxina 5:1 con 0.30 raíces por explante fue el valor más alto, seguido del 5 con una proporción citocinina/auxina 1:1 con 0.21 raíces, el 7 con proporción citocinina/auxina 10:1 con 0.13 raíces y el 8 con la proporción citocinina/auxina 15:1 con 0.10 raíces. Tomando en consideración estos valores se presentó una correlación negativa, determinando que al aumentar la concentración de SA tiende a disminuir el número de raíces por que la influencia de la citocinina sobre la variable inhibe el aumento de sus valores.

Es importante señalar que si bien con el SA se obtuvo una menor respuesta a las variables ligadas a la proliferación como lo fueron el número y longitud de brotes para la variable número de raíces obtuvo la mejor respuesta de hasta 19 veces la respuesta menor de BA, 10 veces mas que la menor de Kin y 2.6 veces mas que el testigo.

Para Kin el mayor número se obtuvo en el tratamiento 9 con 0.18 raíces, le precedió el 10 con 0.10, el 11 con 0.05 y el 12 con 0.03 raíces. Con una tendencia a una correlación negativa, por lo que al aumentar la concentración disminuyó el número de raíces.

Dentro de los intervalos que se marcan en la comparación de medias (cuadro 4), se observó que los tratamientos muestran diferencias significativas estadísticamente.

Cuadro 4. Comparación de medias de la variable Número de Raíces de los tratamientos.

| Tratamiento | Promedio |                |   |
|-------------|----------|----------------|---|
| 6           | 0.3053   | a <sup>z</sup> |   |
| 1           | 0.2105   | a              | b |
| 5           | 0.2105   | a              | b |
| 4           | 0.1842   | a              | b |
| 9           | 0.1842   | a              | b |
| 7           | 0.1316   | a              | b |
| 13          | 0.1176   | a              | b |
| 2           | 0.1053   | a              | b |
| 8           | 0.1053   | a              | b |
| 10          | 0.1053   | a              | b |
| 11          | 0.0526   |                | b |
| 12          | 0.0313   |                | b |
| 3           | 0.0158   |                | b |

<sup>z</sup> Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey ( $\leq 0.05$ )

Por lo que al comparar el tratamiento 6 con el que le precede, se tuvo que el 6 fue 31% mayor y 95% que el tratamiento 3, el cual produjo el valor más bajo. Ault y Blackmon (1987) citado por Bajaj (1992), mencionaron que los altos niveles de citocininas usados para la proliferación provocan problemas en el enraizamiento,. Taiz y Zeiger (1998) señalaron que en la respuesta inducida por las hormonas se

debe de considerar la relación que guardan entre sí, así como la interacción que tengan con otras particularmente la relación citocinina/auxina lo que orienta la vía de la respuesta, así como la concentración endógena de la misma que puede llegar a alterar el equilibrio establecido entre ellas,

Cabe señalar que la concentración de auxina ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de AIB) fue constante para todos los tratamientos excepto en el tratamiento testigo donde se omitió el uso de auxinas y citocininas.

Probablemente lo que ocasiono que no se tuviera una más alta y representativa generación de raíces, fue por la concentración que se utilizó de auxina y citocinina, al respecto Salazar (1994), citó también que las auxinas inhiben el crecimiento radical si es aplicada en concentraciones altas.

Y también probablemente se debió por el lapso de tiempo que transcurrió desde que se sometieron los explantes a los tratamientos y la toma de resultados, el cual fue de 45 días.

En algunos casos la raíz se desarrollo a partir de la base de los brotes pero en otros la raíz emergía de algunas partes del explante que aún presentaban desarrollo de callo. Tal y como ocurrió en la investigación de Anicua et al. (2000), estos resultados se presentaron en *Mammillaria bocasana* y *M. carmenae*. Señalando que la formación de raíz se puede originar porque durante el período de estrés hídrico (empíricamente) muchos cactus son capaces de producir raíces adventicias del tejido vascular suministrado por la aréola. Las concentraciones de sales, sacarosa y agar pueden ocasionar un déficit hídrico y este un estrés hídrico (Mauseth y Halperin, 1975 citado por Anicua et al, 2000).

Aparte de las hormonas existen otros factores que influyen en la formación de las raíces en los cultivos *in vitro*. Factores como la luz generalmente tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces.

Las plantas que han sido cultivadas en la oscuridad (etioladas), enraízan con más facilidad que las crecidas a la luz, como ocurre en *Prunus cerasifera* (Hammerschlag, 1982 citado por Pierik, 1990).

Las irradiancias altas inhiben la formación de raíces, más que las irradiancias bajas.

Economou y Read (1986) citados por Pierik (1990) demostraron, trabajando con híbridos de *Petunia*, que los vástagos desarrollados con luz roja desarrollaban raíces en mayor cantidad y más fuertes, que aquellos tratados con luz de longitud de onda del rojo-lejano.

Otro factor que influye son las diversas sustancias que se le agregan a los medios de cultivo. Cheema y Sharma (1983) y Preil y Engelhardt (1977) citados por Pierik (1990), demostraron que el carbón activado juega un importante papel en la formación de raíces adventicias.

Se le pueden atribuir dos efectos: La adsorción de todos los compuestos orgánicos, con excepción de los azúcares, y la falta de suministro de luz a los medios nutritivos.

Esta variable no fue muy sobresaliente en todos los tratamientos, como ya se menciona, tal vez fue provocado por el tipo de auxina utilizada, o por la concentración que se maneja, o tal vez por los niveles de citocininas.

Probablemente la aparición de algunas raíces se debió a que como reporta Clayton (1990), muchas cactáceas presentan la capacidad para producir excesos de auxinas *in vitro* y como reportan también Ault y Blackmon (1987) citado por Bajaj (1992) en *Ferocactus acanthodes* mostró un enraizamiento espontáneo en un medio de cultivo sin auxina al igual que *Opuntia amyclaea*.

## **Longitud de raíces**

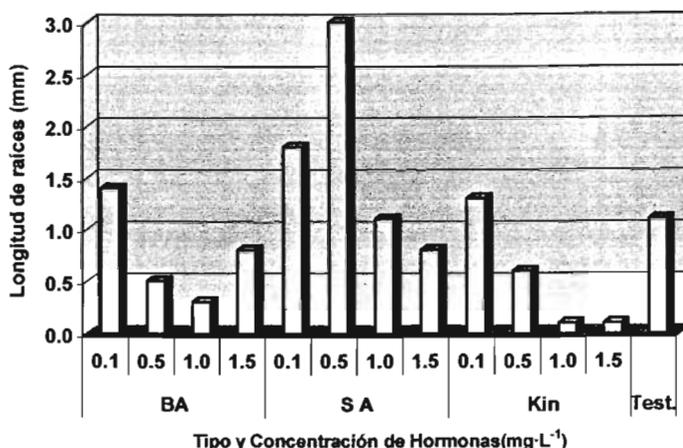
De acuerdo al análisis de varianza (anexo 5) se encontraron diferencias significativas en cuanto a longitud de raíces se refiere. Esta variable por los resultados obtenidos no ejerció un mayor significado con respecto a las variables involucradas en la proliferación de brotes, debido a que de manera general se presentó la emisión de raíces en todos los tratamientos, presentando variación en cuanto a número y longitud, aunque no se empleara medios específicos para el enraizamiento.

Con respecto a BA, la mayor longitud se presentó en el tratamiento 1 con una proporción citocinina/auxina 1:1 (1.4 mm en promedio por tratamiento), seguido del 4 con una proporción 15:1 (0.8 mm), el 2 con una proporción 5:1 (0.5 mm) y el 3 con una proporción 10:1 (0.3 mm).

Si bien en aspectos de proliferación se registró los mayores parámetros del mismo, como lo son el número y longitud de brotes, al emplear BA; para el enraizamiento, específicamente en lo relativo a la longitud de raíces formadas por explante no tuvo la misma respuesta (gráfica 3).

Al llevar a cabo la correlación de la variable y la concentración, se determinó un valor negativo significando que al incrementar la concentración de BA los resultados obtenidos para la variable fueron decreciendo (gráfica 3). Este mismo comportamiento para BA se observó en la variable número de raíces.

Gráfica 4. Promedio de los efectos obtenidos en la variable Longitud de Raíces en los tratamientos.



Para SA, los valores obtenidos fueron los mayores registrados. Teniendo que el tratamiento 6 en el que existió una proporción citocinina/auxina de 5:1, con 3.0 mm por explante fue el valor más alto, seguido del 5 con 1.8 mm, el 7 con 1.1 mm y el 8 con 0.8 mm. Se presentó una correlación negativa tomando en consideración estos valores, determinando que al aumentar la concentración de SA tiende a disminuir la longitud de las raíces por que la influencia de la citocinina sobre la variable inhibe el aumento de sus valores.

Es importante señalar que si bien con el SA se obtuvo una respuesta menor para las variables ligadas a la proliferación, como lo fueron el número y longitud de brotes sin embargo, en la variable número de raíces obtuvo la mejor respuesta de hasta 9 veces la respuesta menor de BA, 24 veces mas que la menor de Kin y hasta 3 veces mas que el testigo, pudiendo haber tenido efecto lo señalado por Burch y McGaw (1993) en lo relativo a que las auxinas pueden regular el efecto de las citocininas diferencialmente en forma indirecta a través del incremento en la actividad de la citocinina-oxidasa, por lo que para algunas de ellas se requieren

cantidades mayores para estimular algunos procesos como la proliferación, existiendo reportes desde 50 hasta 250 mg · L<sup>-1</sup> al emplear sulfato de adenina.

Para Kin la mayor longitud se obtuvo en el tratamiento 9 en una proporción citocinina/auxina de 1:1 con 1.3 mm, le precedió el 10 con 0.6, el 11 con 0.15 mm y el 12 con 0.12 mm. Presentando una correlación negativa, por lo que al aumentar la concentración disminuyó la longitud de las raíces desarrolladas en el brote. Con un comportamiento similar a la variable número de raíces.

Cabe señalar que los tratamientos mostraron una tendencia de comportamiento similar para las variables número y longitud de raíces involucradas en la rizogénesis, mostrando que los intervalos correspondientes a las respuestas de los diferentes tratamientos en las citocininas usadas, se ubicaron en los mismos lugares al comparar las gráficas (3 y 4) de dichas variables. Al respecto considerando lo propuesto por Segura (1993) en el sentido de que las citocininas favorecen la formación de raíces, podría estar ligado a la concentración interna de la hormona que estimula el proceso específico de la respuesta morfogénica,

Dentro de los intervalos que se marcan en la comparación de medias (cuadro 5), se observó que los tratamientos muestran diferencias significativas estadísticamente.

Por lo que al comparar el tratamiento 6 con el que le precede, se tuvo que el 6 fue 39% mayor y 96% que el tratamiento 12, el cual produjo el valor más bajo, mismo que corresponde a una proporción mayor de citocinina/auxina de 15:1 específicamente para la Kin. Cabe hacer mención que el testigo presentó una mayor respuesta (casi el doble) que el tratamiento antes señalado

Cuadro 5. Comparación de medias de la variable Longitud de Raíces en los tratamientos utilizados.

| Tratamiento | Promedio |                |   |
|-------------|----------|----------------|---|
| 6           | 3.0474   | a <sup>z</sup> |   |
| 5           | 1.8684   | a              | b |
| 1           | 1.4895   | a              | b |
| 9           | 1.3895   | a              | b |
| 13          | 1.1529   |                | b |
| 7           | 1.1053   |                | b |
| 8           | 0.8579   |                | b |
| 4           | 0.8105   |                | b |
| 10          | 0.6053   |                | b |
| 2           | 0.5000   |                | b |
| 3           | 0.3474   |                | b |
| 11          | 0.1579   |                | b |
| 12          | 0.1250   |                | b |

<sup>z</sup> Letras iguales son estadísticamente similares entre sí de acuerdo a Tukey ( $\leq 0.05$ )

Es importante señalar que la mayoría de los trabajos toman en cuenta otras variables como el inicio de formación de raíz mas no hacen hincapié en el número y longitud de estas.

La presencia o aplicación de algún tipo de auxina y su concentración lo utilizan para la obtención de callo. Donde evalúan la apariencia y el inicio de su formación.

Explican además las influencias que probablemente estuvieron involucradas para la formación de raíces, pero no tocan el punto de la calidad como la longitud.

Como se menciona en la variable número de brotes, probablemente la calidad de las raíces como la longitud, las cifras obtenidas fueron a consecuencia del lapso de tiempo en que se sometieron los explantes en los tratamientos; el cual constó de 45 semanas.

## CONCLUSIONES

1. Es factible la Micropropagación de *Wilcoxia* sp. con la técnica empleada, esta especie presentó una respuesta diferencial a las hormonas aplicadas.
2. El balance establecido entre citocinina/auxina afectó la organogénesis (caulogénesis y rizogénesis) que ocurre en el cultivo *in vitro* de esta especie. Las citocininas empleadas tuvieron efectos sobre la capacidad organogénica de *Wilcoxia* sp.
3. La citocinina que mejor efecto tuvo en la proliferación de *Wilcoxia* sp. fue la Bencil Adenina a una concentración de  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  obteniendo hasta 12 brotes en promedio.
4. Con Kinetina la máxima respuesta fue a la concentración de  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  con 4.2 brotes en promedio, seguida del Sulfato de Adenina su máxima proliferación fue a una concentración de  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  con 1.9 brotes en promedio.
5. La mayor longitud de brotes, se logró con BencilAdenina a una concentración de  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  con 6.5 mm de longitud en promedio.

6. Con la Kinetina la mejor respuesta para longitud de brotes fue a una concentración de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  con 5.1 mm de longitud en promedio. Mientras que el Sulfato de Kinetina mostró efectos a una concentración de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  con 4.07 mm de longitud en promedio.
  
7. Con respecto a la rizogénesis en *Wilcoxia* sp., el sulfato de adenina sobresalió en las variables número y longitud de raíces, con una concentración de  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  presentando 0.3 raíces y 3.0 mm como los valores más altos obtenidos para esas variables.
  
8. No se presentó en ningún caso vitrificación de explantes al estar expuestos a las concentraciones de citocininas utilizadas.

## VI BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja M. R., 1993. Micropropagation of Woody Plants. Edic. 1ª. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp. 4-10.
- Anaya S. A., 1990. Optimización en la proliferación de callo e inducción de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* var. potosina. Tesis (Licenciado en Biología), UNAM México 100 p.
- Anicua F. J. y Rivas B. R. V., 2000. Micropropagación y Evaluación del estatus metabólico *in vitro* de 3 especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción. Tesis(Licenciado en Biología), UNAM México 110 p.
- Arreola J., 1997. Formas de Vida y Características Morfológicas. Compilación CONABIO. México. pp. 113.
- Azcon-Bieto J. y M. Talon, 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Edic. 1ª. McGraw-Hill. España. pp. 327-357.
- Bajaj Y. P. S., 1992. Biotechnology in Agriculture and Forestry 20. High-Tech and Micropropagation IV. Springer-Verlag. Alemania. pp. 49-68.
- Barceló C. J. y Nicolás R. G., *et al*, 2001. Fisiología Vegetal. Edic. 1ª. Pirámide. España. pp. 307-376.
- Bidwell R. G. S., 1990. Fisiología Vegetal. Edic 1ª. AGT. México. pp. 600-625.
- Bravo-Hollis H., 1978. Las Cactáceas de México. Edic. 2ª. UNAM, México. pp. 1-10, 399.

- Bravo-Hollis H. y Scheinvar L., 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Edic. 1ª. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 20-61, 104-107.
- Bravo-Hollis H., 1999. El Maravilloso Mundo de las Cactáceas. Edic. 2ª. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 135-136.
- Burch, R. L y B. A. McGaw. Citocininas. In Fisiología y Bioquímica Vegetal. Coord. J. Azcon-Bieto y M. Talon, Edt. Interamericana McGraw-Hill. España, pp 319-326.
- Cruz P. F., 2000. Niveles de sacarosa y relación nitrato de amonio  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  en el cultivo *in vitro* de brotes de vid (*Vitis vinifera*) " Malaga roja ". Tesis de maestría Colegio de Posgraduados Montesillo, Texcoco Edo. México.
- Cubero J. I., 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Edic. 2ª. Mundi-Prensa. España. 353-362.
- Davies J. P., 1995. Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Edic. 2ª. Kluwer Academic Publishers. E.U.A. pp. 778-782.
- Flores D. F., 1990. Propuesta de manual de técnicas selectas de Micropropagación para algunas especies vegetales. Tesis (Licenciado en Biología), UNAM México 80 p.
- Fuentes M. V. y Martínez M. N., 2001. Micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de aréolas activadas *in vitro* por etiolación. Tesis (Licenciado en Biología). UNAM México 35p.
- González R. E., 2001. Micropropagación de *Mammillaria* spp. Tesis (Ingeniero Agrícola), UNAM México 67 p.

- Hartmann T. H. y Kester E. D., 1988. Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. Edic. 2ª. Reimpresión 5ª 1997. Continental. México. pp. 16.
- Hopkins, W. G. 1999. Introduction to Plant Physiology. Second Edition John Wiley & Sons, Inc. USA. pp. 309-340.
- Márquez D. E., 2000. Manual Técnico para propagar cactáceas. Tesis (Ingeniero Agrícola), UNAM México 111 p.
- Medina G. S., 2000. Estudios sobre Micropropagación de *Saccharum officinarum* a partir de yemas axilares. Tesis(Licenciado en Biología), UNAM México 93 p.
- Moreno C. A., 2003. Autodiagnóstico a partir de criterios de sustentabilidad de "Ecología productiva CHUTA S.P.R. de R.L." organización reproductora de cactáceas y otras suculentas. Tesis (Ingeniera Agrícola), UNAM México 140
- Pierik R. L. M., 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Edic. 2ª. Mundi-Prensa. España. pp.
- Reyes S. J. y Gutiérrez A, 1994. Taller de Propagación de Cactáceas. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. pp. 112.
- Roy S. C. and Sarkar A., 1991. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Hortic.*, 47: 107-113.
- Salazar M. D., 1994. Ampliación de Cultivos Leñosos, Notas de Fruticultura. Edic. 1ª. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 52-56.
- Salisbury B. F., 1994. Fisiología Vegetal. Edic. 1ª. Iberoamérica. México. pp. 395-410.

- Salisbury B. F. y Ross W. C., 2000. Desarrollo de las Plantas y Fisiología Ambiental. Edic. 1ª. Paraninfo. España. pp. 565-634.
- Segura, J. 1993. Morfogénesis *in vitro*. In Fisiología y Bioquímica Vegetal. Coord. J. Azon-Bieto y M. Talon, Edt. Interamericana McGraw-Hill. España, pp 381-392.
- Taiz, L. and E. Zeiger, 1998. Plant Physiology. Edic. 2ª. Sinauer Associates, Inc., Publishers. E.U.A. pp. 621-648.
- Trigriano N. R., and Gray J. D., 2000. Plant Tissue Culture, Concepts and Laboratory Exercises. Edic. 2ª. CRC. E.U.A. pp. 125-136.
- Vázquez Y., 1997. Semblanza Histórica del Uso de las Cactáceas. Compilación CONABIO. México. pp. 13.
- Zimmerman R. H. and Debergh P. C., 1991. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Edic. 1ª. E.U.A. pp 1-15.

## ANEXO 1

Composición del medio basal en el establecimiento *in vitro* de *Wilcoxia* sp.

| Compuesto Químico                                    | Peso Molecular | Concentración<br>(mM ó µM) | Concentración<br>(mg·L <sup>-1</sup> = ppm) |
|--|----------------|----------------------------|---|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 80             | 2.5 mM                     | 200   |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 236            | 1.25 mM                    | 295   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 136            | 1.25 mM                    | 170   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 246            | 1.50 mM                    | 369   |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 101            | 5 mM                       | 505   |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 278            | 0.09 mM                    | 25  |
| Na-Edta  | 380            | 0.10 mM                    | 38  |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                  | 169            | 5 µM                       | 0.84  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 62             | 100 µM                     | 6.1   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 242            | 1 µM                       | 0.24  |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 287            | 30 µM                      | 8.6   |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 249            | 0.1 µM                     | 0.0000249                                   |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 238            | 0.1 µM                     | 0.0000238                                   |
| Mio-inositol   | 180            | 0.55 mM                    | 100   |
| Tiamina-HCl  | 337            | 0.29 µM                    | 0.1   |
| Piridoxina-HCl                                       | 205            | 2.44 µM                    | 0.5   |
| Ac. Nicotínico                                       | 123            | 4.07 µM                    | 0.5   |
| Sulfato de Adenina <sup>(1)</sup>                    | 184            | 0.54, 2.7, 5.4, 8.1        | 0.1, 0.5, 1.0, 1.5                          |
| Kin <sup>(1)</sup>                                   | 215            | 0.46, 2.3, 4.6, 6.9        | 0.1, 0.5, 1.0, 1.5                          |
| BA <sup>(1)</sup>                                    | 225            | 0.44, 2.2, 4.4, 6.6        | 0.1, 0.5, 1.0, 1.5                          |
| AIB  | 203            | 0.49 µM                    | 0.1   |
| Sacarosa   | 342            | 0.0878 M                   | 30 000                                      |
| Agar   |                |                            | 6 000                                       |

<sup>(1)</sup> Adicionada (en diferentes concentraciones) para su evaluación expresada en µM.

PH ajustado a 5.7

Fuente: Cruz-Pizarro 2000.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ANEXO 2

Análisis de Varianza de la variable número de brotes (según el programa estadístico SAS).

| FV     | G.L. | SC      | CM     | FC    | Pr > F   |
|--------|------|---------|--------|-------|----------|
|        |      |         |        |       |          |
| Trat   | 12   | 1919.26 | 159.93 | 11.77 | <.0001 * |
|        |      |         |        |       |          |
| Modelo | 30   | 2343.02 | 78.10  | 5.75  | <.0001 * |
|        |      |         |        |       |          |
| Error  | 211  | 2867.00 | 13.58  |       |          |
|        |      |         |        |       |          |
| Total  | 241  | 5210.03 |        |       |          |
|        |      |         |        |       |          |

R-Square    Coeff Var    Root MSE    NumB Mean

0.449715    144.2511    3.686152    2.555372

### ANEXO 3

Análisis de Varianza de la variable longitud de brotes (según el programa estadístico SAS).

| FV     | G.L. | SC      | CM    | FC   | Pr > F    |
|--------|------|---------|-------|------|-----------|
| Modelo | 30   | 601.64  | 20.05 | 1.30 | 0.1443 NS |
| Trat   | 12   | 334.12  | 27.84 | 1.81 | 0.0480 *  |
| Error  | 211  | 3244.35 | 15.37 |      |           |
| Total  | 241  | 3846.00 |       |      |           |

|          |           |          |          |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | LB Mean  |
| 0.156434 | 91.16963  | 3.921236 | 4.301033 |

#### ANEXO 4

Análisis de Varianza de la variable número de raíces (según el programa estadístico SAS).

| FV     | G.L. | SC    | CM   | FC   | Pr > F    |
|--------|------|-------|------|------|-----------|
| Modelo | 30   | 4.60  | 0.15 | 1.30 | 0.1440 NS |
| Trat   | 12   | 1.48  | 0.12 | 1.05 | 0.4016 NS |
| Error  | 211  | 24.80 | 0.11 |      |           |
| Total  | 241  | 29.40 |      |      |           |

R-Square    Coeff Var    Root MSE    NumR Mean

0.156483    250.6609    0.342846    0.136777

## ANEXO 5

Análisis de Varianza de la variable longitud de raíces (según el programa estadístico SAS).

| FV     | G.L. | SC      | CM    | FC   | Pr > F    |
|--------|------|---------|-------|------|-----------|
| Modelo | 30   | 430.94  | 14.36 | 1.92 | 0.0042 *  |
| Trat   | 12   | 144.10  | 12.01 | 1.61 | 0.0908 NS |
| Error  | 211  | 1575.01 | 7.46  |      |           |
| Total  | 241  | 2005.96 |       |      |           |

R-Square    Coeff Var    Root MSE    LR Mean

0.214834    261.3338    2.732126    1.045455