



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentallophus*, cactáceas nativas de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SAMANTA SAUCEDO GUTIÉRREZ

Director de tesis: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila



Facultad de Ciencias
UNAM

2006



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.

1. Datos del alumno

Saucedo

Gutiérrez

Samanta

56 58 75 57

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

09960930-4

2. Datos del tutor

Dr.

Víctor Manuel

Chávez

Ávila

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Angel Salvador

Arias

Montes

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Juana Mabel

Hernández

Altamirano

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Bárbara Susana

Luna

Rosales

6. Datos del sinodal 4

Biol.

Gabriel

Olalde

Parra

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentalophus*, cactáceas nativas de México.

154 p

2006

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila y con el apoyo económico de PAPIIT con el proyecto IN227805, titulado: "Regeneración in vitro de cactáceas, estrategia para la conservación y aprovechamiento de especies amenazadas"

A mis padres, con todo mi cariño, amor y admiración

A Masi, mi segunda madre y Alin, mi primita adorada

A Lola, mi angel de la guarda

A Paco, mi amor

A Elia y Blanca, mis hermanas

A Sandra y Diana, mis amigas del alma

A Mabel, amiga, guía y ejemplo

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por todo el amor, cariño, apoyo y comprensión. Gracias porque gracias a ti, pude lograr esta meta tan importante en mi vida. Gracias por inculcarme el amor a la naturaleza. Gracias por ser amor y ejemplo, gracias por darme la vida y brindarme todo tu amor y comprensión para llegar hasta este momento.

A mi papá, por todo tu amor, apoyo y gran ejemplo. Gracias por inculcarme que si uno realmente quiere algo en esta vida hay que trabajar duro para lograrlo.

A Masi por ser una segunda madre para mi, gracias por cuidarme, apoyarme y escucharme. Gracias por tu ejemplo y amor.

A Alin, mi primita adorada, gracias por ser una hermana para mi, gracias por el apoyo y amistad durante toda mi vida. Gracias por siempre apoyarme con ideas y desvelos durante la carrera.

A Lola, por ser un ejemplo a seguir, te dedico este trabajo y todas las cosas lindas que viví en la carrera, gracias porque mientras que la vida te lo permitió me brindaste tu apoyo y ánimos para hacer lo que yo quería.

A Paco, no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo, paciencia y amor que me brindaste para la realización de este trabajo, sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por haber aparecido en mi vida, gracias por existir. Gracias por ser ejemplo de perseverancia y fortaleza para hacer las cosas. TE AMO...

Al Dr. Chávez por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio de CTV. Gracias por todo su amistad, apoyo y por ser ejemplo de humanidad. Gracias por compartir sus conocimientos. Gracias por todos sus cuidados y ánimos.

A Mabel por todo tu apoyo académico, pero sobre todo por tu amistad. Gracias por ser ejemplo, gracias por toda tu ayuda y consejos para la realización, redacción, estructuración y revisión de este trabajo.

A Susan por todo tu apoyo en la realización de este trabajo. Gracias por ayudarme con la segunda especie de mi tesis, por ser un gran equipo, por ser amiga.

A Gabriel porque gracias a ti estoy en el rollo de los cactus, gracias por todo tu apoyo, amistad y consejos.

A Bárbara por todo tu apoyo incondicional y enseñanzas.

A Salvador Arias por todo el apoyo, información y valiosas observaciones para la realización de esta tesis.

A Conchita por todo tu apoyo y consejos en la parte de histología.

A Estela por todo tu apoyo, guía y consejos. Por dejarme ser parte del grupo del laboratorio de Anatomía. Por ser ejemplo de dedicación y amor a la Biología.

A Elia por haberme adoptado como hermana, por todo tu apoyo y ánimos, por todas las pláticas y sueños que hemos compartido. Gracias por ayudarme a buscar artículos y por todo el apoyo durante la realización de todo este trabajo.

A Blanca por todo el apoyo y comprensión, te dedico gran parte de este trabajo. Gracias por jalarme las orejas cuando lo necesitaba, gracias por ser equipo durante toda la carrera. Gracias por ser parte de mi familia, y dejarme ser parte de la tuya. Gracias por tu ejemplo y paciencia. Gracias por ayudarme con la estadística.

A Sandra por ser ejemplo, amiga e incondicional apoyo, mil gracias por ser tú, por existir. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A Diana por tu amistad y todo tu apoyo incondicional. Mil gracias por todo lo que me enseñaste de histología, por ser alegría y risas.

A Tere, por todo tu apoyo y comprensión, por todos los ánimos y enseñanzas. Gracias por haber aparecido en mi vida, por ser un ángel que me cuida, quiere y apoya.

A Adriana y Mariana, mis amigas de toda la vida, por estar siempre ahí, por todo su apoyo, por seguir juntas después de tanto tiempo de amistad. Gracias por todo su apoyo y ayuda en mis materias, aún sin saber nada de cactus.

A Liliana por tu gran amistad que ha perdurado a pesar de la distancia, gracias por todo tu apoyo y palabras de aliento en los momentos difíciles.

A María Eugenia Valencia por todo tu gran apoyo y amistad durante gran parte de la carrera. Gracias por todas las cosas que me enseñaste y por ser ejemplo de perseverancia y entusiasmo.

A Cristina Sánchez por todo su apoyo y guía, gracias por enseñarme a creer en mi misma, por comprenderme y por todo lo que he aprendido contigo.

A Mayté Chávez por todas sus enseñanzas y amistad. Gracias por creer en mí. Gracias por enseñarme a tener fortaleza frente a la vida.

A Antonio por tu amistad y gran apoyo, gracias por ayudarme con el video y por todos los ánimos e interesantes pláticas.

A Sergio Bravo, por ser amigo y un gran apoyo en los momentos difíciles. Gracias por ser como eres.

A todos los del museo de Zoología de la Facultad, en especial a Erick, César y Octavio, gracias por su amistad y apoyo.

A Erick, gracias por tu amistad y ánimos. Gracias por creer en mí y por todas las cosas lindas que hemos vivido juntos, por ser ejemplo de perseverancia y de amor a la naturaleza.

A Octavio Rojas por tu amistad, apoyo y consejos. Gracias por todas las pláticas, por creer en mí y por ayudarme a conocerme, por haber sido parte de mi vida.

A Elia y Blanca, por ser el mejor equipo y las mejores hermanas que pude haber tenido. Gracias porque junto a ustedes aprendí mucho, gracias por todo lo que hemos compartido y sobre todo por todo su apoyo durante gran parte de la carrera.

A todos mis compañeros del laboratorio Sandra, Diana, Sergio, Elisa, Octavio, Julio, Minerva, Felipe, Dalia e Iris, por todo su apoyo, ayuda y consejos.

A Sandra y Diana, por ser el trío dinámico, por ser los ángeles de Charlie, mil gracias por todo su apoyo y por hacer de la estancia en el laboratorio una alegría y trabajo en equipo. No tengo palabras para agradecer toda la ayuda para el desarrollo de mi tesis.

A todos mis maestros de la facultad de Ciencias, en particular a Everto Novelo, mi maestro de Algas y Protistas, Francisco Sour y Sara Quiroz, mis maestros de Paleontología, Alejandro Martínez, Ana Isabel Bieler y Alfredo Gamboa, mis maestros de Foto, Aurora Slotnik, Nelly Diego y Susana Valencia mis maestras de Plantas... gracias por todo lo que me enseñaron y por amar lo que hacen.

A Susana Valencia, por todo su apoyo y amistad durante mi estancia en el herbario de la Facultad de Ciencias. Gracias por haberme enseñado a amar lo que hago y por toda la paciencia y apoyo que me brindaste.

A todos los del Jardín Botánico, por haberme aceptado como un miembro de un grupo tan unido y especial, por hacerme sentir como en familia y por todas las cosas que aprendí junto a ustedes.

Al Dr. Robert Bye, que a pesar de que no tuve mucho contacto con él durante el desarrollo de mi tesis me tendió una mano amiga cuando lo necesitaba brindándome su tiempo y atención cuando lo necesité.

A todos los de la FRR, maestros y amigos, por la formación que recibí durante todo el tiempo que estuve ahí, porque ahí aprendí todas las bases para llegar a este momento.

A Adriana, Mariana, Claudia, Paola, Norma y Tania, las chacualinas, por ser mis amigas, y por toda su amistad y anécdotas. Ahora si ya no tengo pretexto para faltar a las tardes de café.

Al colegio Garside, a todos y cada uno de mis maestros y compañeros, gracias por todo lo que aprendí, sobre todo de redacción e inglés, que tanto me sirvieron durante la carrera.

A mi maestra Carmelina Sánchez, gracias por todas tus enseñanzas y amistad, gracias por todo lo que aprendí en tus clases.

A todos mis compañeros y maestros de la Salle, mil gracias por todos los momentos felices que pasamos juntos y por todo lo que aprendí en mi estancia por allá.

A Liliana, Rosalba y Mauricio, por todo lo que aprendimos juntos, por todos los desvelos, por ser un excelente grupo de amigos y equipo de trabajo. Gracias por ser ejemplo de amistad y sinceridad. Nunca los olvidaré...

A toda la familia Saucedo por estar ahí a pesar de la distancia, gracias por ser mi familia y por quererme y apoyarme.

A mi tía Martha, gracias por los libros que me regalaste, me fueron muy útiles durante toda la carrera.

A toda la familia Consejo, gracias por ser como son, por ser tan unidos y por todo su apoyo y momentos felices.

A Sergio Consejo por ser como un hermano para mí, por todas las aventuras y momentos felices que hemos pasado juntos. Gracias por ser como eres.

A la UNAM, por todo el crecimiento que tuve durante toda mi carrera, por haber cumplido mi sueño de ser universitaria, de ser puma.

A Dios, gracias por crear el planeta y la naturaleza, y por crear todo lo que me rodea, gracias por haber puesto en mi camino a todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida.

A todos y cada uno de ustedes... MIL GRACIAS...!!!!

Haz de tu vida un sueño y de tu sueño una realidad

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	11
Índice de figuras	12
Índice de gráficas	15
Abreviaturas	16
Resumen	17
I. INTRODUCCIÓN	18
II. ANTECEDENTES	21
Generalidades de la familia	21
Usos e importancia de las cactáceas	22
Problemas de conservación	25
Germinación de las semillas	31
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	
Clasificación botánica	34
Descripción botánica	34
Distribución geográfica	35
Importancia	36
<i>Echinocereus pentalophus</i>	
Clasificación botánica	37
Descripción botánica	37
Distribución geográfica	39
Importancia	39
Situación actual	39
Cultivo de tejidos vegetales (CTV).	40
Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas	48
Cultivo de tejidos en el género <i>Cephalocereus</i> y <i>Echinocereus</i>	53
III. JUSTIFICACIÓN	55
IV. HIPÓTESIS	56
V. OBJETIVOS	56
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	57
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	57
1. Material biológico	57
2. Germinación	57
A. Geminación en barrido hormonal ANA/BAP.	58
A. 1. Desinfección de semillas	58
A. 2. Condiciones de incubación	59
A. 3. Cultivo de explantes e inducción	60
A. 4. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos	61
A. 5. Estudio histológico de callo	62
B. Tratamientos de germinación	65
B.1. Ácido giberélico	65
B.2. Siembra de embriones	65
B.3. Medio líquido	65

B.4. Imbibición	65
B.5. Escarificación	65
B.6. Estratificación	66
B.7. Tratamientos combinados	66
B.8. Germinación <i>ex vitro</i>	66
Siembra masiva de semillas	67
3. Cultivo de secciones de plántulas	67
4. Inducción	68
5. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos	69
6. Prueba de viabilidad	69
7. Análisis estadístico	70
8. Prueba de germinación con semillas de vivero de Texas E.U.A.	71
Metodología general <i>Cephalocereus apicicephalium</i>	72
<i>Echinocereus pentalophus</i>	73
1. Material biológico	73
2. Germinación	73
3. Condiciones de incubación	74
4. Cultivo de secciones de plántulas	74
5. Inducción	74
6. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos	75
7. Individualización	75
8. Enraizamiento	76
9. Análisis estadístico	76
Metodología general de <i>Echinocereus pentalophus</i>	77
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	78
Germinación	78
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	80
<i>Echinocereus pentalophus</i>	119
Cultivo de secciones de plántulas	120
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	120
<i>Echinocereus pentalophus</i>	120
Inducción	121
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	121
<i>Echinocereus pentalophus</i>	128
Enraizamiento	136
VIII. CONCLUSIONES	138
IX. BIBLIOGRAFÍA	140
X. APÉNDICE	152

Índice de tablas

Tabla 1	Categorías de los listados de protección de especies (Arias <i>et al.</i> , 2005).	29
Tabla 2	Especies de interés agrícola, medicinal, ornamental y forestal propagadas por cultivo <i>in vitro</i> (George y Sherrington, 1984).	45
Tabla 3	Tratamientos de prevención de oxidación en especies de importancia agrícola, forestal y ornamental (Preece y Compton, 1991).	48
Tabla 4	Algunas especies de cactáceas cultivadas <i>in vitro</i> .	51
Tabla 5	Tratamientos de germinación aplicados a semillas de <i>C. apicicephalum</i> .	57
Tabla 6	Barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP (mg/l), aplicados a semillas de <i>C. apicicephalum</i> .	59
Tabla 7	División de los explantes obtenidos a partir de la germinación <i>in vitro</i> de <i>C. apicicephalum</i> con barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP.	60
Tabla 8	Tratamientos con 2 pares de auxinas/citocininas, aplicado a 8 plántulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>C. apicicephalum</i> , 4 plántulas por tratamiento.	68
Tabla 9	Tratamientos de barrido hormonal ANA/BAP (mg/l), aplicados a explantes de plántulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>C. apicicephalum</i> , una plántula por tratamiento.	68
Tabla 10	Tratamientos de barrido hormonal ANA/BAP (mg/l), aplicados a explantes de plántulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>E. pentalophus</i> .	75
Tabla 11	Porcentaje de germinación y efecto de reguladores de crecimiento (ANA/BAP) en <i>C. apicicephalum</i> en <u>fotoperiodo</u> , después de 4 meses de inducción en medio MS50%.	84
Tabla 12	Porcentaje de germinación y efecto de los reguladores de crecimiento (ANA/BAP) en <i>C. apicicephalum</i> en <u>obscuridad</u> , después de 4 meses de inducción, en medio MS 50%.	84
Tabla 13	Resultados de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. apicicephalum</i> en distintos tratamientos de inducción, después de 7 semanas de cultivo.	98
Tabla 14	Media y desviación estándar de semillas germinadas de <i>C. apicicephalum</i> en los distintos tiempos de imbibición, sembradas en medio MS 50%.	116
Tabla 15	Media y desviación estándar de semillas germinadas de <i>C. apicicephalum</i> en los distintos tiempos de imbibición, sembradas en medio MS 50%.	116
Tabla 16	Media del número de brotes de <i>E. pentalophus</i> por tratamiento en barrido hormonal ANA/BAP con desviación estándar y diferencia entre tratamientos, después de 2 meses de inducción.	132

Índice de figuras

Figura 1	(a y b) Semillas; (c) Planta joven de 2 años de edad; (d) Ápice con pseudocefalio; (e) Pseudocefalios en forma de anillos de un individuo adulto; (f) Individuos de población de Oaxaca; (g) Población de <i>C. apicicephalium</i> en Oaxaca en acantilado de roca caliza.	36
Figura 2	(a) <i>Echinocereus pentalophus</i> en floración; (b) Acercamiento de flor; (c) Lóbulos del estigma y estambres.	38
Figura 3	Diseción de plántulas de <i>C. apicicephalium</i> para la obtención de explantes.	67
Figura 4	Comparación de morfología de las plántulas obtenidas a partir de los resultados obtenidos en condiciones de fotoperiodo y obscuridad permanente, después de un mes. (a y b) Plántulas obtenidas en condiciones de fotoperiodo, de color verde y sin presentar etiolación; (c y d) Plántulas obtenidas en condiciones de obscuridad constante, de color blanco con verde muy pálido y etioladas.	81
Figura 5	Tratamientos con mejor respuesta de semillas de <i>C. apicicephalium</i> germinadas en medio MS 50% adicionado con barrido hormonal ANA/BAP en condiciones de fotoperiodo después de 4 meses de inducción (a) Tratamiento con mayor proliferación de brotes bien consolidados muy unidos entre sí (Trat. 7); (b) Tratamiento con mayor proliferación de biomasa en forma de callo esponjoso o verde claro, esponjoso verde intenso y compacto liso verde intenso, sin presentar mucha oxidación (Trat. 18) y (c) Tratamiento con presencia de morfogénesis incipiente con aumento de tamaño de aréolas y formación de espinas (Trat. 3).	85
Figura 6	Comparación de los resultados obtenidos en los distintos métodos para control de oxidación en cultivos de <i>C. apicicephalium</i> . (a) Subcultivo en medio MS 50% con presencia de oxidación letal de la mayoría de los explantes (b) Subcultivo con baño en solución antioxidante, medio MS 50% con macros al 25% y carbón activado 1 g/l: persistencia de oxidación letal para la mayoría de los explantes (c) Subcultivo en medio MS 50% líquido con puente de papel filtro y PVP 1 g/l: éxito para control de oxidación de los explantes sobrevivientes a los subcultivos anteriores.	89
Figura 7	Respuestas obtenidas a partir de los distintos subcultivos del callo del tratamiento 18. (a) Medio líquido con puente de papel filtro, 0.1 ANA / 2 BAP mg/l y PVP 1 g/l: proliferación de gran cantidad de biomasa en forma de callo friable de color amarillo con tintes verdes y naranjas; (b) Medio líquido con 0.1 ANA / 2 BAP 2 mg/l y PVP 2 mg/l en agitación constante: el callo se tornó rojizo, se disgregó un poco y cesó su proliferación; (c) Medio líquido con 2 ANA / 1 BAP mg/l y PVP 1 g/l en agitación constante: el callo se tornó compacto y de tonalidad rojo intenso; (d) Medio semisólido (phytagel 5 g/l) y PVP 1 g/l: callo de consistencia friable de coloración rojo-rosa.	90

- Figura 8** Secciones de callo de *C. apicicephalium* proveniente del tratamiento 18 subcultivado en medio líquido MS 50% en puente de papel, adicionado con ANA (2mg/l)/BAP (1mg/l), después un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses de estrés hídrico, sin subcultivo. (a) Elemento traqueal con engrosamientos helicoidales (flecha: e.t.), X100, c.f.; (b) Tejido colapsado (flecha: t.c.) localizado en la periferia del callo, X25, c.c.; (c) Grupos de elementos traqueales (flecha: g.e.t.), X400, c.c.; (d) Inicio de la estratificación celular (flecha: e. c.) en la periferia del callo, X50, c.c. 94
- Figura 9** Secciones de callo de *C. apicicephalium* proveniente del tratamiento 18 subcultivado en medio líquido MS 50% en puente de papel, adicionado con ANA (2mg/l)/BAP (1mg/l), después un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses de estrés hídrico, sin subcultivo. (a) Vista panorámica, organización de callo, células de forma irregular (fecha: c.f.i.), X25, c.c.; (b) Acercamiento de grupo de elementos traqueales (fecha: g.e.t.), X100, c.c.; (c) Vista panorámica con estratos de células colapsadas (flecha: e. c. c.) X25, c.c.; y (d) Células de callo y elemento traqueal (flecha: e.t.), X400, c.c. 95
- Figura 10** Respuestas morfogénicas de explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apicicephalium* en medio de inducción MS 50% líquido en puente de papel filtro, adicionado con PVP 1g/l, ANA(0.1 mg/l) y BAP(2 mg/l), después de 9 semanas en el medio de inducción (a) explante apical con surgimiento de raíz; (b) explante apical con aparición de callo hiperhidratado y agrandamiento de aréolas; (c) explante apical hinchado con formación de callo vitrificado, sin respuestas morfogénicas y poca oxidación; (d) explante apical con aparición de brotes no consolidados y con presencia de muy pocas espinas; (e) explante lateral hinchado sin aparición de respuestas morfogénicas; (f) explantes laterales con formación de callo no morfogénico y poca oxidación. 122
- Figura 11** Respuestas morfogénicas de explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apicicephalium* en medio de inducción MS 50% líquido en puente de papel filtro, adicionado con PVP 1g/l, 2,4-D (0.1 mg/l) y KIN (2 mg/l), después de 9 semanas en el medio de inducción. (a Y b) explantes apicales con surgimiento de raíz bien desarrollada con presencia de pelos radicales; (c) explante apical hinchado con aparición de callo vitrificado; (d) explante lateral con formación de callo compacto verde intenso y callo vitrificado en poca cantidad, con presencia de oxidación leve en la base; (e y f) explantes laterales con formación de callo vitrificado sin respuestas morfogénicas aparentes. 123

- Figura 12** Resultados obtenidos a partir de la inducción del explante apical de *C. apicicephalium* en medio MS 50% adicionado con reguladores de crecimiento ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7 mg/l). (a) tratamiento 1 (1 mg/l ANA), tejido hinchado con la aparición de un brote incipiente vía organogénesis directa; (b) tratamiento 2 (3 mg/l ANA), formación de 7 brotes incipientes vía organogénesis directa; (c) tratamiento 3 (5 mg/l ANA), agrandamiento de aréolas sin consolidación de brotes; (d) tratamiento 6 (0.1 mg/l ANA/3 mg/l BAP), 5 brotes incipientes a partir del agrandamiento de las aréolas; (e) tratamiento 7 (0.1 mg/l ANA/ 5 mg/l BAP), agrandamiento de aréolas con presencia de oxidación en la superficie del tejido. 125
- Figura 13** Resultados obtenidos a partir de la inducción de explantes laterales *C. apicicephalium* en medio MS 50% adicionado con reguladores de crecimiento ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7 mg/l). (a) tratamiento 3 (5 mg/l ANA) formación de 5 brotes por organogénesis directa y 2 más vía organogénesis indirecta; (b) tratamiento 8 (0.1 mg/l ANA/7 mg/l BAP), callo compacto hiperhidratado de tonalidades amarillo con tinte rosa. 125
- Figura 14** Variación fenotípica de las plántulas de *C. apicicephalium* germinadas *in vitro*. (a) Plántula de 8 semanas (0.8 cm), con desarrollo de gran cantidad de espinas, con sistema radicular poco ramificado; (b y e) Plántulas de 7 semanas (0.9 cm), vigorosas con desarrollo de un sistema radicular muy ramificado y de desarrollo de gran cantidad de espinas; (c) Plántula de 9 semanas (0.6 cm) con base amarillenta, gran cantidad de espinas y poco desarrollo de sistema radicular; (d) Plántula de 7 semanas (0.6), con poca vigorosidad, pocas espinas y con desarrollo de un sistema radicular ramificado; (f) Plántula de 8 semanas (0.7 cm), con base delgada, pocas espinas y sistema radicular poco ramificado; (g) Plántula de 7 semanas (0.6 cm) con base hinchada y concentración de espinas en el ápice, sistema radicular no muy ramificado; (h) Plántula de 8 semanas (0.6 cm) con base un poco hinchada, espinas en la parte superior no muy numerosas y raíces ramificadas y desarrolladas. 127
- Figura 15** Figura 15. Respuestas morfológicas del explante apical de *E. pentalophus* después de 5 meses de cultivo. (a) Tratamiento control, sin reguladores de crecimiento, brotación vía organogénesis directa; (b, d, g y i) Tratamientos con mayor cantidad de brotes sin mostrar hiperhidratación severa, vía organogénesis indirecta. (c, e, f y h) Tratamientos con mayor cantidad de brotes hiperhidratados. 130
- Figura 16** Figura 16. Enraizamiento en *E. pentalophus* después de 2 semanas de la individualización de los brotes. (a, b y c) Raíces ramificadas de 0.3 a 1.5 cm de longitud; (c) Raíces ramificadas con pelos radicales. 136

Índice de gráficas

Gráfica 1	Porcentaje de germinación de <i>C. apicicephalium</i> en tratamientos de imbibición en medio MS 50%	104
Gráfica 2	Media, error estándar y desviación estándar entre grupos de tratamientos de germinación de <i>C. apicicephalium</i> .	116
Gráfica 3	Media, error estándar y desviación estándar entre los diferentes tiempos de imbibición como tratamiento de germinación en semillas de <i>C. apicicephalium</i>	117
Gráfica 4	. Brotes totales obtenidos de <i>E. pentalophus</i> en barrido hormonal ANA/BAP después de 5 meses de cultivo, antes de la individualización y fragmentación del callo morfogénico.	131
Gráfica 5	Media, error estándar y desviación estándar del número de brotes de <i>E. pentalophus</i> en barrido hormonal ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/l) / BAP (0, 1 y 3 mg/l), después de 2 meses de inducción.	133
Gráfica 6	Respuestas obtenidas a partir del explante apical de <i>E. pentalophus</i> después de 6 meses de cultivo, y 2 semanas después de la individualización de los brotes mayores de 0.5 cm.	135

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N-6 dimetil alil aminopurina; 2-isopentil adenina
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
c.c.	Campo claro
c.f.	Contraste de fase
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
GA ₃	Ácido giberélico
KIN	Kinetina; 6-Furfurilaminopurina
MS	Medio de Cultivo Murashigue y Skoog (1962)
MS 50%	Medio de cultivo MS a la mitad de su concentración
PPM	Plant Preservative Mixture
PVP	Polivinilpirrolidona
TBA	Alcohol terbutílico
Z	Zeatina; 4-hidroxi-3- metil-trans-2-butenilaminopurina

RESUMEN

La familia Cactaceae se encuentra en serio riesgo de extinción, debido principalmente a la destrucción de sus hábitats y a la colecta inmoderada para su comercio ilegal. Adicionalmente, los procedimientos convencionales para su propagación resultan ineficientes para cubrir su demanda. Por lo que resulta de vital importancia impulsar la propagación por vías alternativas, como el cultivo de tejidos vegetales. *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentalophus*, son dos cactáceas nativas de México, con poblaciones restringidas, incluidas en el Apéndice II de la CITES.

Para la especie *C. apicicephalum*, se logró la germinación *in vitro* en medio MS 50%, con imbibición en agua por 72 h obteniéndose un 32% de germinación a las 7 semanas de cultivo. Los explantes para la inducción de regenerantes fueron disectados de plántulas germinadas *in vitro*, los que se cultivaron en medio MS 50% con distintos reguladores de crecimiento (ANA ó 2, 4-D con BAP o KIN). Se logró controlar la oxidación de los explantes con una solución de ácido cítrico 100 mg/l y ácido ascórbico 150 mg/l y con la utilización de medio líquido con puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l. La mayor proliferación de brotes, se obtuvo a partir de la sección apical, con BAP 3 mg/l, sola o en combinación con ANA 0.1 mg/l (7 y 5 brotes respectivamente), pero sin lograr la individualización de los brotes ni su posterior establecimiento en suelo.

En el caso de *E. pentalophus*, se alcanzó 98% de germinación en medio MS 50% y se exploró el potencial morfogénético de explantes de plántulas germinadas *in vitro* cultivadas en medio MS 50% con un barrido hormonal ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/l) / BAP (0, 1 y 2 mg/l). Los ápices mostraron una gran capacidad organogénica y el mejor tratamiento para la inducción de brotes fue con ANA 0.5 mg/l + BAP 3 mg/l, vía organogénesis indirecta. Se logró el enraizamiento de los brotes sin la adición de reguladores de crecimiento. Este estudio contribuye a la conservación y al conocimiento de la morfogénesis de estas especies, así como también al futuro aprovechamiento de la misma sobre una base sustentable.

I. INTRODUCCIÓN

“Biodiversidad” se define como la variedad de organismos vivos considerados en todos los niveles de organización incluidos el genético, el de especie y todos los niveles taxonómicos, así como la variedad de hábitats y ecosistemas, y todos los procesos y patrones que ocurren dentro de ellos (Meffe *et al.*, 1997).

México es un país con gran diversidad vegetal, se estima que alberga aproximadamente el 10% de la flora del mundo, y es el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad de especies vegetales (Magaña y Villaseñor, 2002).

La gran biodiversidad de nuestro país es el resultado de la combinación de variaciones topográficas y climáticas, que al mezclarse, crean un mosaico de condiciones ambientales y microambientes. Asimismo, México, es una “zona de transición” o convergencia entre las floras y faunas neártica y neotropical, además de tener una larga y compleja historia geológica de aislamiento en algunas regiones, lo que ha favorecido la evolución de un gran número de endemismos (Flores-Villela y Gerez, 1994; Soberón y Llorente, 1993; Toledo 1988). Magaña y José Luis Villaseñor (2002), han estimado una cifra de 22 411 especies, sin contar a las casi 1000 especies introducidas y a su vez, calculan que el 54.2% de las plantas vasculares de México son especies endémicas.

México es el centro de diversificación de cactáceas más importante, con un elevado número de endemismos. Desafortunadamente, los ecosistemas naturales de los países megadiversos, dentro de los cuales se encuentra México, están experimentando alteraciones significativas que amenazan sus ecosistemas y con ello a sus recursos naturales. (Sarukhán y Dirzo, 2001).

Las tasas de deforestación en los países tropicales, en su mayoría países en desarrollo, se han acelerado en los últimos años (Ortiz y Toledo, 1998). México ha sufrido una de las tasas de deforestación más altas del mundo, estimándose entre 300 mil y un millón de hectáreas anuales. Entre 1981 y 1991, la deforestación promedio se calculó en 678 mil ha, siendo una de las más altas del mundo (<http://www.FAO.org>).

La transformación de un ecosistema implica un desequilibrio en los ciclos hidrológicos y energéticos, así como también erosión y contaminación, lo que causa una disminución en la variabilidad biológica. Dicha disminución significa la desaparición irreversible de genotipos que han sido el resultado de un proceso evolutivo de millones de años, e implica también una reducción sensible en las probabilidades de utilización de la variabilidad vegetal (Álvarez-Sánchez, 1993).

En nuestro país la diversidad biológica se ha visto afectada principalmente por factores como el tráfico ilegal de especies para comercio tanto nacional como internacional, la deforestación y la fragmentación de los hábitats, debido a cambios en el uso de suelo, y por el desarrollo y construcción de obras urbanas. Todo esto tiene como consecuencia que varias de las cactáceas se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Daily *et al.*, 1996; Sarukhán y Dirzo, 2001; Mandujano *et al.*, 2002).

La notable diversidad de la familia y el número de endemismos hace que se trate de uno de los grupos más amenazados de plantas superiores, lo cual se refleja en el número de especies con algún grado de amenaza incluidas en los listados de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), la CITES (Convención sobre comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre) y la NOM-059-ECOL-2001 (Arias, 2005).

En particular, las especies de cactáceas raras y en peligro de extinción, presentan lento crecimiento y capacidades reproductivas limitadas (Malda, *et al.*, 1999). Por todo esto, resulta indispensable emplear técnicas alternativas de rescate y conservación, como el desarrollo de métodos eficientes de propagación (Mauseth, 1979).

La propagación masiva se puede llevar a cabo mediante métodos de propagación convencionales tales como: semillas, vástagos, esquejes o injertos, o mediante el uso de la biotecnología, por medio de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, método que permite una producción rápida y continua de plantas, así como el saneamiento de las mismas, ayudando a superar algunas de las dificultades asociadas a la propagación convencional (Malda, *et al.*, 1999). Con este método, la calidad de las plantas obtenidas pueden satisfacer los volúmenes

de comercialización, tanto en los mercados nacionales como en los internacionales, ofreciendo calidad sanitaria y genética (Dodds y Roberts, 1982).

En la actualidad *Cephalocereus apicicephalium* y *Echinocereus pentalophus*, especies nativas de México, se encuentran dentro del apéndice II de la CITES. Los factores que amenazan a estas especies, son principalmente la destrucción de su hábitat y en el caso de *C. apicicephalium*, a que la utilización de la especie es con base en organismos silvestres (Casas, 2002).

Cephalocereus apicicephalium es una especie de cactácea columnar de lento crecimiento y de poblaciones restringidas, para la cual el estudio sobre sus respuestas *in vitro* es con fines de conservación. Cuando las plantas son propagadas con éstos fines, es importante mantener la diversidad genética, y por ello preferentemente los explantes utilizados para su cultivo *in vitro* son semillas (Fay y Gratton, 1992).

Echinocereus pent alophus, es una especie de cactácea con gran potencial ornamental, para la cual el estudio sobre sus respuestas *in vitro* es con fines de propagación masiva. En este caso la variación genética no es importante, puesto que el interés es la propagación de plantas idénticas, aún así, la variabilidad genética puede servir como recurso para el mejoramiento de la especie.

En especies de cactáceas con potencial ornamental, como *C. apicicephalium* y *E. pentalophus*, el desarrollo de sistemas de propagación *in vitro* se vuelve una alternativa viable para su preservación *ex situ*, así como también para su comercialización.

En este trabajo se describe una exploración de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales para lograr la regeneración de estas especies, así como también una exploración de su desarrollo morfogénético en presencia de reguladores de crecimiento.

II. ANTECEDENTES

Generalidades de la familia

Las cactáceas son endémicas del continente americano y se distribuyen desde el sur de Canadá hasta el sur de Argentina, además de las islas Galápagos y las Antillas. Habitan en altitudes desde cero hasta cuatro mil metros sobre el nivel del mar. Generalmente, se encuentran en zonas áridas y semiáridas aunque se han adaptado a selvas altas perenifolias, bajas caducifolias, y bosques mesófilos de montaña (Olalde, 2001; Becerra, 2000).

Durante su evolución se han diversificado en un gran número de especies y formas de vida. Se estima en forma conservadora, que las cactáceas incluyen cerca de 110 géneros y 2000 especies, de las cuales México posee 52 géneros, es decir, el 47% del total reconocido para la familia y 850 especies silvestres, lo que equivale a cerca del 42% de las especies de la familia (Mandujano *et al.*, 2002, Arias, 1993; Olalde, 2001). Con lo que respecta a las cactáceas columnares, existen aproximadamente 170 especies, de las cuales 80 se encuentran en territorio nacional (Casas, 2002).

El género *Echinocereus* se caracteriza por poseer flores muy vistosas y por su lento crecimiento en áreas templadas (Anderson, 2001). Este género comprende numerosas especies distribuidas desde el sur de Valle de México hasta California, sur de Dakota y Oklahoma en Estados Unidos de América. Taylor (1985) menciona 44 especies para el género, de las cuales 43 se distribuyen en México y 27 son endémicas de nuestro territorio. Estudios posteriores mencionan 50 especies de este género distribuidas en nuestro país (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Las cactáceas son componentes importantes de los bosques tropicales caducifolios y matorrales xerófilos de las zonas áridas y semiáridas, las que abarcan alrededor de dos tercios del territorio nacional (Casas, 2002). Éstas, han

desarrollado diversas adaptaciones que les permiten desarrollarse en condiciones ambientales adversas. La mayoría de sus características morfológicas, anatómicas y fisiológicas les permiten un uso muy eficiente del agua. Un alto desarrollo de tejido parenquimático de almacenamiento, les permite almacenar agua, al mismo tiempo que reduce la superficie de exposición al sol. La cutícula gruesa, evita la pérdida de agua por transpiración, siendo que la entrada y salida de agua se encuentra regulada por los estomas. Presentan metabolismo CAM (metabolismo ácido crasuláceo). Las plantas con este tipo de metabolismo, habitan generalmente en ambientes sujetos a periodos de sequía y con sustratos pobres. En este tipo de ambientes resulta ventajoso para las plantas, separar en el tiempo las etapas de asimilación de carbono, abriendo los estomas durante la noche para la captación del CO₂, almacenándolo en forma de ácido málico, y el cual procesan durante el día siguiente para la síntesis de carbohidratos. De esta manera, aseguran las reservas de carbono sin correr el riesgo de pérdida de agua por transpiración durante el día. En periodos de sequía severos, cuando los estomas permanecen cerrados tanto en el día, como en la noche, el CO₂ formado en la respiración se recaptura, restableciendo el balance de carbono, al mismo tiempo que conservan el agua y protegen el aparato fotosintético del daño ocasionado por exceso de irradiación solar (Walter, 1995; Becerra, 2000).

La energía que las plantas gastan en la producción de grandes masas de tejido de almacenamiento se ve reflejado directamente en su crecimiento y es por esto que en la mayoría de las cactáceas tienen un crecimiento lento. La falta de hojas y la presencia de espinas o tricomas en algunas especies, ayudan a la planta a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares. También presentan raíces largas y superficiales que les permite la rápida captación de agua (Bravo-Hollis, 1978; Becerra, 2000).

Usos e importancia de las cactáceas

La gran diversidad hace de esta familia un importante recurso natural que puede ser considerado como una opción para la creación de fuentes de trabajo. Existen reportes del uso y aprovechamiento de las cactáceas, desde la época prehispánica y han representado un importante papel en la vida del hombre debido a su utilización como alimento, bebidas, medicina, forraje, materia prima para la construcción de viviendas y cercas vivas, para retener el suelo, como armas de caza y pesca, con fines mágico religiosos y como plantas de ornato (Becerra, 2000; Bravo-Hollis, 1978).

Como alimento humano, prácticamente todos los órganos de estas plantas son comestibles (raíces, tallos, flores, frutos y semillas). Actualmente, los tallos de algunas especies de biznagas de los géneros *Melocactus*, *Echinocactus* y *Mammillaria*, son empleados para preparar el dulce de acitrón, tradicional del centro del país. Los tallos jóvenes de varias especies del género *Opuntia*, conocidos como nopales, así como también sus frutos, conocidos como tunas, son muy populares, incluso fuera del país. Las pitayas, tunillos, teteches, garambullos y xoconoxtles, son frutos recolectados tradicionalmente por los habitantes de las zonas áridas (Becerra 2000; Bravo-Hollis, 1978).

Además de su uso como alimento, el uso de las cactáceas en la medicina tradicional se remonta a antes de la conquista debido a las propiedades farmacológicas de muchas de sus especies. Éstas se utilizan principalmente como remedios para curar o aliviar afecciones musculares, reumáticas, óseas, estomacales, diabetes, cardiovasculares y mentales (Bravo-Hollis, 1978). Algunas de ellas, han llegado a tener un significado divino y son utilizadas en ceremonias religiosas. Tal es el caso del peyote (*Lophophora williamsii*), planta con propiedades alucinógenas, utilizado dentro de las creencias de diversos grupos étnicos, como los huicholes, tarahumaras, coras y tepehuanes (Becerra, 2000).

Los tallos de algunas especies son consumidos como forraje para ganado, los cuales no obstante a su bajo valor nutricional, permiten a los animales

sobrevivir en la época de sequía, gracias al contenido acuoso de sus parénquimas. Otros de los usos es como combustible cuando se encuentran secos, los haces liberoleñosos del sistema vascular de algunas columnares secas, se usan como material de construcción o como cercas vivas; como fuente de fibra y pulpa para la fabricación de papel y materiales aislantes; extracción de pigmentos utilizados en la industria; como fuentes de mucílago para la elaboración de pegamentos y adhesivos y como fuente de pectinas para elaborar jaleas y mermeladas (Bravo-Hollis, 1978).

Desde la época prehispánica, las cactáceas han sido plantas muy apreciadas por su belleza. Se sabe que en los jardines de Nezahualcóyotl, eran plantas importantes, siendo que algunas de ellas eran traídas desde tierras lejanas. Con la llegada de los españoles, estos quedaron fascinados con la belleza y rareza de estas plantas, y comenzaron a coleccionarlas y enviarlas al viejo continente, dando inicio a un comercio que con el paso de los años las ha llevado a ser uno de los grupos de plantas más amenazadas. Actualmente, las cactáceas, han alcanzado gran auge sobre todo entre aficionados y científicos, dando como resultado un comercio de grandes volúmenes y la creación de numerosos establecimientos comerciales dedicados a su importación, reproducción y venta en diversos países (Oldfield, 1985; Bravo-Hollis, 1978; Kobayashi, 1993).

Con respecto a las cactáceas columnares, de acuerdo a los registros arqueológicos encontrados, se sabe que muchas especies de estas, junto con algunas especies de *Opuntia* y biznagas, fueron utilizados por los humanos desde la prehistoria de Mesoamérica, como uno de los recursos principales para su sobrevivencia (Casas, 2002).

Se tienen registradas para la región mesoamericana de México cerca de 420 especies, de las cuales 118 han sido utilizadas por pueblos indígenas de la región, y entre éstas, 45 son cactáceas columnares y sólo 12 de estas últimas son cultivadas (Casas, 2002).

Los frutos de todas las cactáceas columnares son comestibles, a pesar de que no todas presentan frutos carnosos. Los tallos y los frutos de todas las especies son utilizadas como forraje (Casas, 2002).

Las cactáceas también cumplen con importantes funciones ecológicas en las zonas en donde habitan, puesto que sirven como refugio y alimento de animales, ayudan a evitar la erosión eólica y pluvial gracias a su sistema radical desarrollado y a su gran adaptabilidad a factores climáticos adversos y extremos. Representan una importante fuente de material orgánico en los suelos debido a que sus raíces presentan pelos absorbentes caducos (Bravo-Hollis, 1978), así como también, son recursos con potencial económico para las comunidades rurales, las que las utilizan para satisfacer sus necesidades de subsistencia y las comercializan a escala local o regional (Casas, 2002).

Muchas especies pertenecientes a esta familia, entre las cuales se encuentran *C. apicicephalum* y *E. pentalophus*, es probable que podrían tener importancia en los mercados internacionales, por lo que su comercialización contribuiría a beneficiar la economía campesina. Ante esta perspectiva, el estudio y conservación de los recursos genéticos de estas plantas es una prioridad para el país (Casas, 2002).

Problemas de conservación

La problemática de protección y conservación de las cactáceas es compleja, debido a que sus características ecológicas y biológicas las hacen un grupo de plantas muy vulnerable a la extinción. La mayoría de las especies de cactus que se encuentran amenazadas, tienen poblaciones pequeñas, son de distribución restringida o son especies de reciente descubrimiento y por ello se conoce muy poco acerca de su biología. Asimismo, la mayoría presenta lento crecimiento y tienen ciclos de vida muy largos (Becerra, 2000).

Las causas principales de la disminución rápida y continua de las poblaciones silvestres de cactáceas, en orden de importancia:

- a) **Sobrecolecta del recurso**, el factor principal que ha causado que tantas especies de cactáceas se encuentren en peligro. La demanda nacional e internacional de estas plantas, se ha abastecido fundamentalmente con la extracción de plantas y semillas de su hábitat natural, lo que representa una presión para las poblaciones silvestres (Arias, 1993; Becerra, 2000).
- b) **Destrucción y modificación de su hábitat**, debido principalmente a factores tales como desmontes con fines agrícolas, sobrepastoreo, apertura de vías de comunicación y ductos, erosión del suelo, inundación de zonas por embalses, entre otras (Arias, 1993). La deforestación y fragmentación de los ecosistemas se ha reconocido como una de las principales causas de pérdida de biodiversidad (Arias, 1993; Aguilar *et al.*, 2000).
- c) **Interacciones con enemigos naturales**, los cuales han sido introducidos o favorecidos por interacciones humanas. Algunos ejemplos son: depredadores, patógenos y competidores (Peña y Neyra, 1998). Dichos factores se encuentran relacionados con la biología reproductiva de las especies, así como también en su establecimiento (Arias, 1993).
- d) **Contaminación**. Influencia de compuestos químicos y tecnologías de fertilización de suelos, fumigación de cultivos y construcción de obras (Peña y Neyra, 1998).
- e) **Catástrofes naturales**, como incendios, erupciones, inundaciones, terremotos, huracanes, entre otros (Ehrlich y Ehrlich, 1992 y WCMC, 1992 en Peña y Neyra, 1998).

Las cactáceas son un grupo de plantas que actualmente en su gran mayoría se encuentran amenazadas o en peligro de extinción en sus hábitats naturales, por lo cual es urgente la aplicación de acciones que ayuden a conservar dichas especies (Olalde, 2001).

La problemática para conservar este recurso ha requerido de la participación del sector académico, del privado y del gubernamental. Actualmente, existe un marco jurídico nacional e internacional para la protección de especies silvestres con algún nivel de riesgo (Arias *et al.*, 2005).

En México, se cuenta con la NOM-059-ECOL-2001, una disposición legal para la protección, aprovechamiento y comercio de la flora silvestre nativa. Ésta tiene por objeto reconocer a las especies o poblaciones de flora y fauna silvestre en riesgo de nuestro país mediante un listado, con base en un método de evaluación de riesgo de extinción, estableciendo especificaciones para la disminución de los efectos adversos sobre la biodiversidad. Este listado asigna a las especies dentro de cuatro categorías de protección (Tabla 1) (Arias *et al.*, 2005).

De la flora mexicana, la NOM- 059- ECOL- 2001, incluye 92 familias y 949 especies, de plantas fanerógamas y hongos, de las cuales 466 (49%), son endémicas. El 46% de especies vegetales protegidas bajo la Norma Oficial se encuentran en la categoría de raras y tan sólo el 14% se consideran en peligro de extinción. Las familias con mayor número de especies amenazadas o en peligro son las cactáceas, agaves, palmas, cícadras y orquídeas. Con lo que respecta a las cactáceas, se registran 285 especies de cactáceas en alguna categoría de riesgo, de las cuales 247 son endémicas, 89 se presentan como amenazadas, 166 sujetas a protección especial y 30 en peligro de extinción (SEMARNAT, 2002).

A nivel mundial, se cuenta con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN o IUCN), la cual recopila información sobre el estado de conservación de especies amenazadas y en peligro. Dicha información puede ser utilizada por agencias internacionales como la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre) o por los gobiernos de países específicos. Los criterios utilizados por la Unión se representan en 9 categorías (Tabla 1). (Arias *et al.*, 2005).

La CITES es un acuerdo internacional que tiene por finalidad velar por que el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su supervivencia, estableciendo un marco de

referencia legal internacional para la prevención del comercio de especies amenazadas y su regulación. Esto es debido a que se estima, que anualmente el comercio internacional de vida silvestre se eleva a miles de millones de dólares y afecta a cientos de millones de especímenes de animales y plantas (<http://www.cites.org>; Arias *et al.*, 2005).

Los niveles de explotación de algunos animales y plantas son elevados y su comercio, junto con otros factores, como la destrucción del hábitat, es capaz de mermar considerablemente sus poblaciones e incluso hacer que algunas especies estén al borde de la extinción. Muchas de las especies objeto de comercio no están en peligro, como es el caso de *C. apicicephalum* y *E. pentalophus*, pero la existencia de un acuerdo encaminado a garantizar la sustentabilidad de su comercio es esencial con miras a preservar esos recursos para las generaciones venideras (<http://www.cites.org>).

Alrededor de 28, 000 especies de plantas están amparadas por la CITES contra la explotación excesiva debido al comercio internacional. Éstas, se encuentran incluidas en 3 Apéndices, según el grado de amenaza debida al comercio internacional, y que ofrecen diferentes niveles y tipos de protección ante la explotación excesiva (Tabla 1) (<http://www.cites.org>).

En el Apéndice I se encuentran las especies de animales y plantas sobre las que pesa un mayor peligro de extinción. Para estas especies amenazadas de extinción, la CITES prohíbe generalmente el comercio internacional de especímenes de estas especies. No obstante, puede autorizarse el comercio de las mismas en condiciones excepcionales, como por ejemplo, para la investigación científica. En este caso, se puede autorizar el comercio, concediendo un permiso de exportación (o certificado de reexportación) y un permiso de importación. En lo concerniente a la familia Cactaceae, en el Apéndice I, se encuentran especies pertenecientes a los géneros: *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphanta*, *Discocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecypora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus*, *Turbinicarpus* y *Uebelmannia* (<http://www.cites.org>).

El Apéndice II se encuentra conformado por aquellas especies que no están necesariamente amenazadas de extinción, pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio, para evitar que su utilización resulte incompatible con la sobrevivencia de la especie. El comercio internacional de especímenes de especies del Apéndice II puede autorizarse concediendo un permiso de exportación o un certificado de reexportación. En el marco de la CITES no es preciso contar con un permiso de importación para esas especies. Sólo deben concederse los permisos o certificados si las autoridades competentes han determinado que se han cumplido ciertas condiciones, en particular, que el comercio no será perjudicial para la supervivencia de las mismas en el medio silvestre. Dentro de éste apéndice quedan comprendidas el resto de las cactáceas mexicanas junto con sus semillas (<http://www.cites.org>).

En el Apéndice III se encuentran las especies incluidas a solicitud de un país-parte, que ya reglamenta el comercio de dicha especie y necesita la cooperación de otros países para evitar la explotación insostenible o ilegal de las mismas. Sólo se autoriza el comercio internacional de especímenes de estas especies, con la presentación previa de los permisos o certificados apropiados. En el caso de las cactáceas, no existen especies en este Apéndice. (<http://www.cites.org>).

Tabla 1. Categorías de los listados de protección de especies (Arias *et al.*, 2005).

NOM-059-ECOL-2001	UICN	CITES
E – Probablemente extinta en el medio silvestre	EX – Extinto	
	EW – Extinto en estado silvestre	
P – En peligro crítico	CR – En peligro crítico	I
	EN – En peligro	
A – Amenazadas	VU – Vulnerable	II
	NT – Casi amenazado	
Pr – Sujeta a protección especial	LC – Preocupación menor	II
	DD – Datos insuficientes	II
	NE – No evaluado	

Sin embargo, los listados afrontan problemas tales como, la evaluación precisa del estado biológico de las especies en el tiempo, en donde deben tomarse en cuenta aspectos relativos a la distribución de las especies, ecológicos, como la relación de nodrismo, la dispersión y la alteración de los ecosistemas, y en general informes fidedignos sobre la especie en cuestión, como la recolección excesiva y uso de la tierra (Arias, 1993).

En México, son muchos los esfuerzos que se han hecho por proteger a estas plantas, dentro de los cuales se encuentra todo el trabajo realizado por varios jardines botánicos, así como también centros de investigación y asociaciones civiles. En estas instituciones, los investigadores se han dado a la tarea de estudiar aspectos tales como su distribución y biología, así como también se han instituido centros de propagación y distribución como una medida para disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres. También, en estos centros, se llevan a cabo programas de educación y difusión sobre técnicas de cultivo. Algunos ejemplos son, el Jardín Botánico del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara y el Jardín Botánico de la UNAM (Becerra, 2000).

No obstante todos los esfuerzos realizados por proteger la flora cactológica de nuestro país, no se ha logrado mucho con respecto a la disminución de la sobrecolecta, debido principalmente a la falta de conocimiento y entendimiento de la problemática de este grupo de plantas por parte del público en general (Becerra, 2000). Ésto, aunado con la actual degradación de los ecosistemas naturales donde se distribuyen las cactáceas, hace urgente implementar un programa de manejo y conservación de esta familia. Por ejemplo, alternativas de rescate y conservación como es el desarrollo de métodos eficientes de reproducción de especies con problemas de sobrevivencia en campo (Mauseth, 1979).

Germinación de semillas

Para que una semilla pueda germinar debe encontrarse en condiciones ambientales favorables para este proceso. Entre las condiciones requeridas están adecuados suministro de agua, temperatura y composición de los gases en la atmósfera, así como luz para ciertas semillas. Estos requerimientos varían entre especies y variedades, así como también son determinados por factores que prevalecen durante la formación de la semilla y por factores hereditarios. Es común que exista una correlación entre los requerimientos ambientales para la germinación y las condiciones ecológicas que existen en el hábitat de la planta (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

En la germinación, algunas semillas presentan un fenómeno denominado "latencia", la cual es un proceso en el que las actividades fisiológicas cesan de una manera reversible y puede darse aún cuando las condiciones ambientales son las adecuadas para que la semilla germine (suficiente humedad, aire y temperatura). Este fenómeno, ayuda a la sobrevivencia de las especie, impidiendo la germinación y el establecimiento de las plántulas cuando las condiciones no son las adecuadas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Se han definido distintos tipos de latencia por varios autores, Harper (1957), enuncia las siguientes:

- a) **Latencia innata o endógena:** Este tipo de latencia previene la germinación en la planta madre y por un periodo de tiempo después de la dispersión de las semillas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Se presenta cuando el embrión cesa su crecimiento y continúa hasta que el impedimento endógeno cesa. En ese momento las semillas están en condiciones de germinar en cuanto se presentan las condiciones ambientales adecuadas. Este tipo de latencia puede deberse a la presencia de inhibidores químicos en el embrión o a la inmadurez de éste. La duración es muy variable e incluso puede variar entre las semillas de un mismo

individuo. Algunos ejemplos son aquellas semillas que sólo germinan después de haber transcurrido el invierno, de haber sido almacenadas o expuestas a bajas temperaturas en el laboratorio o mediante la aplicación de hormonas vegetales, como el ácido giberélico (Vázquez-Yanes, *et al.*, 1997).

- b) **Latencia inducida o secundaria:** Este tipo de latencia se encuentra regulada por factores ambientales y se produce cuando las semillas están en condiciones fisiológicas para germinar y se encuentran en un medio que presenta alguna característica muy desfavorable, como poco oxígeno, concentraciones altas de CO₂, elevada temperatura, lo que puede producir alteraciones fisiológicas reversibles. También se le llama latencia secundaria y se caracteriza por la persistencia del estado de latencia aún cuando las semillas se regresan a condiciones favorables para su germinación. A veces este tipo de latencia se rompe por medio de un estímulo hormonal (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).
- c) **Latencia impuesta o exógena:** Este tipo de latencia se encuentra regulada por las condiciones ambientales, y se presenta en semillas aptas para la germinación en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, pero que continúan latentes por falta de luz, requerimientos especiales de temperatura, oxígeno u otro factor. En este caso, las semillas están listas para germinar inmediatamente después de que el factor ambiental limitante es removido. Generalmente se presenta en aquellas semillas que se encuentran en el suelo y que germinan sólo después de una perturbación que modifique el régimen lumínico o el contenido de oxígeno (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Vázquez-Yanes, *et al.*, 1997).

Las semillas de cactáceas que habitan en donde hay poco suministro de agua son quiescentes. En éstas, se han encontrado dos tipos de latencia, la innata o primaria y la impuesta o exógena (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Existe también lo que se le denomina **germinación retardada por una testa impermeable**. Este fenómeno se presenta debido a que algunas plantas

producen semillas cuya testa es dura e impermeable al agua o a los gases, e incluso el micrópilo está provisto de una barrera que impide la penetración de agua al embrión. Esta característica se encuentra presente de manera frecuente en la familia Cactaceae (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). El tránsito a través del tubo digestivo de animales es uno de los factores principales que rompen este tipo de latencia. Altas temperaturas también pueden romper los tegumentos, lo que sucede durante los incendios o quemas en los terrenos de cultivo. Los tegumentos también pueden cambiar su estructura después de ser expuestos a la insolación directa por periodos prolongados (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

También existe entre las semillas de plantas silvestres, una gran variabilidad en el comportamiento hacia la luz. Las semillas pueden ser divididas en aquellas que sólo germinan en la obscuridad, las que germinan en luz continua, aquellas que germinan después de haber sido brevemente iluminadas y las que son indiferentes a la presencia o ausencia de luz durante la germinación. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que las distintas zonas del espectro luminoso afectan la germinación de manera diferente (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

La familia Cactaceae, es una de las familias menos estudiadas con respecto a aspectos relacionados con la germinación de sus semillas (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997). Ésta se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país y es de gran importancia ecológica, científica y económica. Debido a las actuales presiones en las poblaciones naturales ocasionadas por actividades humanas (deforestación, agricultura, colecta ilegal, contaminación, etc.) es muy importante estudiar las capacidades de sus semillas para proveer un mejor manejo de los recursos naturales y también estimular su propagación artificial en invernaderos (Nolasco *et al.*, 1996).

Hoy en día, existe un gran número de especies de cactáceas amenazadas, por ello, es importante conocer los requerimientos de la germinación de sus semillas para poder entender el posible papel de los distintos factores ambientales en este importante proceso de su ciclo de vida (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997).

Cephalocereus apicicephalium

1. Clasificación botánica (Bravo-Hollis, 1978):

- Reino Vegetal
- División Embryophyta
- Subdivisión Angiospermae
- Clase Dicotyledoneae
- Orden Caryophyllales
- Familia Cactaceae
- Subfamilia Cactoideae
- Tribu Pachycereeae Buxb.
- Subtribu Pachycereinae Buxb.
- Género *Cephalocereus* Pfeiff.
- Especie *Cephalocereus apicicephalium* E. Y. Dawson (1948)

2. Descripción botánica

Plantas de 1.5 a 3 m de alto, color verde azulado opaco, simples o muy ramificadas en la base, formando grupos hasta de 10 tallos, ocasionalmente ramosos arriba cuando sufren lesiones. **Tallos** de 6.5 a 10 cm de diámetro con algunas constricciones poco marcadas (Figura 1f). Costillas 22 a 27, de 6 a 9 mm de alto; pseudocefalio bien desarrollado, terminal, de 2 a 4 cm de longitud, en el ápice de las ramas maduras, con abundantes pelos lanosos blancos que forman una borla lanosa. **Aréolas** elípticas, no muy lanosas, de 4 a 5 mm de largo, distantes entre sí 6 a 10 mm (Figura 1c). **Espinas** del pseudocefalio abundantes, al principio color paja claro (Figura 1d), algo ocultas, por la lana, volviéndose morenas con la edad. Espinas radiales como 12, delgadas, setosas, irregularmente

curvas o ligeramente torcidas. Espinas centrales 2 a 6, una prominente, casi recta, más rígida que las radiales, de 2 a 4 cm de largo, deflexas. **Flores**, angostamente campanuladas, de 5 a 6 cm de longitud, color rosa con tinte amarillento. Las flores emergen del pseudocefalio en forma de corona y sus restos permanecen en él por algún tiempo (Bravo-Hollis, 1978).

3. Distribución geográfica

La distribución geográfica corresponde a México, principalmente a los estados de Oaxaca y Chiapas. Fue encontrada por Dawson, al pie de un cerro rocoso, situado cerca del km 17 al noroeste de Tehuantepec, y también cerca de Unión Hidalgo, pocos kilómetros al este de Juchitán. MacDougall la señala en Oaxaca en los siguientes lugares: Cerro de Guiengola, en Mixtequilla, cerca del río Tehuantepec; en La Mata y La Ventosa en la carretera transístmica, y entre Tlacolulita y San Miguel Ecatepec. En Chiapas crece en las paredes rocosas del cañón del río Grijalva cerca del puente Belisario Domínguez, así como en la cañada del río de La Venta (cerca de las caídas El Aguacero) al oeste de Ocozocuatla (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).



Figura 1. (a y b) Semillas; (c) Planta joven de 2 años de edad; (d) Á pice con pseudocefalio; (e) Pseudocefalios en forma de anillos de un individuo adulto; (f) Individuos de población de Oaxaca; (g) Población de *C. apicicephalum* en Oaxaca en acantilado de roca caliza.

4. Importancia

Esta especie además de poseer una gran importancia ecológica como refugio y alimento de animales, sus frutos son comestibles y los tallos se ocupan como forraje para ganado (Casas, 2002).

Echinocereus pentalophus

1. Clasificación botánica (Bravo -Hollis, 1978 y Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

- Reino Vegetal
- División Embryophyta
- Subdivisión Angiospermae
- Clase Dicotyledoneae
- Orden Caryophyllales
- Familia Cactaceae
- Subfamilia Cactoideae
- Tribu Echinocereiae (Britt. et R.) Buxb.
- Género *Echinocereus* Eng.
- Especie *Echinocereus pentalophus* (De Candolle) Lemaire
- Nombre común "aliloche", "cardoncillo"

2. Descripción botánica

Tallos largos y delgados, erectos, postrados, procumbentes o colgantes, ramificados, de 15 a 30 cm de longitud, a veces cuando colgantes, más de 2 a 2.5 cm de diámetro, de sección cuadrangular o pentagonal (Figura 2a). Costillas 4 o 5 separadas por surcos profundos, con tubérculos bajos que se hacen prominentes hacia la extremidad de los tallos. **Aréolas** muy pequeñas, de 1.5 a 3 mm de diámetro, distantes entre sí 1.5 m, provistas cuando jóvenes de lana amarillenta, prolíferas cuando quedan en contacto con el suelo, dando origen a raíces adventicias y a nuevas ramas. **Espinas** radiales 3 a 6, cortas de 3 a 20 mm de longitud, rígidas, delgadas, con la base bulbosa, cuando jóvenes con tinte rosado,

después claras, con la punta de color castaño y finalmente grisáceas con la punta oscura. Espinas centrales casi siempre ausentes, cuando existen son más gruesas y más oscuras que las radiales. **Flores** de 7 a 10 cm de diámetro cuando bien abiertas (Figura 2b); escamas del pericarpelo y tubo receptacular con lana blanca y numerosas espinas setosas de color castaño; segmentos exteriores del perianto anchos, con el ápice redondeado, con una franja media verdosa y los márgenes rosa purpúreos; segmentos interiores del perianto, con la tercera parte inferior blanca o amarillenta y el resto de color purpúreo rojizo; filamentos cortos, verdosos; anteras amarillas; estilo ligeramente más largo que los estambres (Figura 2c), blanco con tinte violáceo; lóbulos del estigma 10 a 16, de color verde olivo. **Fruto** ovoide, de 12 a 15 mm le longitud, con aréolas caducas provistas de lana blanca y espinas color castaño (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991).



Figura 2. (a) *Echinocereus pentalophus* en fl oración; (b) Acercamiento de flor; (c) Lóbulos del estigma y estambres.

3. Distribución geográfica

La distribución de esta especie se extiende desde el Sur de Texas (E. U. A.), cerca del Río Bravo hasta el estado de Hidalgo, siguiendo por los estados de Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro.

Se ha encontrado en las siguientes localidades: Brownsville, Texas, (E. U. A.) por Roberto Runyon. En México, en la Presa Falcón, Tamaulipas, por D. B. Gold y H. Sánchez-Mejorada; entre Reynosa y Ciudad Victoria, y entre Ciudad Victoria y Jaumave, Tamaulipas, por H. Bravo; en el Mirador, cerca de Monterrey, Nuevo León, por Roberto Runyon; en el Huizache San Luis Potosí, por Eizi Matuda y D. B. Gold; en la Barranca de Tolimán, Hidalgo, por H. Bravo; en Vizarrón, Querétaro, por H. Bravo; en Metztitlán y Tolantongo, Hidalgo, por H. Sánchez-Mejorada (Bravo-Holis y Sánchez Mejorada, 1991).

4. Importancia

Esta especie posee una gran importancia ecológica como refugio y alimento de animales. La población rural del norte del país consume los frutos a los que les da el nombre de "alicoches". Esta especie es utilizada mayormente como ornamental por la extraordinaria belleza de sus flores.

Situación actual

Cephalocereus apicicephalum y *Echinocereus pentalophus*, se encuentran en el Apéndice II de la CITES.

Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

El principio de la totipotencialidad celular, base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*, fue postulado por Haberlandt (1902) (en Moebius, 1999). Él fue el primero en intentar el cultivo sistemático *in vitro* de células somáticas de plantas superiores, a fin de determinar los requerimientos para el óptimo desarrollo de distintos tipos de células (Höxtermann, 1997 en Moebius, 1999).

El CTV es un conjunto de técnicas, que consisten en cultivar asépticamente, estructuras vegetales tales como células, protoplastos, embriones, órganos, tejidos, etc., en un medio de composición química definida, que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo, en condiciones ambientales controladas, para dirigir sus respuestas morfogénicas (George y Sherrington, 1984). Esto se logra mediante la adición de reguladores de crecimiento, los cuales estimulan la proliferación de plantas completas gracias a la totipotencialidad inherente de las células vegetales (Dodds y Roberts, 1982).

La obtención de plantas nuevas a partir de los tejidos cultivados *in vitro* es posible mediante tres vías: (1) a partir de yemas preexistentes, promoviendo su crecimiento y proliferación, (2) a partir de la formación de brotes y/o embriones somáticos, tanto de manera directa, surgiendo del tejido u órganos de la planta madre o de manera indirecta, partir de tejido de callo, que es un cúmulo de células desorganizadas (George y Sherrington, 1984).

De manera general, George y Sherrington (1984) establecen cinco etapas para llevar a cabo el proceso de la micropropagación:

- **Etapla 0** o selección de la planta madre y preparación, la cual debe ser típica de la variedad y estar libre de enfermedades.
- **Etapla 1** o establecimiento de un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado. El éxito de esta etapa requiere que los explantes puedan ser transferidos al medio de cultivo sin contaminarse, así como también que continúen con su desarrollo.

- **Etapa 2** o de producción de propágulos, es la etapa en donde se da la multiplicación de órganos y estructuras que sean capaces de dar como resultado plantas nuevas intactas.
- **Etapa 3** o de preparación para el crecimiento en condiciones *ex vitro*. En esta etapa se da el desarrollo y crecimiento de los brotes o plántulas derivadas de la etapa 2, así como también incluye el enraizamiento *in vitro*. En esta etapa es cuando se prepara a las plántulas para que puedan llevar a cabo la fotosíntesis y sobrevivir sin un suplemento artificial de carbohidratos.
- **Etapa 4** o de transferencia al ambiente natural (aclimatización *ex vitro*). En esta etapa se da la preparación de las plántulas cultivadas en condiciones *in vitro* bajo un ambiente de alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medio de cultivo rico en compuestos orgánicos. Dichas condiciones causan cambios en la morfología y fisiología de las plantas que tiene como consecuencia que la mayoría no sean capaces de sobrevivir a las condiciones *ex vitro* sin una previa preparación gradual. En esta fase factores como el fotoperiodo, humedad relativa y tipo de sustrato utilizado, así como también el manejo de plantas y control fitosanitario son muy importantes para el éxito de esta etapa.

Por otro lado, se han definido de manera general los factores necesarios para lograr el establecimiento exitoso de los cultivos *in vitro*:

1. Los cultivos *in vitro* se inician a partir de partes de la planta completa, los pequeños órganos o partes de tejido que son empleados se les denomina **explantes**. La parte de la planta a partir de la cual se toman los explantes depende del tipo y propósito del cultivo y la especie vegetal en cuestión (George y Sherrington, 1984). Puede ser cualquier parte de la planta como raíz, tallo, hojas, anteras, etc. Es importante la edad fisiológica del explante puesto que determina el tipo y la velocidad de morfogénesis, en relación con el tipo de medio de cultivo

en que se siembre. Generalmente los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación en comparación con los tejidos maduros (Robert y Loyola, 1985).

2. **Asepsia y esterilidad**, son elementos fundamentales para el establecimiento exitoso de los cultivos, tanto el material vegetal, medio de cultivo, como el instrumental y equipo deben de estar libres de cualquier agente contaminante. Para ello, son empleados distintos métodos para eliminar los agentes causales de la contaminación microbiana de los cultivos, tales como desinfectantes (hipoclorito de sodio, etanol, etc.) o por medio de calor húmedo o irradiación ultravioleta, entre otros (George y Sherrington, 1984). También es posible la utilización de diversos antibióticos, fungicidas o biocidas como el PPM de la compañía Plant Cell Technology. El PPM es un biocida de amplio espectro, que previene y reduce la contaminación microbiana efectivamente, en técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Es utilizado para combatir la contaminación microbiana proveniente del aire y agua, matando a las bacterias y células fúngicas, y previniendo la germinación de esporas. También, en concentraciones más elevadas, puede eliminar problemas de contaminación endógena. El manual anexo al producto, indica que una dosis óptima de PPM, no perjudica la germinación, la proliferación y regeneración de callo. Actualmente, es empleado con éxito por muchas instituciones, universidades, empresas, laboratorios privados y viveros (<http://www.ppm4plant-tc.com>).

3. El **medio de cultivo** consiste de una solución de sales que suministran los micro y macroelementos necesarios para el crecimiento de las plantas, vitaminas (opcional), aminoácidos (opcional) y una fuente de carbono como fuente de energía (generalmente sacarosa). Hoy en día existen diversos medios de cultivo de acuerdo a las necesidades de los distintos grupos vegetales, así como también los objetivos de la investigación. Uno de los más utilizados es el de Murashige y Skoog (Robert y Loyola, 1985).

4. Los **reguladores de crecimiento** son compuestos orgánicos que actúan en pequeñas cantidades y estimulan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de las plantas. Éstos constituyen, junto con el tipo y estado de desarrollo del explante, los factores más importantes en la determinación de las respuestas morfogénicas del tejido (George y Sherrington, 1984). Actualmente los reguladores de crecimiento se dividen en 3 grupos principales: (1) promotores de crecimiento: *auxinas*, *citocininas* y *giberelinas*; (2) inhibidores de crecimiento: *ácido abscísico* y *etileno* y (3) un nuevo grupo que incluye a las *poliamidas*, que poseen un efecto regulatorio en el desarrollo y crecimiento; los *jasmonatos*, que promueven la senescencia, abscisión y maduración de los frutos, formación de pigmentos y como defensa ante los ataques de depredadores o patógenos; *ácido salicílico* que aumenta la longevidad de las flores, inhibe la biosíntesis de etileno y la germinación, así como también revierte los efectos del ABA, y los *brasinoesteroides* que son de origen lipídico y provocan efectos sobre el crecimiento y desarrollo, inducen el alargamiento y división celular, promueven la biosíntesis de etileno, y aumenta la resistencia a situaciones de estrés hídrico, por exceso de salinidad y bajas temperaturas (Pérez, 1998).

Los reguladores de crecimiento empleados más frecuentemente en el cultivo de tejidos vegetales son las auxinas y las citocininas (George y Sherrington, 1984). Las auxinas se sintetizan principalmente en los meristemos apicales, y son las encargadas de estimular la elongación celular, así como también activan el crecimiento en espesor de los tallos y promueven la formación de raíces. Las citocininas, se concentran en las zonas de tejido con crecimiento activo, predominando en las raíces, puesto que son sintetizadas en sus ápices. Éstas activan principalmente la división celular y retardan la senescencia de los órganos. Ambos tipos de reguladores de crecimiento son empleados en CTV para inducir respuestas morfogénicas a los cultivos (George y Sherrington, 1984).

La relación entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento, es importante con respecto a la respuesta que se quiere producir en los cultivos *in vitro*. Aunque las concentraciones precisas de auxinas y citocininas difieren de una

especie a otra, en general se ha establecido que una baja concentración de auxina en combinación con una alta concentración de citocinina, estimula la proliferación de brotes, mientras que una alta concentración de auxina en combinación con una baja de citosina promueve la formación de raíces en los explantes (George y Sherrington, 1984).

5. **Condiciones ambientales controladas**, como luz y temperatura. Con respecto a la luz, tanto la duración (fotoperiodo) como la calidad (longitud de onda e intensidad), son factores importantes, por sus efectos en el fitocromo en el proceso de la fotosíntesis, influyendo en la síntesis y la acumulación de almidón, así como también, en las hormonas endógenas, afectando por ello, el desarrollo del inóculo o explante. La temperatura, la cual varía según la especie en cuestión, las temperaturas específicas pueden oscilar entre los 20 y 32 °C, aunque muchas especies requieren de temperaturas bajas para dar lugar al crecimiento y desarrollo (Thorpe y Patel, 1984). Otro factor es el material con el que se cierra el recipiente de los cultivos (aluminio, plástico, parafilm, entre otros), ya que este puede influir en el intercambio gaseoso del material vegetal y por ello afectar su desarrollo morfogénético con la acumulación de gases como el oxígeno, bióxido de carbono y el etileno (Roberts y Loyola, 1985).

El CTV ha constituido una útil herramienta en diversas áreas de la ciencia y tecnología: (1) en la investigación básica, proporcionando modelos para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos y de genética molecular; (2) micropropagación de cultivares (papa, maíz, café, aguacate, mango entre otras); (3) preservación de germoplasma tanto de especies de interés agronómico, como especies silvestres escasas en la naturaleza, representando una alternativa para su estudio, conservación y propagación (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979; Clayton *et al.*, 1990; Fay y Gratton, 1992) y (4) para el mejoramiento genético, entre otras (Robert y Loyola, 1985). Mediante esta metodología, es posible la obtención de altas tasas de multiplicación de plantas

libres de patógenos, a partir de un explante inicial, en cortos periodos de tiempo, en comparación con los métodos de propagación convencional (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de interés agrícola, medicinal, ornamental y forestal propagadas por cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984).

Nombre común	Especie	Explante	Tipo de cultivo	Morphogenesis	Referencia
Avena	<i>Avena sativa</i>	Semillas germinadas	Callo	Brotos y raíces	Carter <i>et al.</i> , 1967
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Peciolos	Callo	Brotos adventicios	Johnson <i>et al.</i> , 1980
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	Ápices de brotes	Ápices de brotes	Brotos axilares y adventicios	Marani y Pisi, 1977
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>	Tallo	Nodos	Proliferación de brotes y enraizamiento	Yang (1976) y Chin (1982)
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	Raíz, peciolos y pedúnculo de inflorescencia	Callo	Embriogénesis somática y regeneración de plantas	Halperin y Wetherell (1964); Halperin (1964)
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hoja	Callo	Brotos y raíces	Kartha <i>et al.</i> , 1976, 1980
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	Parte del arriba del receptáculo	Callo	Brotos y raíces	Cellarova <i>et al.</i> , 1982
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	Raíces y cotiledones	Callo	Embriogénesis, brotes adventicios y raíces	Choi <i>et al.</i> , 1982
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Hipocotilo y cotiledones	Callo	Brotos adventicios	Maheshwari <i>et al.</i> , 1967
Petunia	<i>Petunia axillaris</i>	Anteras	Callo	Regeneración de plantas	Mitchell <i>et al.</i> , 1980
Eucalipto	<i>Eucalyptus terreticornis</i>	Yemas terminales	Ápices de brotes	Brotos múltiples	Mascarenhas <i>et al.</i> , 1982
Sauce lloron	<i>Salix babylonica</i>	Ápices de brotes	Meristemos	Brotos	Beauchesne, 1979

Cuando las plantas son regeneradas *in vitro* con fines de conservación, es recomendable un mantenimiento de la estabilidad genética, por ello, las plantas derivadas del desarrollo de meristemos preexistentes consideradas genéticamente estables, se les considera como las adecuadas (Fay y Gratton, 1992). En cambio, cuando interviene una fase de callo, existe la posibilidad de que se de algún tipo de variación somaclonal causando que las características del cultivo se vean alteradas y que las plantas no sean "idénticas" (clones) a la planta madre origen (George y Sherrington, 1984).

Oxidación

La coloración del medio o explantes que se tornan color café o negros, es un fenómeno frecuentemente observado durante el proceso del establecimiento de los cultivos con el propósito de micropropagación. Esto puede ser señal de un problema potencial y puede significar que se debe hacer uso de técnicas especiales para la obtención de explantes sanos y con rápido crecimiento (Preece y Compton, 1991).

Una gran variedad de técnicas han sido empleadas para superar estos problemas, entre las cuales se encuentran: un especial cuidado en la preparación de los explantes, el uso de antioxidantes para sumergir los explantes antes de la siembra o adicionados al medio, la elección de un medio de cultivo distinto, cambiando los niveles de sacarosa del medio, el uso de medio líquido en lugar de medio solidificado con agar, cambiando los reguladores de crecimiento o simplemente agregarlos por pulsos, el uso de carbón activado, incubación de los cultivos con bajas intensidades de luz o en completa oscuridad, descartando los explantes que se tornan cafés, cambiando los explantes a medio fresco o a otro lugar dentro del mismo frasco (Preece y Compton, 1991).

La autotoxicidad causada por exudaciones se encuentra ampliamente distribuida en el reino de las plantas (Preece y Compton, 1991).

Cuando los tejidos sufren un daño, como el causado por la acción de corte de los explantes, comúnmente se liberan varios compuestos que se oxidan y causan que el tejido se torne de color café o negro (Preece y Compton, 1991). La oxidación del tejido ocurre a través de la acción de enzimas tales como la polifenol oxidasa, peroxidasa y la tirosinasa, las cuales son liberadas o sintetizadas y se presentan en condiciones oxidativas cuando los tejidos son dañados, o por compuestos como los polifenoles, que se oxidan al contacto con el aire. Los sustratos para estas enzimas varían en diferentes tejidos, siendo comunes la tirosina y los o-hidroxi-fenoles, como el ácido clorogénico. Las polifenoloxidasas se encuentran confinadas en los plástidos cuando el tejido está sano o no se encuentra senescente. Cuando las plantas sufren un daño, los compuestos fenólicos localizados en las vacuolas, se mezclan con el contenido de los plástidos y otros organelos, causando la aparición de la pigmentación oscura asociada a los compuestos polifenólicos oxidados. Cuando los fenoles se oxidan forman compuestos llamados quinonas. Éstos, son altamente reactivos debido a que se polimerizan rápidamente y a que forman enlaces covalentes con las proteínas. La actividad enzimática se inhibe a causa de los compuestos polifenólicos oxidados dando como resultado un declive u oxidación letal de los explantes (George y Sherrington, 1984; Preece y Compton, 1991).

El problema de la oxidación es comúnmente encontrado en la micropropagación de árboles, pero también en otras especies de importancia agrícola u ornamental (Tabla 3) (Preece y Compton, 1991).

Tabla 3. Tratamientos de prevención de oxidación en especies de importancia agrícola, forestal y ornamental (Preece y Compton, 1991).

Especie	Nombre común	Prevención de oxidación	Referencia
<i>Acer rubrium</i>	Maple rojo	Enjuague ac. ascórbico (150 mg/l) y PVP (5, 10, 20 mg/l) en el medio de cultivo	Welsh <i>et al.</i> , 1997
<i>Cephalotus follicularis</i>	Planta carnívora	Obscuridad por 6 semanas	Adams <i>et al.</i> , 1979
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucalipto rosado	Enjuague con agua destilada y obscuridad por 8 días	Durand-Cressvell <i>et al.</i> , 1982
<i>Quercus lebanii</i>	Cedro de Líbano	PVP 200 mg/l en el medio de cultivo	Srivastava y Steinhauer, 1982
<i>Rhododendron sp.</i>	Azalea	Enjuague con ác. cítrico (150 mg/l), ác. ascórbico (100 mg/l), reducción de KNO ₃	Anderson, 1975
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao	Sumergir yemas en medio líquido	Orchard <i>et al.</i> , 1979

Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas

Las cactáceas representan un grupo taxonómico con un alto número de especies en peligro de extinción. Éstas, por lo general presentan lento crecimiento, condiciones muy específicas y esporádicas de floración, producción de semillas, germinación y producción de descendencia; por ello, los métodos convencionales de propagación llevados a cabo mediante semillas, vástagos, esquejes o injertos, en muchas ocasiones resultan inadecuados en especies que no producen brotes, que tienen una tasa de germinación baja y/o crecimiento lento (Clayton, *et al.*, 1990). El CTV representa una alternativa para el estudio, conservación y propagación masiva de especies de lento crecimiento y de aquellas que se encuentran en peligro de extinción (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992), técnica que permite una producción rápida y continua de plantas, ayudando a superar algunas

de las dificultades asociadas a la propagación convencional (Malda *et al.*, 1999). Algunos investigadores han propuesto que el uso de CTV, es de gran utilidad para propagar especies de esta familia (Mauseth, 1979a; Johnson y Emino, 1979), puesto que se ha observado, particularmente en el caso de las cactáceas, que las plántulas derivadas *in vitro* crecen mucho más rápido y presentan un número considerablemente mayor de brotes (Rodríguez y Rubluo, 1992).

Hace casi 50 años, que se realizaron los primeros reportes de cultivo de tejidos en cactáceas. El primero con resultados exitosos en el cultivo de fragmentos de tallos de cactáceas fue King (1957), el cual logró promover la formación de callo en distintas especies de cactáceas (Vyskot y Jara, 1984). A partir de entonces, la mayoría de los reportes han tenido como fin la propagación de especies (Bonnes *et al.*, 1993); sin embargo, también se han realizado estudios con distintos fines, como por ejemplo, el estudio de Sacher e Iyer, en el año de 1959 (en Fay y Gratton, 1992), en el cual se investigó la formación de callo bajo los efectos de auxinas, citocininas y giberelinas en tejido de placenta de *Opuntia dillenii*; en el año de 1962, Steinhart (en Johnson y Emino, 1979), en un estudio sobre metabolitos secundarios, logró obtener la formación de callo en *Trichocereus spachianus*, para estudiar la biosíntesis de alcaloides. Mauseth realizó estudios morfogénéticos en *Opuntia polyacantha* y *Echinocereus engelmannii* (Mauseth y Halperin, 1975; Mauseth, 1976, 1977 y 1979a). En el año de 1974, Minocha y Mehra, obtuvieron formación de callo derivado de explantes de tallo y órganos florales en *Neomammillaria prolifera*. Seenii y Gnanam en 1980 (en Fay y Gratton, 1992), realizaron estudios a partir de células en suspensión de *Chamaecereus sylvestrii*, acerca de la fotosíntesis en plantas CAM. Havel y Kolár (1983) (en Fay y Gratton, 1992), reportan un método para la extracción aséptica de tejidos sin causar daño a la planta madre; Dabekaussen *et al.* (1991) (en Fay y Gratton, 1992) reportaron los factores que afectan la activación areolar en *Sulcorebutia alba* y Bonnes *et al.* (1993), reportan la producción de pigmentos en callo de *Cephalocereus senilis*.

Sin embargo, el primer reporte con éxito en la obtención de plantas de cactáceas por medio del cultivo *in vitro* fue hasta el año de 1976, en *Mammillaria woodsi*, en donde se regeneraron brotes a partir de callo cultivado en medio MS con 2 mg/l de K y AIA, respectivamente. (Kolar *et al*, 1976 en Vyskot y Jara, 1984).

Mauseth (1979a) fue el primero en reportar organogénesis directa, logrando inducir la proliferación de brotes en 10 especies de cactáceas a partir de aréolas cultivadas en presencia de BAP (1-10 mg/l). A partir de entonces, se ha tratado de mantener cultivos más estables cuando se trata de plantas que son propagadas con propósitos de conservación (Fay y Gratton, 1992).

Los diversos reportes que existen actualmente sobre cultivo *in vitro* de cactáceas, indican que la proliferación de brotes en cactáceas es posible, a partir del rompimiento de la dominancia apical, y mediante la activación de las aréolas con la adición de una concentración muy baja de auxina con una alta de citocinina o citocinina sola, siendo que los niveles requeridos varían a nivel de especie (Fay y Gratton, 1992).

En la Tabla 4, se resume el tipo de explante, medio de cultivo, concentración y tipo de reguladores de crecimiento, así como también la respuesta obtenida en estudios de cultivo *in vitro* de diversas especies de cactáceas.

Tabla 4. Algunas especies de cactáceas cultivadas *in vitro*

Especie	Medio de cultivo	Explante	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Respuesta <i>in vitro</i>	Referencia	
<i>Mammillaria elongata</i>	MS modificado	Tubérculos sin espinas de plantas <i>ex vitro</i>	2,4-D (2-10) / KIN o 2iP (1-2)	Callo friable	Johnson y Emينو, 1979	
			KIN (20), 2iP (10-60) y BAP (80)	Brotes		
			2iP (10) / BAP (10)	Brotes más consistentes		
			ANA e IBA (60) / KIN o 2iP (1-2)	Enraizamiento		
<i>Cephalocereus senilis</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	2,4-D (2) / KIN (4)	Callo	Nava-Esparza y Yáñez, 1984	
<i>M. carmenae</i>	MS	Tubérculos con meristemos axilares de plantas <i>ex vitro</i>	ANA (1) / BAP (2)	Brotes	Vyskot y Jára, 1984	
<i>M. prolifera</i>			ANA (0.5-1) / BAP(0.5-1)			
<i>Astrophytum myrostigma</i>			Fragmentos de costilla con aréolas de plantas <i>ex vitro</i>			AIA (5) / KIN (0.5)
<i>Trichocereus spachianus</i>						
<i>Leuchtenbergia principis</i>	MS	Meristemos apicales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	ANA (0.1) / BAP (10)	Brotes	Starling, 1985	
<i>Ariocarpus trigonus</i>			ANA (0-1) / BAP (1-10)	Brotes esporádicos		
<i>Obregonia denegrii</i>						
<i>Astrophytum asterias</i>						
<i>M. san-angelensis</i>	MS	Secciones de tallo de plántulas <i>in vitro</i>	ANA (0- 0.1) / BAP (0.01, 0.1, 1,10)	Brotes individuales y múltiples	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989	
<i>M. haageana</i>			BAP (1 y 2)			
<i>Coryphanta macromeris</i>	MS modificado semisólido	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	2,4-D (0.1) / BAP (10)	Brotes	Smith <i>et al.</i> , 1991.	
<i>Aztekium ritteri</i>	MS modificado semisólido	Brotes de plantas germinadas y propagadas <i>in vitro</i>	BAP (0.1); ANA (0.01) / BAP (0.1)	Brotes	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992	
			2,4-D (2) / KIN (2)	Embriogénesis somática		
			ANA (1 y 2); IBA (1 y 2)	Enraizamiento		
<i>Gymnocalidium buldiamur.</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	BAP (4)	Brotes	Pasqual y Hoshika, 1992	
<i>M. bocassana</i>						
<i>Melocactus bellavistensis</i> subsp. <i>bellavistensis</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	ANA (1) / BAP (5)	Brotes	Hernández <i>et al.</i> , 1994	
			ANA (0.3) / 2iP (2)			

<i>Ariocarpus retusus</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	BAP (2) y 2iP (1) ANA (0.1) / BAP (0.5)	Brotes Embriones somáticos	Oguín-Santos, 1994
<i>Lophophora williamsii</i>	MS líquido con puente de papel filtro	Secciones con aréolas de plantas colectadas en campo	ANA (0.1) / KIN (1)	Brotes	Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997
<i>Turbincarpus laui</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	ANA (0-0.5) / BAP (2 - 3)	Brotes	Rosas <i>et al.</i> , 2001
<i>M. carmenae</i> <i>M. herrerae</i>	MS modificado	Plántulas germinadas <i>ex vitro</i>	ANA (5) /BAP (50)	Callo	Márquez-Castillo, 2001.
<i>Escobaria minima</i> <i>M. pectinifera</i> <i>Pelecypora aselliformis</i>	MS modificado	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	TDZ (0.5 y 0.05) BAP (5)	Brotes	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	ANA (1) / BAP (3)	Brotes por organogénesis y embriogénesis somática	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aselliformis</i>	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	BAP (2) o KIN (1)	Brotes	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003
<i>P. strobiliformis</i>	MS modificado	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	ANA (0.05)	Brotes	Flores-Sánchez, 2004.

Cultivo de tejidos en los géneros *Cephalocereus* y *Echinocereus*

No existen estudios sobre cultivo *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalium*. Son contados los antecedentes de estudios diversos con una especie cercana, *C. senilis*. Uno de ellos hace referencia al estudio y establecimiento de cultivos de callo en suspensión en medio Lin y Staba (1961) suplementado con 2% de sacarosa, ANA (10 mg/l) y BAP (2 mg/l). Este estudio hace referencia a la producción de un pigmento rojo-naranja bajo ciertas condiciones de cultivo, así como también, bajo la acción de infección fúngica (Bonnes *et al.*, 1993). Otros dos estudios, hacen referencia a cultivos *in vitro* para el análisis de una aurona fitoalexina, con propiedades antibacteriales (Paré *et al.*, 1991 y 1992). Un cuarto estudio, fue sobre regeneración *in vitro*, en donde se emplearon distintas concentraciones de kinetina en combinación con ANA, AIB y AIA que resultaron en la muerte de los individuos por reacciones de oxidación o intoxicación por compuestos fenólicos, y en donde el mejor resultado se obtuvo con la utilización de KIN (4 mg/l) en combinación con 2,4-D (2 mg/l), con la obtención de callo sin lograr la formación de yemas, ni el enraizamiento de los callos (Nava-Esparza y Yáñez, 1984). Y por último, un estudio realizado por Pérez-Molphe-Bach *et al.* (1998), en donde se logró la regeneración *in vitro* de plántulas de *C. senilis* hasta su establecimiento en suelo.

Tampoco existen estudios sobre el cultivo *in vitro* de *Echinocereus pentalophus*. Con respecto al género, son pocos los estudios de cultivo *in vitro*. Mauseth (1979), investigó como afectan la nutrición, la obscuridad, así como también varios reguladores de crecimiento en diversas concentraciones, el desarrollo y organización celular de los meristemas apicales de brote, de *Echinocereus engelmannii*. Ault y Blackmon (1985), realizaron un estudio de varias especies de cactáceas, entre las cuales se encontraba *Echinocereus pectinatus*. El estudio de las respuestas *in vitro* de esta especie, fue retomada por Pérez-Molphe-Bach *et al.* (1998), en un estudio sobre la micropropagación de 21 especies de cactáceas mexicanas por medio de proliferación de yemas axilares, dentro de las

cuales también se encontraba *E. dubius*. En este estudio, dichas especies mostraron una mejor y mayor formación de brotes en presencia de ANA (0.01 mg/l) y BAP (1 mg/l), logrando establecer plantas en suelo.

III. JUSTIFICACIÓN

Cephalocereus apicicephalium es una cactácea columnar endémica de México, de gran importancia biológica, ecológica, económica y con un alto potencial ornamental. Desafortunadamente su aprovechamiento se basa en la colecta de ejemplares de poblaciones silvestres, aunado a la destrucción del hábitat en el que se distribuye, poniendo en peligro la sobrevivencia de la especie. Su largo ciclo de vida y lento desarrollo, hacen más crítica su situación, de ahí la urgente necesidad de buscar métodos alternos de propagación.

Echinocereus pentalophus es una cactácea con gran importancia ecológica, económica y ornamental debido a la belleza de sus flores y frutos comestibles. Su propagación es muy lenta ya que se reproduce por medio de vástagos y esquejes. Su amplio aprovechamiento podría generar fuentes económicas para las comunidades rurales, sin embargo se ve limitado por la falta de un procedimiento más efectivo de propagación.

El cultivo de tejidos vegetales ha probado en repetidas ocasiones ser una herramienta útil y viable para la propagación masiva de plantas en peligro de extinción, o que pudieran llegar a estarlo, así como también de aquellas con potencial ornamental, en periodos cortos de tiempo.

El presente estudio está enfocado a la regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalium* y *Echinocereus pentalophus*, a partir de su germinación y de la exploración del potencial morfogénico de explantes disectados de plántulas germinadas *in vitro*, como medidas para su conservación y como alternativa para su aprovechamiento sustentable.

IV. HIPÓTESIS

Si las células contienen y pueden expresar la información genética para desarrollar tejidos, órganos e individuos completos, y estos procesos son regulados en gran medida por las condiciones de cultivo, entonces es posible que con la utilización de distintas concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas), se induzca el potencial morfogénico a partir de plántulas germinadas *in vitro*, para la regeneración de plantas completas.

V. OBJETIVOS

General:

- Explorar las condiciones de cultivo para la regeneración *in vitro* de plantas completas de *Cephalocereus apicicephalium* y *Echinocereus pentalophus*.

Particulares:

- Determinar las condiciones para la germinación *in vitro*.
- Explorar el potencial morfogénico tanto de semillas cultivadas en presencia de reguladores de crecimiento (*C. apicicephalium*), como de secciones de plántulas germinadas *in vitro* en presencia de citocininas (BAP) y auxinas (ANA).
- Explorar rasgos estructurales (histológicos) de diferenciación en los cultivos de callo de *C. apicicephalium*.
- Determinar los requerimientos para el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *Echinocereus pentalophus*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cephalocereus apicicephalium

1. Material biológico

Se utilizaron dos lotes de semillas de *Cephalocereus apicicephalium*. El primero, colectado en el año 2002 en Oaxaca, donado por el Área de Colecciones del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, y el segundo donado por un vivero en Texas, E. U. A., sin información de localidad, ni año de colecta.

2. Germinación

Para determinar qué parámetros están involucrados en la germinación, se hicieron los siguientes ensayos:

Tabla 5. Tratamientos de germinación aplicados a semillas de *C. apicicephalium*.

Medio de cultivo	Tratamiento		
MS 50%	Barrido hormonal	ANA(0,0.1,0.5,1y2)/BAP(0,1,2y3)mg/l	
	Ácido giberélico adicionado al medio de cultivo	0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/l	
	Siembra de embriones		
	Medio líquido en puente de papel filtro		
	Imbibición	12, 24, 48, 72 y 96 h	
	Escarificación	H ₂ O ₂ , HCl y H ₂ SO ₄	
	Estratificación	Frío 4 °C (1 mes)	
	Combinados	Escarificación con imbibición	H ₂ SO ₄ (1 min)+H ₂ O 24 y 72 h
		Temperatura con imbibición	H ₂ O 50 °C + H ₂ O 12 y 24 h
		Imbibición 72 h con siembra en luz y obscuridad	
Imbibición 72 h con comparación de medios MS 50% y MS			
MS	Control		
	Escarificación con imbibición	H ₂ SO ₄ (1 min)+H ₂ O 24 y 72 h	
	Temperatura con imbibición	H ₂ O 50 °C + H ₂ O 24 h	

Todos los tratamientos de germinación fueron de 25 semillas cada uno, con 5 semillas por frasco, excepto en el que se utilizó el barrido hormonal ANA/BAP (tratamiento sin análisis estadístico).

A. Germinación en barrido hormonal ANA/BAP

A. 1. Desinfección de semillas

Las semillas se lavaron en una solución de detergente comercial durante 5 minutos en agitación constante y después se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, se agitaron en una solución de alcohol etílico industrial al 70% (v/v), durante 30 seg. Finalmente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico con 6% de cloro activo) al 30% (v/v), adicionado con 2 gotas de solución Tween 80/100 ml durante 30 minutos en agitación constante. Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Fay y Gratton, 1992 modificado).

Las semillas fueron sembradas en frascos de vidrio con 25 ml de medio MS 50% (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 30 g/l (Apéndice I), adicionado con reguladores de crecimiento ANA y BAP (Tabla 6) en un barrido de 20 tratamientos, el pH fue ajustado a 5.7, con soluciones de HCl y/o NaOH 0.1 N, previo a la adición de Phytigel 5 g/l (Apéndice I). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C a una presión de 1.5 kg/cm² durante 17 minutos.

Tabla 6. Barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP (mg/l), aplicados a semillas de *C. apicicephalum*.

BAP ANA	0	1	2	3
0	1*	2	3	4
0.1	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12
1	13	14	15	16
2	17	18	19	20

***No. de tratamiento**

Se sembraron 10 frascos por tratamiento, colocando 2 semillas por frasco. La mitad de cada tratamiento (10 de 20 de cada tratamiento), se colocó en condiciones de fotoperiodo (16 h luz / 8 h obs), mientras que la otra mitad se colocó en condiciones de oscuridad constante.

A. 2. Condiciones de incubación

Todos los cultivos de nuestro estudio, fueron colocados en una cámara de incubación bajo condiciones ambientales controladas, con una temperatura de 26 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz con una intensidad de $29.29 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (PAR $50\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$), por 8 h de oscuridad. Esta misma cámara de incubación se utilizó para mantener los cultivos de los tratamientos de germinación en oscuridad constante.

A. 3. Cultivo de explantes e inducción

Transcurridos 4 meses de inducción, se analizaron las respuestas de los cultivos y se seleccionaron 2 tratamientos: el 7 (0.1 mg/l ANA y 2 mg/l BAP), por la formación de la mayor cantidad de brotes, y el 18 (2 mg/l ANA y 1 mg/l BAP), por la mayor cantidad de callo (biomasa) con la menor oxidación (Tabla 6).

Callos y plántulas obtenidos de los cultivos de semillas en medio de inducción (barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP), fueron utilizados como explantes. Éstos se dividieron de acuerdo a su tamaño en 1, 2 ó 3 partes iguales. La división se realizó de la siguiente manera: los cultivos con la mayor cantidad de biomasa (3 x 3 – 2 x 2 cm) se dividieron en tres tratamientos: 7, 18 y medio MS 50% sin reguladores de crecimiento (control). Aquellos con menor biomasa (1.9 x 1.9 – 1 x 1 cm) se dividieron en 2 partes y se sembraron en los tratamientos, 7 y control. Finalmente, los más pequeños (menores de 0.5 x 0.5 cm), sólo se subcultivaron en el tratamiento control (Tabla 7).

Tabla 7. División de los explantes obtenidos a partir de la germinación *in vitro* de *C. apicicephalum* con barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP.

Tamaño del explante (cm)	No. de secciones	Medios de inducción
Grande 3 x 3 – 2 x 2	3	control Trat. 7 Trat. 18
Mediano 1.9 x 1.9 – 1 x 1	2	control Trat. 7
Pequeño < 0.5 x 0.5	1	control

A. 4. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos

Transcurridas 2 semanas en el medio de inducción, la mayoría de los explantes presentaron oxidación severa. Para tratar de reducir la oxidación, se sumergieron en una solución de ácido cítrico (100 mg/l) con ácido ascórbico (150 mg/l) por 30 minutos, para después subcultivarlos en medio MS 50% semisólido (Phytigel 5 g/l) con macros al 25% y carbón activado (1 g/l), en los tratamientos correspondientes. Posteriormente se colocaron en la cámara de incubación, en donde se cubrieron con hojas de papel para disminuir la intensidad lumínica, por un periodo de 2 semanas.

Después de 2 semanas, al observar que la oxidación no había sido controlada, los explantes se subcultivaron en medio MS 50% líquido con puente de papel filtro Whatman No. 1, adicionado con PVP 1 g/l, en los tratamientos correspondientes, en donde se dejaron por un periodo de 2 meses. Recién subcultivados, se colocaron dentro de la cámara de incubación con hojas de papel por un periodo de 2 semanas.

Aquellos cultivos que presentaron aparición de brotes (control y 7) (Tabla 6) ya sea por organogénesis directa o indirecta, se subcultivaron en medio MS 50%, adicionado con PVP 1 g/l, gelificado con Phytigel 6 g/l, para evitar la hiperhidratación de los brotes y contribuir a una mayor consolidación. También se subcultivaron en el mismo medio los cultivos con callo no morfogenético.

Los explantes provenientes desde el principio del tratamiento 18 se subcultivaron de 3 maneras distintas:

1. En medio MS 50% líquido con puente de papel y PVP 1 g/l, para estimular generación de biomasa, con subcultivos en medio fresco cada 2 meses.
2. MS 50% líquido y PVP 1 g/l en agitación con los tratamientos 7 y 18 (Tabla 6), para tratar de inducir respuestas morfogenéticas. Después de 2 meses, se subcultivó en medio MS 50% semisólido (Phytigel 5 g/l), adicionado con PVP 1 g/l.

3. MS 50% semisólido (Phytigel 5 g/l), adicionado con PVP 1 g/l, sin reguladores de crecimiento.

A. 5. Estudio histológico de callo

La realización de estudios histológicos han apoyado al cultivo *in vitro* en el conocimiento de los procesos involucrados en la morfogénesis. El propósito de este análisis fue caracterizar histológicamente las estructuras desarrolladas en el callo proveniente del tratamiento 18 (2 mg/l ANA/ 1 mg/l BAP) del tratamiento de germinación con inducción con barrido de reguladores de crecimiento ANA/BAP.

a) Obtención de las muestras de callo

Se tomaron fragmentos del callo proveniente del tratamiento 18 (Tabla 6).

b) Fijación

Las secciones de callo fueron fijados con Navashin (Apéndice II) en viales de 20 ml de capacidad durante 24 horas (Johansen, 1940), en agitación constante y después se enjuagaron con agua corriente por 2 horas aproximadamente hasta eliminar todo el fijador (Sandoval, 2005).

c) Deshidratación

Posteriormente se deshidrató sumergiendo el callo en soluciones de alcohol terbutílico (TBA) (Apéndice III), al 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% y puro por duplicado, por 24 h respectivamente (Johansen, 1940; Sandoval, 2005).

d) Infiltración

Se desechó un poco del último cambio de TBA, para solo dejar el volumen que cubriera la muestra, es decir, el volumen inicial. Posteriormente, a intervalos de 1 h, se agregaron hojuelas de parafina pura (Curtis, 1986), colocando los viales tapados en la estufa a 60 °C, hasta doblar el volumen

inicial del último cambio de TBA puro. Después de alcanzado dicho volumen, se destaparon los viales colocándolos nuevamente dentro de la estufa para la completa evaporación del TBA, dejándolo de esta manera durante 24 h. Se vació la parafina del vial y se reemplazó con parafina pura fundida y se dejó en la estufa por un periodo de 48 h (Sandoval, 2005).

e) Inclusión

El material se incluyó en parafina pura del mismo punto de fusión. Para hacer los bloques, se vertió parafina fundida en recipientes de papel encerado y se colocó la muestra de callo en el centro, dejándolos enfriar y solidificar. Los cubos se refrigeraron a 4 °C por un intervalo de 2 a 3 h, después de las cuales se cortó el exceso de parafina y se montaron en una base de madera o portabloques, refrigerando nuevamente por 2 a 3 h (Sandoval, 2005).

f) Obtención de secciones histológicas

Se realizaron cortes de 10, 15 y 20 μm de espesor con un micrótopo de rotación American Optical 820. Los listones se colocaron en un baño de flotación (agua 23-25 °C + grenetina disuelta) hasta que estuvieron completamente extendidos (1 min aprox.), se recuperaron con un portaobjetos y se dejaron secar por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente (Sandoval, 2005).

g) Desparafinación y rehidratación

Se colocaron los portaobjetos en una canastilla y se introdujeron a la estufa (60 °C) por un periodo de 20 min para su desparafinación (Johansen, 1940). Para rehidratar las muestras se colocó la canastilla en un tren de alcoholes graduales, dejándolos 10 minutos en cada solución (xileno puro, xileno-alcohol 1:1, etanol absoluto, 96%, 70%, 50%, 30% y agua destilada) (Sandoval, 2005).

h) Tinción con Safranina "O" – Verde rápido

Se tiñeron las muestras con la técnica dicrómica safranina-verde rápido (Sass, 1958). Esta técnica de tinción utiliza dos colorantes selectivos para ciertos tejidos, proporcionando un buen contraste entre los distintos tipos celulares. La safranina tiñe estructuras nucleares, paredes celulares lignificadas, cutinizadas y suberizadas. El verde rápido es un colorante ácido que actúa sobre estructuras citoplasmáticas y paredes celulósicas.

Las muestras rehidratadas se tiñeron con safranina (Apéndice IV) durante 24 horas, para posteriormente lavarlas con agua destilada. Posteriormente se sometieron a un tren de deshidratación con alcoholes graduales 30%, 50, 70% y 96%, por un periodo de 5 min en cada uno. Se les agregó verde rápido (Apéndice V) durante 2 minutos, para después retirar el exceso de verde rápido con alcohol absoluto. A continuación se les aplicó aceite de clavo por un periodo de 8 minutos para finalmente colocarlas en xileno por 5 minutos (Sandoval, 2005).

i) Montaje

Las preparaciones se montaron utilizando resina sintética (Sass, 1958) y se dejaron secar en el horno (60 °C) durante un periodo de 15 a 20 días (Sandoval, 2005).

j) Limpieza y etiquetado

Una vez que ya se hubo secado la resina, las laminillas se limpiaron y etiquetaron con los siguientes datos: nombre de la especie, familia, fecha de obtención de la muestra, estructura, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de elaboración (Sandoval, 2005).

k) Registro

Las laminillas se observaron y fotografiaron con un fotomicroscopio Carl-Zeiss-Axioskop.

Las preparaciones permanentes obtenidas fueron depositadas en la colección de preparaciones histológicas del laboratorio de Apoyo a la Investigación del Jardín Botánico, IBUNAM.

B. Tratamientos de germinación

Las semillas se desinfectaron con el procedimiento citado anteriormente para después aplicarles distintos tratamientos de germinación que se describen a continuación.

B.1. Ácido giberélico: GA₃ 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/l, adicionado al medio de cultivo MS 50% semisólido (agar 8 g/l).

B.2. Siembra de embriones : Las semillas se remojaron por 24 h en agua destilada esterilizada; posteriormente, se removió la testa en condiciones asépticas y se sembraron en medio MS 50% semisólido (agar 8 g/l).

B.3. Medio líquido MS 50% con puente de papel filtro Whatman no. 1.

B.4. Imbibición Después de enjuagarlas 3 veces en condiciones asépticas, se sumergieron durante un periodo de 12, 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente, en agua destilada esterilizada y se colocaron en la cámara de incubación. Después de transcurridos los periodos correspondientes de imbibición, se sembraron en medio MS 50% semisólido, gelificado con agar bacteriológico 8 g/l.

B.5. Escarificación: Después de la sustancia escarificante, las semillas se enjuagaron en condiciones asépticas y se sembraron las semillas en medio MS 50% semisólido (agar 8 g/l).

- a) Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2): alcohol etílico industrial 70% (v/v) por 30 seg y después en peróxido de hidrógeno (4%) durante 20 minutos en agitación constante.
- b) Ácido clorhídrico (HCl): se sumergieron en HCl concentrado durante 5 minutos.
- c) Ácido sulfúrico (H_2SO_4): se sumergieron en H_2SO_4 concentrado durante 1 minuto.

B.6. Estratificación: las semillas se colocaron en refrigeración a 4 °C, por un periodo de un mes y se sembraron en medio MS 50% semisólido (agar 8 g/l).

B.7. Tratamientos combinados:

- a) Escarificación con H_2SO_4 e imbibición por 24 y 72 h, sembradas en MS 50% semisólido (agar 8 g/l).
- b) Agua caliente a 50 °C dejándola enfriar por periodos de 12 y 24 h a temperatura ambiente, sembradas en MS 50% semisólido (agar 8 g/l).
- c) Imbibición por 72 h, sembradas en MS 50% semisólido (agar 8 g/l), colocando unos frascos en condiciones de fotoperiodo y otros en oscuridad permanente.
- d) Imbibición por 72 h, sembrando las semillas en medio MS 50% y MS al 100% de los componentes, semisólido (agar 8 g/l).
- e) Tratamiento control de medio MS 100% semisólido (agar 8 g/l).
- f) Escarificación con H_2SO_4 e imbibición por 24 y 72 h, sembradas en MS 100% semisólido (agar 8 g/l).
- g) Agua caliente a 50 °C dejándola enfriar por 24 h, sembradas en medio MS 100% semisólido (agar 8 g/l)

B.8. Germinación *ex vitro*: Las semillas que no germinaron en los tratamientos mencionados anteriormente, así como también una muestra de 30 semillas, se lavaron en una solución de detergente (5 min), después con una solución de blanqueador doméstico al 30% (v/v) (5 min), se enjuagaron 3 veces con agua

destilada estéril. Se secaron y finalmente se sembraron en tierra para cactáceas (tepojal y tierra negra 1:1) previamente esterilizada por 30 minutos en horno de microondas (*sin análisis estadístico).

Se registró el número de semillas germinadas para cada uno de los tratamientos semanalmente por un periodo de 7 semanas.

Siembra masiva de semillas

Se realizaron 4 siembras masivas con lotes de 500 semillas c/u (2000 semillas en total) utilizando el tratamiento de imbibición por 72 h. Se sembraron 5 semillas por frasco.

3. Cultivo de secciones de plántulas

Los explantes se obtuvieron a partir de plántulas de 1-1.5 cm de longitud, germinadas *in vitro*. De cada plántula se obtuvieron cuatro explantes: uno apical, dos laterales y la raíz (Figura 3). Los explantes fueron sembrados con el área de corte en contacto con el medio de inducción. Para el control de oxidación, durante la disección de los explantes se ocupó una solución de ácido cítrico (100 mg/l) y ácido ascórbico (150 mg/l) previamente esterilizada.

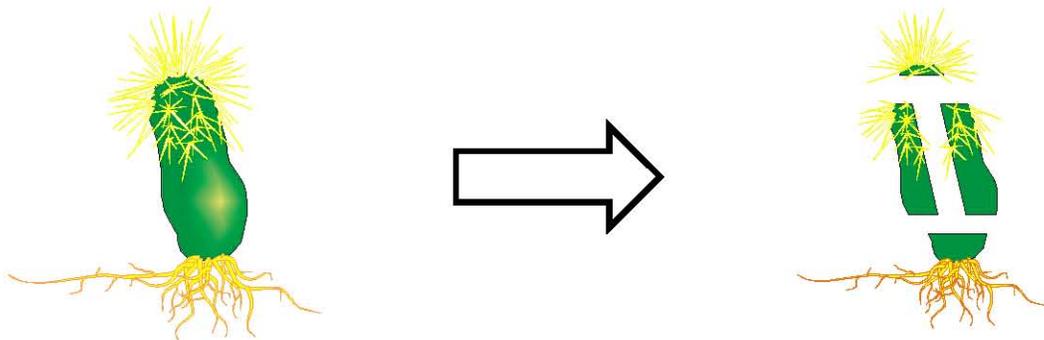


Figura 3. Disección de plántulas de *C. apicicephalium* para la obtención de explantes.

4. Inducción

Para tratar de inducir respuestas morfogénicas se utilizó medio MS 50% líquido con puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l y reguladores de crecimiento ANA/BAP y 2,4-D/KIN con la misma concentración (0.1 mg/l de auxina / 2 mg /l de citocinina), aplicado a 8 plántulas (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamientos con 2 pares de auxinas/citocininas, aplicado a 8 plántulas germinadas *in vitro* de *C. apiccephalium*, 4 plántulas por tratamiento

Tratamiento	Auxina (mg/l)	Citocinina (mg/l)
1	ANA	BAP
	0.1	2
2	2,4-D	KIN
	0.1	2

También se realizó, con la utilización de medio MS 50% líquido con puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l, un barrido de reguladores de crecimiento (ANA/BAP) de 8 tratamientos, aplicados a 8 plántulas, una por cada tratamiento (Tabla 9).

Tabla 9. Tratamientos de barrido hormonal ANA/ BAP (mg /l), aplicados a explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apiccephalium*, una plántula por tratamiento.

ANA \ BAP	1	3	5	7
0	1*	2	3	4
0.1	5	6	7	8

* No. de tratamiento

Se sembró un explante por frasco, excepto los explantes laterales que se sembraron en conjunto. Se realizaron observaciones semanales registrando distintas respuestas como la formación de callo, raíces, brotes directos y/o indirectos.

5. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos

Transcurridas 9 semanas en el medio de inducción (Tabla 8 y 9), los explantes se subcultivaron en medio MS 50% líquido con puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l. El siguiente subcultivo se realizó después de 2 semanas a medio MS 50% semisólido, adicionado con PVP 1 g/l, gelificado con Phytigel 5 g/l.

6. Prueba de viabilidad

Se realizó una prueba de viabilidad en una muestra de 25 semillas, utilizando el método de TTC (Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolium) (Tetrazolium Testing Handbook, 2001). Las semillas se colocaron por un periodo de 24 horas en imbibición a 4 °C dentro del refrigerador, después se removió la testa con cuidado de no dañar el embrión y se colocaron en una solución de TTC al 1% dentro de la cámara de incubación (26 ± 2 °C), en condiciones de obscuridad cubriendo el recipiente con papel aluminio y se dejaron ahí toda la noche. Finalmente se observaron al microscopio.

7. Análisis estadístico

Los tratamientos de germinación a los que se les aplicó el análisis estadístico se dividieron en 7 grupos (Tabla 5):

1. Ácido giberélico adicionado al medio
2. Siembra de embriones
3. Medio líquido en puente de papel filtro
4. Imbibición
5. Escarificación
6. Estratificación
7. Combinados

Empleando los valores de germinación para cada grupo de tratamientos, se aplicó una prueba de análisis de varianza de una sola vía MANOVA, utilizando el software Statistica 5.0 para verificar si existía diferencia significativa entre los 7 tipos de tratamientos. Posteriormente, se realizó la prueba LSD (plano de comparación) con el fin de determinar en qué tratamientos se encontraban las diferencias.

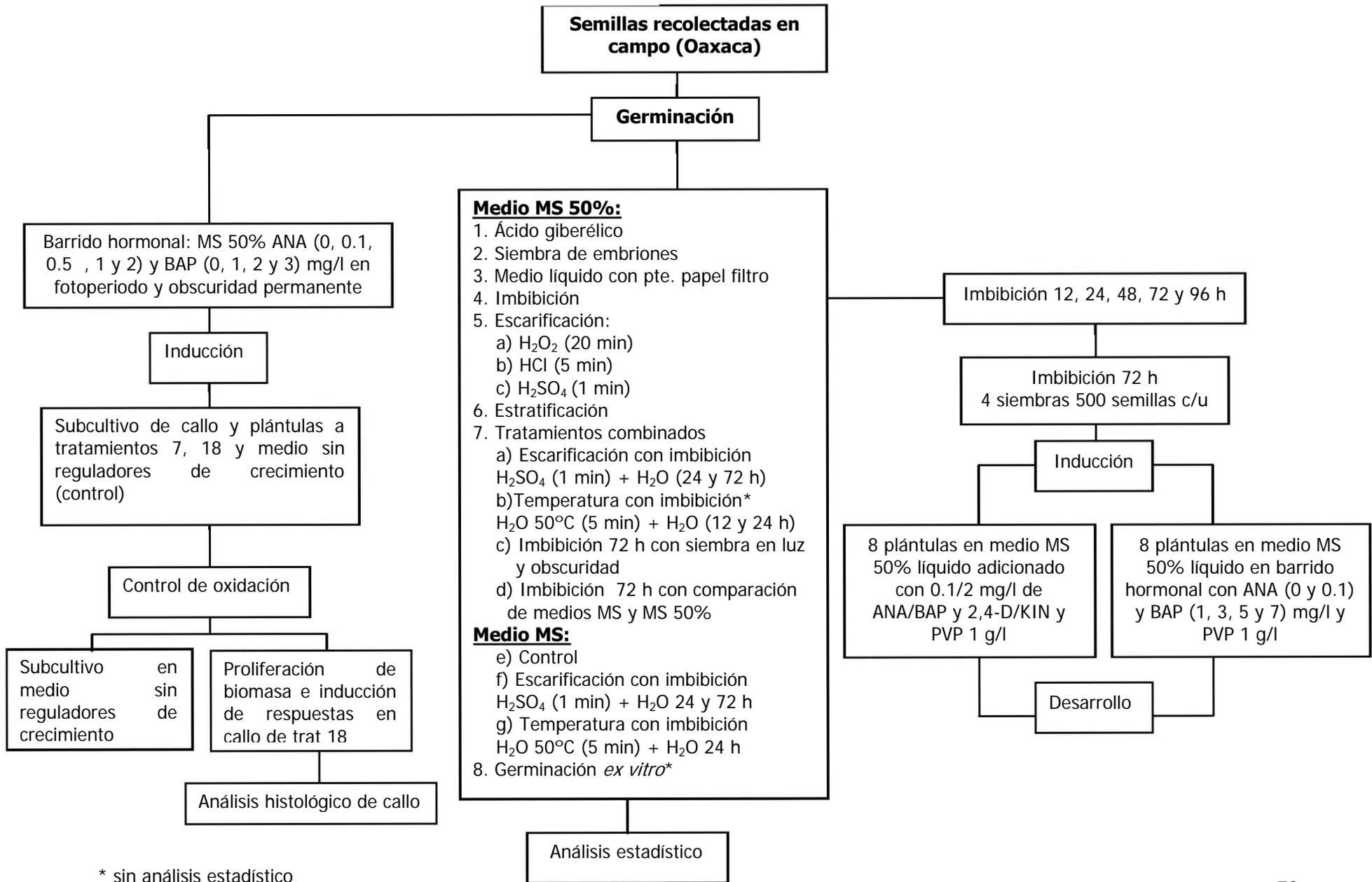
Se realizó otro análisis de varianza MANOVA, con los valores de germinación obtenidos de los tratamientos de imbibición por distintos periodos de tiempo. También se les aplicó una prueba LSD para determinar en qué tratamientos se encontraban las diferencias.

8. Prueba de germinación con semillas de vivero de Texas E.U.A.

50 semillas donadas por un vivero en Texas, E. U. A., se les aplicó la prueba de viabilidad con TTC a una muestra de 10 semillas. Se realizaron dos ensayos, poniendo a germinar una muestra de 10 semillas en el tratamiento control, y 10 más utilizando el tratamiento de imbibición por 72 h, colocándolas en condiciones de fotoperiodo dentro de la cámara de incubación.

Al haber muchos problemas de contaminación por hongos, con las 20 semillas restantes, se procedió con la misma metodología de desinfección citada anteriormente, seguida de una inmersión de las semillas en una solución de PPM al 3% por 1 h, previo a su siembra en medio MS 50% con una concentración de 1% de PPM con la aplicación de los dos tratamientos citados anteriormente.

Metodología general *Cephalocereus apicicephalum*:



* sin análisis estadístico

Echinocereus pentalophus

1. Material biológico

Se utilizó un lote de semillas de *Echinocereus pentalophus*, donado por el grupo de Biotecnología a cargo de la M. en C. J. Mabel Hernández, materia de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

2. Germinación

Las semillas se lavaron en una solución de detergente comercial durante 5 minutos en agitación constante y después se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, se agitaron en una solución de alcohol etílico industrial al 70% (v/v), durante 30 seg. Finalmente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico con 6% de cloro activo) al 30% (v/v), adicionado con 2 gotas de solución de Tween 80/100 ml, durante 30 minutos en agitación constante.

Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron en frascos de vidrio (Gerber) con 25 ml de medio MS 50% (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 30 g/l (Apéndice I), pH ajustado a 5.7 con soluciones de HCl y/o NaOH 0.1 N, previo a la adición de agar bacteriológico 8 g/l (Apéndice I). El medio fue esterilizado en autoclave a 120 °C a una presión de 1.5 kg/cm² durante 17 minutos.

3. Condiciones de incubación

Todos los cultivos fueron colocados en una cámara de incubación bajo condiciones ambientales controladas, con temperatura de 26 ± 2 °C y fotoperiodo 16 h luz con una intensidad de $29.29 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (PAR $50\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$), por 8 h de oscuridad.

4. Cultivo de secciones de plántulas

Los explantes se obtuvieron a partir de plántulas germinadas *in vitro* de 5 meses de edad, de una longitud aproximada de 0.3 cm. De cada plántula se obtuvieron dos explantes: apical y basal. La disección se llevó a cabo seccionando la plántula por la mitad. Los explantes fueron sembrados con el área de corte en contacto con el medio de inducción. Como control de oxidación, en las disecciones se ocupó una solución de ácido cítrico (100 mg/l) y ácido ascórbico (150 mg/l) previamente esterilizada.

5. Inducción

Para tratar de inducir respuestas morfogénéticas, se utilizó medio MS 50% semisólido (Phytigel 5 g/l), adicionado con PVP 1 g/l y reguladores de crecimiento ANA y BAP en un barrido de 9 tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Tratamientos de barrido hormonal A NA/BAP (mg/l), aplicados a explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *E. pentalophus*.

ANA \ BAP	0	1	3
0	1*	2	3
0.1	4	5	6
0.5	7	8	9

*** No. de tratamiento**

De acuerdo al material biológico disponible, se sembraron 2 explantes por frasco provenientes de la misma plántula, con 6 repeticiones para cada tratamiento.

Se llevaron a cabo observaciones cada dos semanas, registrando el desarrollo de los cultivos, observando la formación de callo y brotes directos y/o indirectos.

6. Desarrollo y mantenimiento de los cultivos

Después de 3 meses en el medio de inducción, los explantes se subcultivaron en medio MS 50% sin reguladores de crecimiento, gelificado con Pytagel 5 g/l.

7. Individualización

Después de 2 meses en el medio sin reguladores de crecimiento, se realizó un subcultivo en medio fresco MS 50% (Phytigel 5 g/l), individualizando los brotes mayores de 0.5 cm, y fraccionando el callo que les dio origen. Para el control de oxidación, durante la disección de los explantes se ocupó una solución de ácido cítrico (100 mg/l) y ácido ascórbico (150 mg/l) previamente esterilizada.

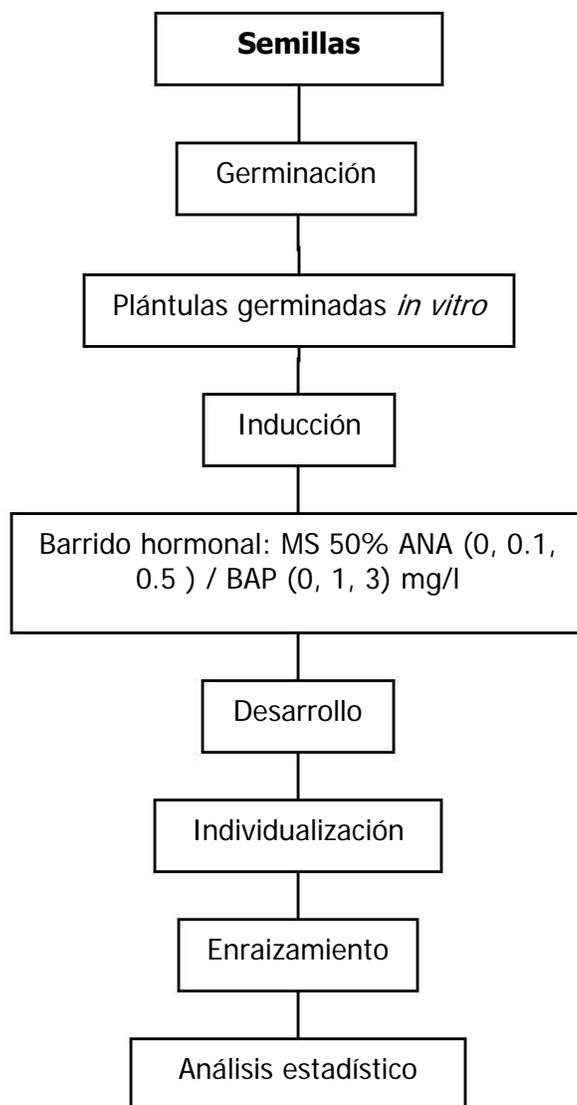
8. Enraizamiento

Se realizaron evaluaciones quincenales de los brotes individualizados, registrando el surgimiento y desarrollo de las raíces, por un periodo de un mes y medio a partir del día de la individualización de los brotes.

9. Análisis estadístico

Empleando el número de brotes obtenidos para cada tratamiento después de transcurridos 2 meses del subcultivo en medio sin reguladores de crecimiento, se aplicó una prueba de análisis de varianza de una sola vía MANOVA, utilizando el software Statistica 5.0, para verificar si existió diferencia significativa entre los 9 tratamientos. Finalmente, se realizó la prueba LSD (plano de comparación) con el fin de determinar en qué tratamientos se encontraban las diferencias.

Metodología general *Echinocereus pentalophus*:



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El paso inicial para un proceso de regeneración *in vitro* es el de obtener un cultivo aséptico del material vegetal (George y Sherrington, 1984). La superficie de las plantas contiene gran cantidad de agentes microbianos contaminantes, es por ello que resulta necesario para la obtención de un cultivo aséptico, la completa remoción de dichos contaminantes, paso que a su vez, determinará el éxito del establecimiento de los cultivos (NG y NG, 1991).

Para ambas especies, los explantes utilizados fueron semillas, debido a que éstas pueden resistir un fuerte proceso de desinfección superficial y germinar para producir plántulas libres de contaminación microbiana, las que pueden ser utilizadas como fuente de explantes (George y Sherrington, 1984). Es por esto que las semillas representan una excelente fuente de obtención de explantes asépticos, en comparación con los explantes obtenidos a partir de plantas adultas, las que en los dobleces del tejido pueden mantener agentes microbianos (Johnson y Emino, 1979a). Asimismo, se ha reportado que los tejidos jóvenes tienen una mayor capacidad regenerativa en comparación con los presentes en un individuo adulto (Vyskot y Jára, 1984).

El método de desinfección de semillas empleado en ambas especies, haciendo uso de una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial con 6% de cloro activo) al 30% (v/v), adicionado con 2 gotas/100 ml de Tween 80, durante 30 minutos en agitación constante, tuvo resultados satisfactorios en este estudio, puesto que no se presentó contaminación en ninguno de los cultivos, excepto con el segundo lote de semillas de *C. apicicephalum*, proveniente de un vivero en Texas, en donde hubo una total contaminación de los cultivos con hongos y bacterias.

Fay y Gratton (1992), mencionan la utilización de la inmersión de los explantes en una solución de NaOCl para la desinfección de explantes de especies pertenecientes a la familia Cactaceae. Mata-Rosas *et al.* (2001), utilizaron una solución de NaOCl al 30% por 30 min, para la desinfección de semillas de *Turbinicarpus laui*, con resultados exitosos. Por otra parte, Moebius-Goldammer *et al.* (2003) reportan el mismo

procedimiento de desinfección de semillas en *Ariocarpus kotschoubeyanus*, utilizando una solución de etanol (70%) por un minuto, previa a la solución de NaOCl al 30% por 30 minutos, también con resultados exitosos.

Para el segundo lote de semillas de *C. apicicephalium* donado por un vivero en Texas, este método no fue suficiente, y se tuvo que emplear un método de desinfección más fuerte para la obtención de cultivos asépticos. Debido al reducido número de semillas donado, no se pudieron realizar muchas pruebas de desinfección, por lo que se decidió utilizar PPM (Plant Preservative Mixture) tanto para la desinfección de las semillas como en el medio, obteniendo resultados exitosos.

La concentración de PPM empleada para sumergir las semillas en el tratamiento de desinfección (3%), es la recomendada en el manual anexo al producto, mientras que el tiempo de inmersión (1 h) fue distinto al recomendado (8-12 h), debido a que fue empleado después del proceso de desinfección con etanol 70%, NaOCl al 30%, y tres enjuagues en agua esterilizada. Asimismo, la concentración de PPM añadida al medio (0.1%) es la recomendada por los inventores del producto, para la germinación de semillas de plantas herbáceas (<http://www.ppm4plant-tc.com>).

La utilización de éste compuesto se encuentra reportada para la obtención de cultivos asépticos en diversas especies. Compton y Koch (2001), reportan la influencia de diversas concentraciones de PPM en la organogénesis de *Cucumis melo*, *Petunia hybrida* y *Nicotiana tabacum*. Babaoglu y Yorgancilar (2000) lo utilizaron en *Porterium sanguisorba*, encontrando que es un método efectivo para el control de contaminación. Renfroe *et al.* (1999) lo reportan en la elaboración de protocolos de especies del género *Portulaca* provenientes de laboratorio y de invernadero. Niedz y Bausher (2002), reportaron que el PPM en solución o adicionado al medio es un método efectivo para el control de la contaminación fúngica y bacteriana en cultivos *in vitro* de árboles de invernadero y silvestres. Geerts *et al.* (2000) reportan que el PPM (1 ml/l) eliminó por completo la contaminación de los cultivos de *Phaseolus vulgaris*.

Germinación de semillas de *Cephalocereus apicicephalium*:

Barrido hormonal ANA (0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg/l) /BAP (0, 1, 2 y 3 mg/l)

No hay reportes de cultivo *in vitro* de cactáceas con el uso de tratamientos con reguladores de crecimiento (ANA y BAP) desde la etapa de germinación de las semillas.

Las citocininas se reportan con poca frecuencia como uno de los métodos para romper la latencia de las semillas, en relación con la utilización de ácido giberélico (GA₃) (Bradbeer, 1988).

El porcentaje total de germinación obtenido para los tratamientos de barrido hormonal tanto en condiciones de fotoperiodo como en obscuridad permanente, fue de 9.57%. El máximo número de semillas germinadas fue de 4 semillas, para los tratamientos 14 y 20, mientras que en el tratamiento 16 no hubo germinación. Los demás tratamientos tuvieron 3, 2 ó 1 semillas germinadas por tratamiento.

La luz regula la germinación en muchas especies desérticas (Gutterman, 1993 en Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001). La germinación de semillas fotoblásticas en ecosistemas áridos se restringe a la parte superior del suelo, la cual se seca rápidamente. Por ello, los requerimientos de luz aseguran que la germinación se dará únicamente después de fuertes lluvias que humedecen el suelo por periodos más prolongados (Kigel, 1995 en Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001).

La mayoría de las semillas fotoblásticas son pequeñas (Hammouda y Bakr, 1969), como es el caso de las semillas de *C. apicicephalium*. Éstas, debido a su pequeño tamaño, se pondrían en peligro al germinar a cierta profundidad debido a sus limitados recursos alimenticios, que podrían no ser suficientes para lograr que la plántula emergiera y por lo tanto morir (Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004). Por ello, la germinación con requerimiento de luz, asegura que sólo las semillas que se encuentran cerca de la superficie del suelo germinarán (Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Ahora bien, el porcentaje de germinación de semillas de *C. apicicephalium*, obtenido para el total de los tratamientos colocados en condiciones de fotoperiodo, fue de 13.5%, mientras que el de los tratamientos colocados en obscuridad permanente fue

del 6%. Éste último, a pesar de que fue de menos de la mitad del obtenido en condiciones de fotoperiodo, nos indica, que las semillas de *C. apicicephalum*, son capaces de germinar en condiciones de oscuridad, aunque germinan mejor en luz. Por otro lado, en los resultados obtenidos a partir de la germinación en oscuridad, se observó que no hubo un desarrollo óptimo del tejido, puesto que éstos mostraron en la mayoría de los casos una coloración verde muy pálida a blanca, en comparación con lo observado en los tratamientos colocados en fotoperiodo (Figura 4).

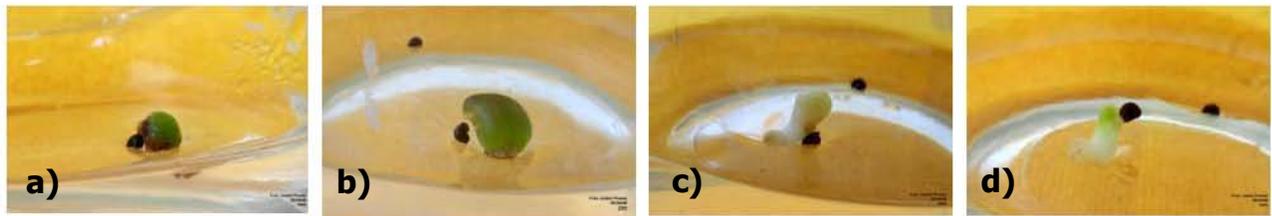


Figura 4. Comparación de morfología de las plántulas derivadas a partir de los resultados obtenidos en condiciones de fotoperiodo y oscuridad permanente, después de un mes (a y b) Plántulas obtenidas en condiciones de fotoperiodo, de color verde y sin presentar etiolación; (c y d) Plántulas obtenidas en condiciones de oscuridad constante, de color blanco con verde muy pálido y etioladas.

Dentro del grupo de las cactáceas se encuentra reportado un comportamiento diverso hacia la luz. Rojas-Aréchiga *et al.* (1997 y 1998), en un estudio de 7 especies de cactus del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, de las cuales 4 especies eran globosas y las 3 restantes columnares, encontraron que las respuestas a los distintos tipos de iluminación agrupaban a dichas especies de acuerdo a su forma de vida. Las especies con forma de vida globosa, tenían un comportamiento fotoblástico, mientras que las especies columnares presentaban un comportamiento indiferente a la luz, puesto que sus semillas germinaban también en la oscuridad. Estos resultados proponen una relación entre la forma de vida y los requerimientos lumínicos para la germinación, aunque los autores mencionan que la mayoría de las cactáceas columnares requieren de luz para germinar.

Por su parte, los estudios de Alcorn y Kurtz (1959) y de McDonough (1964) demostraron que la luz tiene un efecto estimulante en la germinación de *Carnegiea gigantea* y *Lemaireocereus thurberi*, así como también en otros estudios, *Stenocereus*

queretaroensis y *Stenocereus stellatus* exhibieron un comportamiento de fotoblastismo positivo (De la Barrera y Nobel, 2003; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001).

Ramírez-Padilla y Valverde (2005), encontraron que las semillas de *Neobuxbaumia tetezo* y *N. macrocephala* no son fotoblásticas, mientras que *N. mezcalaensis* exhibió un comportamiento fotoblástico, es decir, tuvo los porcentajes menores de germinación en condiciones de obscuridad, con la mitad del porcentaje del obtenido en condiciones de luz.

En un estudio con *Pachycereus pringlei*, se encontró que el tratamiento de obscuridad sólo redujo ligeramente el porcentaje de germinación en comparación con los obtenidos en luz blanca (Nolasco *et al.*, 1996).

Otro estudio realizado con semillas de *Stenocereus griseus*, otra especie columnar, mostró germinación en la obscuridad bajo distintos tratamientos (López y Sánchez, 1989 en Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997).

En un estudio de 8 especies de cactáceas (*Mammillaria aplanata*, *Mammillaria winteriae*, *Escobaria runyonii*, *Ancistrocactus scheri*, *Echinocereus pectinatus*, *Aztekium ritterii*, *Epitelantha micromeris* y *Echinocactus texensis*), se vio que ninguna de las especies germinaron en condiciones de obscuridad (Maiti *et al.*, 1994).

Benítez-Rodríguez *et al.*, (2004), hicieron un estudio con 4 especies del género *Mammillaria*, ellos encontraron que dichas especies eran fotoblásticas, puesto que sus semillas no germinaban en la obscuridad. Entre diversos tratamientos con luz a distintas longitudes de onda, vieron que se obtuvieron los mejores resultados con la utilización de luz blanca.

Con respecto a los resultados obtenidos a partir de la germinación de semillas de *C. apicicephalum* por el efecto del barrido hormonal ANA (auxina) / BAP (citocinina), se pudo observar que en los tratamientos sin concentración de auxinas, o con baja concentración de éstas, se presentó en un mayor número de casos el desarrollo de callo morfogénico, es decir la presencia de brotes, aréolas o estructuras parecidas a raíces, mientras que, conforme fue aumentando la concentración de auxinas, se vio favorecida la formación de mayor cantidad de callo de distintos tipos (esponjoso verde claro, esponjoso verde intenso y compacto liso verde intenso), siendo que la formación de

callo, también fue favorecida conforme la concentración de citocininas fue aumentando (Tablas 11 y 12).

Las hormonas vegetales son moduladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas. Las auxinas y citocininas son los dos tipos principales de hormonas involucradas en la morfogénesis de las plantas. Su importancia radica en que son las que promueven el desarrollo de brotes y raíces a partir de células indiferenciadas. Sin embargo, se sabe que existen complejas interacciones entre las distintas hormonas y que el crecimiento y desarrollo son el resultado del efecto neto del balance hormonal. La propagación de células vegetales en cultivo de tejidos requiere tanto de auxinas como de citocininas, y en muchos casos, la organogénesis se encuentra regulada por el balance citocinina-auxina, siendo que un balance a favor de la citocinina, induce la formación de brotes, mientras que un balance a favor de la auxina, la formación de raíces (Davies, 1995; Smigocki y Owens en Soh y Bhojwani, 1999).

Los efectos principales de las auxinas son, el alargamiento de las células y de los tallos, estimulan la división celular en combinación con citocininas, así como también inducen el surgimiento y desarrollo de raíces. Mientras que, los efectos principales de las citocininas, son la división celular en presencia de auxinas e inducen la morfogénesis mediante la formación de brotes, vía organogénesis directa o indirecta (Davies, 1995; George y Sherrington, 1984).

En el barrido hormonal empleado en la germinación de *C. apicicephalium*, el único tratamiento en el que se dio la formación de brotes, fue el 7 (0.1 ANA/ 2 BAP mg/l), aunque éstos, se encontraban muy unidos entre sí, siendo que difícilmente se podía diferenciar entre uno y otro, la vía de regeneración de estos fue organogénesis directa (Figura 5a). En el tratamiento 3 (BAP 2 mg/l) hubo morfogénesis pero muy incipiente puesto que lo único que se observó fue que las aréolas aumentaron de tamaño y la aparición de muy pocas espinas (Figura 5c).

Con respecto a la formación de callo, esta se dio en diversos tratamientos, siendo que en su mayoría se trataba de callo oxidado o muy vitrificado (Tratamientos 1, 4, 8 y 13). El tratamiento 18 (2 ANA / 1 BAP mg/l), fue el que presentó una mayor cantidad de

biomasa en forma de callo de 3 tipos: esponjoso verde claro, esponjoso verde intenso y compacto liso verde intenso, sin presentar mucha oxidación (Figura 5b).

Los tratamientos elegidos para subcultivar el material obtenido del barrido hormonal, fueron el tratamiento 7 y 18, por ser los que presentaron los mejores resultados con respecto a la formación de brotes y a la mayor cantidad de biomasa, así como también medio sin reguladores de crecimiento como tratamiento control.

Tabla 11. Porcentaje de germinación y efecto de reguladores de crecimiento (ANA/BAP) en *C. apicicephalium* en fotoperiodo, después de 4 meses de inducción en medio MS50%.

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)							
	0		1		2		3	
	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta
0	10	P	20	C y Pc	20	Ce P	10	P
0.1	10	C	10	C	20	C Pc	0	-
0.5	20	P y C	10	C	20	Pc C	10	C
1	20	P y P	30	C C C	0	-	0	-
2	0	-	20	C C	10	Cpr	30	C C C

P: plántula, C: callo, Pc: plántula con callo, Ce: callo con espinas, Cpr: callo con pelos radicales, - sin respuesta

Tabla 12. Porcentaje de germinación y efecto de los reguladores de crecimiento (ANA/BA P) en *C. apicicephalium* en obscuridad, después de 4 meses de inducción, en medio MS 50%.

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)							
	0		1		2		3	
	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta	% germ.	Respuesta
0	0	-	10	Pc	0	-	0	-
0.1	0	-	0	-	0	-	10	P
0.5	10	P	10	P	0	-	10	P
1	10	P	10	Pc	30	C C P	0	-
2	10	C	0	-	0	-	10	Pc

P: plántula, C: callo, Pc: plántula con callo, - sin respuesta



Figura 5. Tratamientos con mejor respuesta de semillas de *C. apiccephalum* germinadas en medio MS 50% adicionado con barrido hormonal ANA/ BAP en condiciones de fotoperiodo después de 4 meses de inducción (a) Tratamiento con mayor proliferación de brotes bien consolidados muy unidos entre sí (Trat. 7); (b) Tratamiento con mayor proliferación de biomasa en forma de callo esponjoso verde claro, esponjoso verde intenso y compacto liso verde intenso, sin presentar mucha oxidación (Trat. 18) y (c) Tratamiento con presencia de morfogénesis incipiente con aumento de tamaño de aréolas y formación de espinas (Trat. 3).

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), en un estudio con 21 especies de cactáceas mexicanas, encontró que los explantes de todas las especies mostraron la producción de callo con la utilización de ANA (0.01 y 0.1 mg/l) y BAP (1 y 2 mg/l). Ellos encontraron que se presentaba mayor proliferación de éste, en los tratamientos que contenían ANA, en comparación con los que tenían BAP únicamente.

Johnson y Emino (1979a), reportaron para *Mammillaria elongata*, que la proliferación de callo se vió estimulada por las tres auxinas ensayadas: 2,4-D, ANA e IBA.

Mata-Rosas *et al.* (2001) reportaron que para *Turbincarpus laui*, se consiguió la tasa más alta de proliferación con la adición de 2-3 mg/l de BAP únicamente o en combinación con concentraciones bajas de auxina. Estos resultados son parecidos a lo reportado por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis* en donde la tasa más alta de proliferación se dio con la utilización de 1-2 mg/l de BAP.

Moebius-Goldammer *et al.* (2003) reportan para *Ariocarpus kotschoubeyanus* que con un barrido hormonal con ANA (0, 0.01, 0.5 y 1 mg/l) en combinación con BAP (0, 1, 2, 3 y 5 mg/l), la formación de brotes se dio a partir de los tratamientos con la combinación de ambos reguladores de crecimiento, así como también con la acción de la citocinina sola, mientras que con la presencia de auxina solamente, no se consiguió la proliferación de brotes.

Control de oxidación

El daño sufrido por el tejido en forma de callo o de plántulas, proveniente de la germinación en barrido hormonal, al ser seccionado para subcultivarse, provocó la liberación de muchos compuestos fenólicos causando una oxidación irreversible para muchos de ellos (Figura 6a).

Los explantes frecuentemente se tornan cafés o negros poco después de haberlos sometido a cortes, cuando esto ocurre se inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere (George y Sherrington, 1984).

La oxidación se puede prevenir de diversas maneras, en el caso de los cultivos de *C. apicicephalum*, el control de la oxidación se llevó a cabo en primera instancia con un baño de los explantes en una solución de ácido cítrico (100 mg/l) y ácido ascórbico (150 mg/l) durante 30 minutos. La utilización de esta solución se debe a que, cuando los tejidos son susceptibles a oxidarse, los explantes se sumergen en un agente reductor o antioxidante (como el ácido cítrico y ascórbico). La oxidación fenólica se reduce con la disminución de la actividad de la polifenol oxidasa, enzima que tiene una actividad mayor a un pH de 6.5 y se reduce a medida que el pH baja (George y Sherrington, 1984). Sumergiendo los explantes en una mezcla de ácido ascórbico y cítrico no sólo se expone a los explantes a agentes reductores, sino que también baja el pH (Ichihashi y Kako, 1977, citado por George y Sherrington, 1984). Esto se ha reportado como un método efectivo para disminuir el ennegrecimiento de los tejidos o explantes en los cultivos, así como también a menudo se asume que previene la oxidación de los fenoles (George y Sherrington, 1984).

Posteriormente, los explantes se subcultivaron en medio MS 50% semisólido (agar 8 g/l) con macros al 25%, adicionado con carbón activado (1g/l) como medidas preventivas de oxidación.

La disminución de la concentración de macros al 25% fue porque la formación de polifenoles de los explantes recién disectados puede ser influenciada por altos niveles de potasio. Anderson (1975) (en George y Sherrington, 1984), observó que disminuyendo

los niveles de potasio (KNO_3), no se presentaba oxidación en explantes de *Rhododendron*, mientras que con los niveles normales sí se presentaba.

La adición de carbón activado es común para el control de la oxidación debido a sus propiedades de absorber compuestos inhibitorios (George y Sherrington, 1984). Añadiendo carbón activado al medio, en algunas ocasiones es posible evitar la formación de inhibidores fenólicos, previniendo el ennegrecimiento de los cultivos (Lilien-Kipnis, 1974, Reynolds y Murashige, 1979 citados por George y Sherrington, 1984). También se utilizó la solución antioxidante (ácido cítrico 100 mg/l y ácido ascórbico 150 mg/l) como medio para la disección de los explantes al momento de remover las partes dañadas por la oxidación. La disección en medio acuoso, se realiza a fin de disminuir la disponibilidad de oxígeno y por ello modificar el potencial redox (George y Sherrington, 1984).

También se utilizó la obscuridad parcial haciendo uso de hojas de papel encima de los cultivos dentro de la cámara de incubación por un periodo de 2 semanas. La obscuridad o la disminución en la intensidad de luz es una manera de disminuir la oxidación de los explantes debido a que la actividad de las enzimas involucradas con la biosíntesis y oxidación de fenoles, se incrementa con la luz. El ennegrecimiento de los tejidos puede reducirse o prevenirse si los frascos con los explantes recién disectados se colocan en obscuridad durante un periodo aproximado de 14 días antes de ser colocados en condiciones lumínicas de (500-1000 lux), (George y Sherrington, 1984).

Estas medidas para prevenir la oxidación en los cultivos de *C. apicicephalum* no tuvieron el éxito deseado (Figura 6b). Por ello se utilizó en los explantes sobrevivientes medio líquido MS 50% con puentes de papel filtro, adicionado con polivinilpirrolidona (PVP) (1 g/l), y colocando a los cultivos dentro de la cámara de incubación con papel por encima por un periodo de dos semanas, como nuevas medidas para reducir la oxidación.

El medio líquido en los cultivos se utiliza debido a que los explantes en algunas ocasiones se dañan menos por la oxidación si se cultivan inicialmente en este tipo de medio, en el cual los compuestos fenólicos se pueden difundir fuera de la planta (George y Sherrington, 1984).

El PVP se encuentra reportado como una poliamida que reacciona con los fenoles, restableciendo de esta manera la actividad enzimática del tejido. Los fenoles son absorbidos por el PVP a través de enlaces de hidrógeno, previniendo su oxidación (George y Sherrington, 1984). La adición al medio de PVP no es infalible para detener el ennegrecimiento de los cultivos, pero se ha utilizado con éxito en diversas plantas tales como, *Malus* spp y *Hamamelis* con la adición de 0.5-2% y 1-2% de PVP respectivamente, al medio de cultivo (Walkey, 1972 y Christiansen y Fønnesbech, 1975, citados por George y Sherrington, 1984).

Este último intento por controlar la oxidación tuvo mucho éxito, puesto que la oxidación no se presentó en la mayoría de los cultivos o de presentarse, lo hizo de manera no letal para los mismos. Se observó que los fenoles fueron absorbidos por el papel filtro puesto que se dibujaba una sombra café por debajo de algunos de los explantes en el área de corte (Figura 6c).

En los reportes de micropropagación de cactáceas no es común encontrar problemas de oxidación. Flores (2004), hace mención a problemas de oxidación que causaron la muerte de muchos cultivos de *Pelecypora strobiliformis*, pero el problema se resolvió prácticamente colocando a los cultivos en condiciones de obscuridad dentro de la cámara de incubación por espacio de dos o tres semanas, para después pasarlos a condiciones lumínicas normales. Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) en un estudio de 21 especies de cactáceas mexicanas, reportan que algunas de ellas mostraron problemas de oxidación, y que ésta fue parcialmente controlada con la adición de PVP al medio de cultivo (no mencionan la concentración).



Figura 6. Comparación de los resultados obtenidos en los distintos métodos para control de oxidación en cultivos de *C. apícephalum*. (a) Subcultivo en medio MS 50% con presencia de oxidación letal de la mayoría de los explantes (b) Subcultivo con baño en solución antioxidante, medio MS 50% con macros al 25% y carbón activado 1 g/l: persistencia de oxidación letal para la mayoría de los explantes (c) Subcultivo en medio MS 50% líquido con puente de papel filtro y PVP 1 g/l: éxito para control de oxidación de los explantes sobrevivientes a los dos subcultivos anteriores.

Callo

El callo se define como un conjunto de células vegetales desorganizadas o tejido amorfo y desorganizado, formado a partir de una división activa de células. Dicha proliferación da lugar a la formación de un tejido irregular de distintas características, variando en su textura, apariencia y tasa de crecimiento, dependiendo del tejido que le dio origen, así como también la composición del medio de cultivo. Esto es causado por el estímulo de reguladores de crecimiento tanto endógenos, como exógenos, que cambian el metabolismo celular de quiescente a metabólicamente activo (Donnelly y Vidaver, 1988; George y Sherrington, 1984).

El callo obtenido a partir del tratamiento 18 (2 ANA / 1 BAP mg/l), se subcultivó en distintos medios para tratar de inducir respuestas morfogenéticas. Desafortunadamente, los ensayos no fueron exitosos, puesto que no se obtuvo la formación de brotes, aréolas o raíces (Figura 7 a, b, c y d).

El ensayo con la utilización de medio líquido adicionado con hormonas (ANA 0.1 mg/l / BAP 2 mg/l) en agitación constante, tratamiento en el que se obtuvo desarrollo de brotes, el callo se tornó rojizo y se disgregó un poco, pero no continuó su desarrollo. Éste, al subcultivarlo a medio semisólido sin reguladores de crecimiento se oxidó y murió sin presentar la aparición de respuestas morfogenéticas (Figura 7b).

El ensayo con ANA (2 mg/l) / BAP (1 mg/l) en medio líquido en agitación constante, la consistencia del callo cambió de friable a compacta, su coloración cambió a rojo intenso y cesó su desarrollo. Con el subcultivo a medio sin reguladores, se oxidó y murió (Figura 7c).

En el ensayo del subcultivo en medio MS 50% semisólido sin reguladores de crecimiento, el callo siguió siendo de consistencia friable, y su coloración cambió a tonalidades rojo-rosa (Figura 7d), para finalmente tornarse negro a causa de la oxidación y morir sin ninguna respuesta morfogénica aparente.

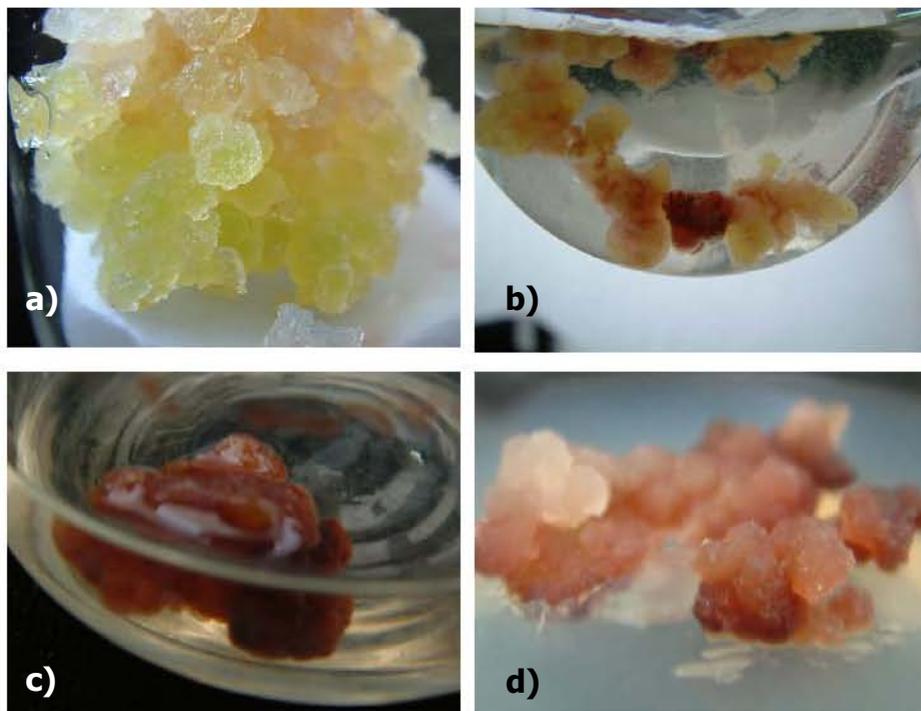


Figura 7. Respuestas obtenidas a partir de los distintos sub cultivos del callo del tratamiento 18. (a) Medio líquido con puente de papel filtro, 0.1 ANA/2 BA P mg/l y PVP 1 g/l: proliferación de gran cantidad de biomasa en forma de callo friable de color amarillo con tintes verdes y naranjas; (b) Medio líquido con 0.1 ANA/2 BAP 2 mg/l y PVP 2 mg/l en agitación constante: el callo se tornó rojizo, se disgregó un poco y cesó su proliferación; (c) Medio líquido con 2 ANA / 1 BAP mg/l y PVP 1 g/l en agitación constante: el callo se tornó compacto y de tonalidad rojo intenso; (d) Medio semisólido (phytagel 5 g/l) y PVP 1 g/l: callo de consistencia friable de coloración rojo-rosa.

La aparición de pigmentos de tonalidades rojas en cultivos de callo en suspensión, se encuentra reportada por Bonnes *et al.* (1993) en *Cephalocereus senillis*, en donde se realizaron ensayos de cultivos de callo en suspensión de la misma apariencia y consistencia del callo de *C. apicicephalum*. En este estudio se observó que el callo de esta especie proliferaba muy bien en medio líquido y que al paso de 10 días era necesario realizar los subcultivos por el exceso de biomasa. Estos autores reportan la aparición de un pigmento rojo como una respuesta a la contaminación fúngica. Este mismo pigmento, fue estudiado por Paré *et al.* (1991 y 1992), elicitando los cultivos de callo de la misma especie, con quitina, un polisacárido presente en las paredes celulares fúngicas. Ellos llegaron a la conclusión de que se trataba de una aurona fitoalexina (cephalocerona), con propiedades antibacteriales. En nuestro estudio, la aparición de los pigmentos se obtuvo por el estrés del tejido al cambiar de un medio de proliferación a otro, sin necesidad de la acción de un agente contaminante. Así mismo, la aparición de pigmentos rojizos en cultivos de callo de cactáceas, ha sido reportada por diversos autores (Kolar *et al.*, 1976 y Steinhart, 1962, en Bonnes *et al.*, 1993). Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), en un estudio con 21 especies de cactáceas, hace alusión de que la incidencia de pigmentos rojizos en los cultivos de callo de diversas especies, se debe a la presencia de betalaínas, pigmento característico de la familia.

El callo obtenido a partir del ensayo en medio líquido con puente de papel, adicionado con ANA (2 mg/l) / BAP (1 mg/l) (tratamiento 18), fue el único que siguió proliferando gran cantidad de biomasa en forma de callo friable color amarillo-blanco pálido, sin presentar mucha oxidación, pero sin respuestas morfogénicas aparentes (Figura 7a). El callo proveniente de este ensayo se siguió subcultivando cada 2 meses por un periodo de un año, para la generación de biomasa. Mangolin *et al.* (1997), mencionan que es apropiado promover la multiplicación de callo friable para conseguir una mayor cantidad de tejido y de esta manera tener bastante material para inducir respuestas morfogénicas. Desafortunadamente, los ensayos realizados en este estudio para inducir respuestas morfogénicas, no tuvieron éxito en la inducción de respuestas morfogénicas.

Posteriormente, el callo se dejó por un periodo de 6 meses sin subcultivo, para tratar de inducir respuestas a causa del estrés hídrico. Con este ensayo el callo se tornó de consistencia un poco compacta, y su color comenzó a cambiar a verde pálido, y se observaron indicios de formación de brotes en estado muy incipiente y/o embriones somáticos, puesto que el callo se tornó de apariencia nodular, con fragmentos esféricos más consolidadas en comparación con el tejido de callo circundante, pero sin la presencia de espinas, aréolas o raíces. Con esto, el desarrollo cesó por completo, pero no se presentó la muerte del tejido, aún con el medio de cultivo totalmente deshidratado por un periodo de 2 meses.

Bonnes *et al.* (1993), mencionan este fenómeno como "longevidad", refiriéndose a la habilidad de los cultivos de permanecer viables sin ser subcultivados por largos periodos de tiempo, sin presentar un cambio significativo en su apariencia. Dichos autores también mencionan que esto puede ser debido a la habilidad de los cactus para sobrevivir por largos periodos de tiempo sin agua y nutrientes, la cual es posible que se presente aún en pequeñas cantidades de tejido, o quizás a nivel celular.

Análisis histológico

El análisis anatómico se realizó con el objetivo de determinar si tuvo lugar algún tipo de respuesta morfogenética, en el callo proveniente del tratamiento 18 (2 mg/l ANA + 1 mg/l BAP) en medio MS 50% líquido en puente de papel filtro, después un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses de estrés hídrico, sin subcultivo.

Se observó su organización, definiéndose como grupos de células de organización y forma irregular, de paredes delgadas y con la presencia de contenidos celulares escasos de tipo granuloso, no determinados; no se observó la presencia de vacuolas. Los núcleos de las células son poco evidentes. Poljuha *et al.*, (2003), reportó resultados similares sobre la organización celular de callo en *Mammillaria gracilis* obtenido a partir

del cultivo de brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento, callo formado por células de forma irregular de paredes delgadas con pocos contenidos celulares.

No se identificaron zonas de diferenciación celular o centros meristemáticos; sin embargo, se observó la presencia de un gran número de células especializadas, elementos traqueales con engrosamientos helicoidales, dentro del tejido calloso (Figuras 8a y 9d). Los elementos traqueales están conformados por dos tipos de células: las traqueadas y elementos de vaso, las que se encargan de la conducción en el xilema. Estas células tienen su inicio como células parenquimáticas derivadas tanto del procambium o del cambium vascular (Mauseth, 1998). La aparición de este tipo de células, puede ser una evidencia de un proceso de diferenciación durante el cultivo, pese a no identificar zonas meristemáticas en esta etapa del cultivo. Otra probable evidencia, apoyando el proceso de diferenciación es la escasa presencia de contenidos celulares, por ejemplo compuestos de reserva como lípidos, grasas o proteínas, los cuales pudieron ser utilizados como fuente de energía para el proceso de división celular y diferenciación de los elementos de conducción, proceso que requiere de un gran aporte energético (Flona, 1991). Asimismo, un subsiguiente desarrollo de órganos y tejidos, son procesos que también demandan altos requerimientos de energía (De Robertis *et al*, 1996).

Se observó la formación de estratos celulares en donde las células presentan forma y tamaño más regular que las localizadas en el centro del callo (Figura 8d).

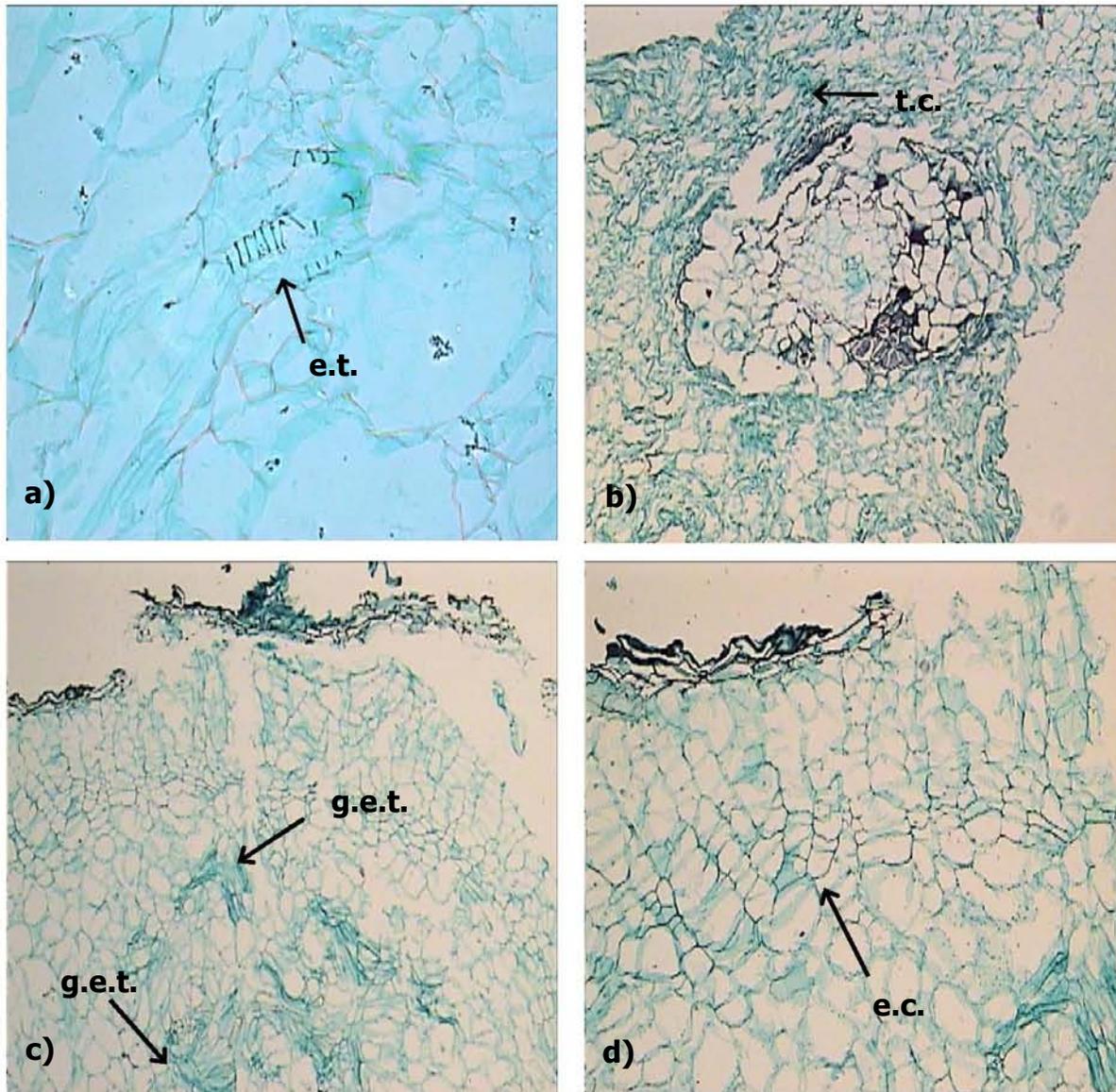


Figura 8. Secciones de callo de *C. apici cephalium* proveniente del tratamiento 18 subcultivado en medio líquido MS 50% en puente de papel, adicionado con ANA (2mg/l)/BAP (1mg/l), después un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses de estrés hídrico, sin subcultivo. (a) Elemento traqueal con engrosamientos helicoidales (flecha: e.t.), X100, c.f.; (b) Tejido colapsado (flecha: t.c.) localizado en la periferia del callo, X25, c.c.; (c) Grupos de elementos traqueales (flecha: g.e.t.), X400, c.c.; (d) Inicio de la estratificación celular (flecha: e.c.) en la periferia del callo, X50, c.c.

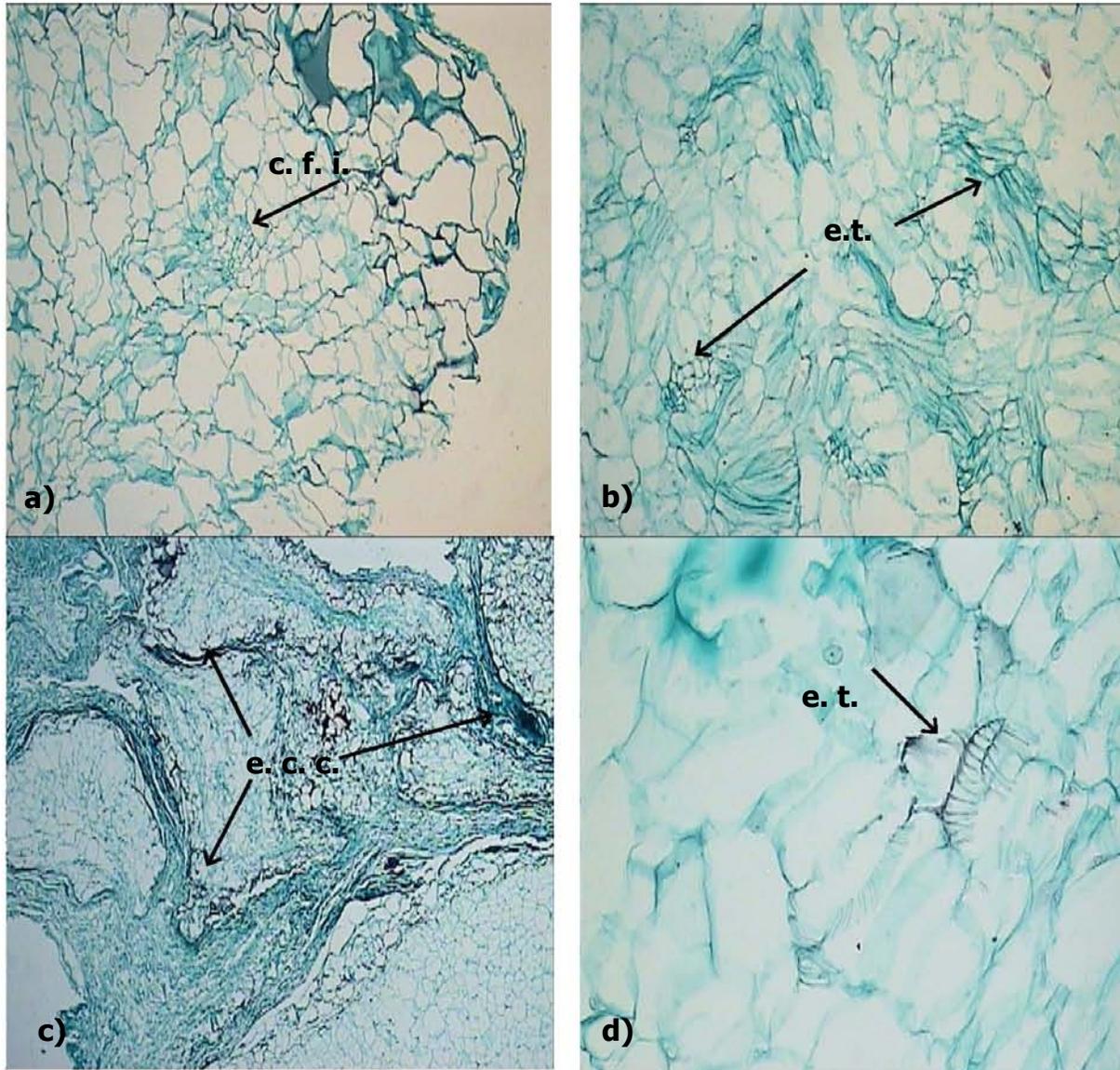


Figura 9. Secciones de callo de *C. apici cephalium* proveniente del tratamiento 18 subcultivado en medio líquido MS 50% en puente de papel, adicionado con ANA (2mg/l)/BAP (1mg/l), después un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses de estrés hídrico, sin subcultivo. (a) Vista panorámica, organización de callo, células de forma irregular (fecha: c.f.i.), X25, c.c.; (b) Acercamiento de grupo de elementos traqueales (fecha: g.e.t.), X100, c.c.; (c) Vista panorámica con estratos de células colapsadas (flecha: e. c. c.) X25, c.c. ; y (d) Células de callo y elemento traqueal (flecha: e.t.), X400, c.c.

Asimismo, se presentan zonas en la periferia del callo, en donde se observan hileras de células colapsadas, pudiéndose deber al estrés hídrico que se presentó durante su cultivo *in vitro* (Figura 8b y 9c). Con base a los resultados se concluyó que éste cultivo de callo de *Cephalocereus apicicephalium*, tuvo un potencial regenerativo limitado aún con la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Esta respuesta estuvo dirigida hacia la organogénesis indirecta al encontrar elementos de conducción dentro del tejido calloso, las cuales son elementos importantes en la formación de tallo (Dickison, 2000).

En términos generales, la familia de las cactáceas se caracteriza por presentar un crecimiento y desarrollo lento al tener bajas tasas metabólicas y ciclos de vida relativamente largos (Becerra, 2000), esto posiblemente pueda estar relacionado con la lenta diferenciación de los tejidos de *Cephalocereus apicicephalium* durante su cultivo *in vitro*.

Tratamientos de germinación

Muchas semillas a pesar de encontrarse en condiciones favorables para su germinación, como pueden ser adecuados suministro de agua y temperatura, así como también una composición normal de la atmósfera, no germinan. Dichas semillas se encuentran en estado de latencia, debido a que son viables y a que es posible inducir su germinación con la utilización de diversos tratamientos (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

La latencia puede deberse a varias causas: debido a una inmadurez del embrión, impermeabilidad de la cubierta de la semilla al agua y a los gases, impedimento del desarrollo del embrión debido a causas mecánicas, requerimientos especiales de temperatura o luz o presencia de sustancias inhibitoras de la germinación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982). Ésta es importante para la sobrevivencia de la especie, puesto que impide la germinación cuando las condiciones no son adecuadas, así como también para el establecimiento de las plántulas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). La latencia puede romperse como resultado de la exposición de la semilla a un solo factor en la intensidad requerida por un periodo de tiempo apropiado (Bradbeer, 1988).

Dependiendo del tipo de latencia, las semillas pueden germinar inmediatamente o puede haber un retraso del proceso, por meses o incluso por años (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004).

C. apicicephalum, mostró tasas muy bajas de germinación con la utilización de diversos tratamientos *in vitro* (Tabla 13), y no se obtuvo la germinación con la utilización del método convencional empleado para semillas de cactáceas (Reyes, 1994). Esto se encuentra confirmado por Fay y Gratton (1992), quienes dicen que el porcentaje de germinación por lo regular es mayor utilizando técnicas *in vitro* en comparación con los métodos convencionales.

Tabla 13. Resultados de germinación *in vitro* de semillas de *C. apicicephalum* en distintos tratamientos de inducción, después de 7 semanas de cultivo.

Medio de cultivo	Tratamiento	No. semillas germinadas	% germinación	No. de plántulas	
MS 50%	Ácido giberélico 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/l	2/25	8	1	
	Siembra de embriones	0/25	0	-	
	Medio líquido c/ pte papel	0/25	0	-	
	Imbibición	H ₂ O 12 h	3/25	12	0
		H ₂ O 24 h	4/25	16	0
		H ₂ O 48 h	3/25	12	0
		H ₂ O 72 h	8/25	32	1
		H ₂ O 96 h	4/25	16	0
	Escarificación	H ₂ O ₂ (20 min)	0/25	0	-
		HCl (5 min)	0/25	0	-
		H ₂ SO ₄ (1 min)	4/25	16	1
	Estratificación	Frío 4 °C (1 mes)	0/25	0	-
	Combinados	H ₂ SO ₄ (1 min) + H ₂ O 24 h	1/25	4	0
		H ₂ SO ₄ (1 min) + H ₂ O 72 h	2/25	8	1
		H ₂ O 50 °C + H ₂ O 12 h	1/25	4	0
		H ₂ O 50 °C + H ₂ O 24 h	0/25	0	-
		H ₂ O 72 h; luz	1/25	4	0
H ₂ O 72 h; obscuridad		0/25	0	-	
H ₂ O 72 h		0/25	0	-	
H ₂ O 72 h		2/25	8	1	
Control		0/25	0	-	
MS	H ₂ SO ₄ (1 min) + H ₂ O 24 h	1/25	4	0	
	H ₂ SO ₄ (1 min) + H ₂ O 72 h	0/25	0	-	
	H ₂ O 50 °C + H ₂ O 24 h	0/25	0	-	
	Germinación <i>ex vitro</i>	0/25	0	-	

***Todos los tratamientos fueron mantenidos en fo toperiodo menos aquel en el que se especifican condiciones de obscuridad.**

El total de semillas utilizadas en los tratamientos de germinación, fue de 700, de las cuales sólo germinaron 36, es decir, 5.1% del total de las semillas utilizadas (Tabla 13). Las primeras 2 semillas en germinar lo hicieron a la primera semana y las últimas en la octava. En los 36 casos emergió el ápice de la radícula, sin embargo, sólo 5 de ellos tuvieron como resultado el desarrollo de una plántula bien diferenciada (Tabla 13), mientras que en los casos restantes su posterior desarrollo fue inhibido y las plántulas no se diferenciaron en sus distintas estructuras, teniendo como resultado la formación de callo nodular oxidado y callo compacto verde o café claro con medidas que no

sobrepasaron 0.5 cm de longitud, mientras que las medidas de las plántulas después de 2 meses y medio de crecimiento fue de 0.7 cm de longitud.

En los tratamientos en donde germinó más de una semilla, la tasa de germinación fue gradual, siendo que el tratamiento más efectivo fue el de imbibición de 72 h en medio MS 50%, con un porcentaje de germinación del 32%. Sin embargo, a pesar de que en tratamientos posteriores se intentó combinar los dos tratamientos iniciales con más alto porcentaje de germinación (H₂O 24 y 72 h y H₂SO₄), así como también con distintos medios, condiciones lumínicas y temperatura de imbibición, los resultados no fueron exitosos.

Las semillas de *C. apicicephalum* que se germinaron en el laboratorio, tienen 2 años de haberse colectado. Se ha reportado para algunas especies de cactáceas, que las tasas de germinación se incrementan con la edad (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Mandujano *et al.* (1997) hallaron que la germinación de *Opuntia rastrera* incrementaba con la edad de las semillas, implicando la presencia de latencia primaria. Potter *et al.* (1984), encontraron que semillas de *Opuntia lindheimeri* y *Opuntia* spp. almacenadas por un tiempo mostraban porcentajes de germinación superiores al de las semillas recién colectadas, lo que significa que necesitan un periodo de latencia que les permita permanecer en el suelo por algún tiempo. Rojas-Aréchiga *et al.* (2001), observaron que las semillas tanto de poblaciones silvestres como cultivadas de *Stenocereus stellatus*, incrementaban sus porcentajes de germinación en un 15% con 41 meses de almacenamiento, en comparación con las que se habían almacenado sólo por 6 meses.

De la Barrera y Nobel (2003), encontraron un porcentaje máximo de germinación de 85% para semillas de *Stenocereus queretaroensis* con una edad entre 11 y 28 meses de edad, mientras que semillas almacenadas por un periodo de 40 meses disminuían su porcentaje de germinación en un 20%.

La germinación de las semillas de *Eulychnea castanea* y *Neoporteria subgibbosa*, permanece en su máximo durante 4 años de almacenamiento, y durante 7 años para *O. celsianus* (Zimmer y Schultz, 1975 en De la Barrera y Nobel, 2003). Asimismo, se ha reportado que semillas de *Ferocactus hystrix*, mantienen altos niveles de viabilidad

después de 2 años de almacenamiento, mientras que semillas de *Melocactus* la mantienen por 5 años o más, semillas de *Matucana* por 4 a 5 años y en *Parodia* las semillas permanecen viables por aproximadamente 9 años (Del Castillo, 1986 en Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

La longevidad de las semillas bajo condiciones de almacenamiento tanto naturales como controladas depende de muchos factores que incluyen el tipo de semilla, estado de madurez, viabilidad y contenido de humedad durante el almacenamiento, temperatura, grado de infección por bacterias u hongos, entre otros (Roberts, 1972). Las condiciones óptimas para el almacenamiento a largo plazo se desconocen para la mayoría de las especies de cactáceas (Alcorn y Martin, 1974 en Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). La reducción eventual de la germinación puede darse como resultado del deterioro de las semillas o por el comienzo de una latencia secundaria (Baskin y Baskin, 1998).

Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000), mencionan que es necesario un estudio extensivo de aspectos tales como la recolección de semillas, manejo y almacenamiento de manera que se puedan desarrollar técnicas exitosas de manejo de semillas y conservación *ex situ*.

En este caso, no se ha podido determinar si el hecho de la baja germinación sea debido a una adaptación de la especie para asegurar su sobrevivencia, es decir, que se deba a algún tipo de latencia.

La germinación gradual en las cactáceas parece ser una estrategia adaptativa a condiciones cambiantes del medio, así los estudios *in vitro* revelan que las más altas frecuencias de germinación se encuentran entre las primeras 3 semanas *A. kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); *Mediocactus coccineus* (Infante, 1992); *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2003); *A. retusus* (Olguín, 1994). En el caso de *C. apicicephalum* para la germinación se requirieron de 1 a 8 semanas, lo que probablemente indique un rasgo característico en el comportamiento de la especie. Estos datos no se pueden contrastar con los resultados obtenidos de germinación en condiciones *ex vitro*, puesto que no germinó ninguna semilla (Tabla 13).

Ácido giberélico adicionado al medio (0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/l)

De los tratamientos de inducción con ácido giberélico (GA₃), sólo se obtuvieron 2 plántulas. Una con 0.5 mg/l, que germinó a las 3 semanas y la otra con 1 mg/l, que germinó a las 4 semanas (Tabla 13).

Algunos de los efectos del ácido giberélico son la inducción de la germinación en semillas que normalmente requieren de un periodo de estratificación (frío) o luz para germinar. También tienen un efecto en la producción de enzimas, como la α -amilasa, durante el proceso de la germinación (Davies, 1995).

La aplicación exógena de ácido giberélico ha mostrado en repetidas ocasiones el aceleramiento del desarrollo del embrión y el rompimiento de la latencia tanto morfológica como fisiológica en una gran variedad de especies (Dehgan y Pérez, 2005). Algunos de estos estudios hacen alusión a la adición de este compuesto en semillas de cactáceas, tal es el caso de *Carnegiea gigantea* para la cual hubo un incremento en la germinación de sus semillas después de ser embebidas en soluciones de 500 a 1000 ppm de GA₃, en condiciones tanto de luz como de obscuridad (Alcorn y Kurtz, 1959). También se demostró que la adición de 500-1000 ppm en fotoperiodo de 8 h, promovía un aumento en las tasas de germinación de *Carnegiea gigantea* y *Lemaireocereus thurberi*, (McDonough, 1964). Krulik (1981) encontró que sumergiendo semillas de *Cereus* sp. por un periodo de 30 min en una solución de 100 a 200 ppm de GA₃, promovía su germinación. De la Rosa-Ibarra y García (1994), encontraron para *Astrophytum capricorne*, que su germinación incrementó de 46% a 88% con la adición de 0.1 mg/l de GA₃. Asimismo, Deno (1994) observó que *Echinocereus viridiflorus*, *Ferocactus acanthodes* y *F. wislizeni*, son especies que tienen un requerimiento absoluto de GA₃ para germinar. En *Opuntia ficus indica* y *O. amyclaea*, los porcentajes de germinación máximos obtenidos fueron de 50, 58 y 86%, con la aplicación de tratamientos con GA₃ (100 mg/l), durante 24 y 48 min (Muratalla *et al.*, 1990, citado por Sánchez, 1997).

Sánchez (1997), reportó la adición de distintas concentraciones de GA₃ para inducir la germinación de semillas de *Opuntia joconostle*. El porcentaje mayor (80%) se

obtuvo con 40 ppm de GA₃ e imbibición por 30 min, siendo que los porcentajes de germinación más bajos (35%) se presentaron con 20 y 60 ppm de GA₃, a excepción del tratamiento de 20 ppm de GA₃ y 60 min de imbibición con 40% de germinación. Mencionan que en todos los tratamientos ensayados el porcentaje de germinación fue menor con imbibición por 60 min.

Por otra parte existen reportes de experimentos ilustrando que la reducción del grosor de la testa por escarificación seguida por un tratamiento con GA₃, aumenta la germinación. Tal es el caso de los experimentos realizados por De la Rosa-Ibarra y García (1994), en donde se observó un aumento en la tasa de germinación de *Echinocactus grusonii* y *Leuchtenbergia principis* con 0.1 ppm de GA₃ después de escarificar las semillas con ácido sulfúrico (H₂SO₄). Para *Sclerocactus mariposensis*, el porcentaje máximo de germinación se obtuvo cuando las semillas se escarificaron con ácido seguido de un tratamiento de 0.5 ppm de ácido giberélico (Moreno *et al.*, 1991). Dehgan y Pérez (2005) encontraron que las semillas de *Harrisia fragrans* germinaban antes y en mayor número, cuando eran tratadas con 500-1000 ppm de GA₃ en comparación con las semillas sólo tratadas con H₂SO₄.

Más aún, se ha demostrado que la adición de GA₃ puede promover la germinación en oscuridad de semillas fotoblásticas. Sin embargo, la adición de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ppm de GA₃ a semillas de *Stenocereus stellatus*, no promovió la germinación en oscuridad después de 40 días de observación (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001).

Siembra de embriones

Sánchez (1997), encontraron que, al germinar semillas de *Opuntia joconostle*, el mejor tratamiento es el que considera escarificación física, es decir, ruptura parcial de la cubierta de la semilla y adicionalmente imbibición con ácido giberélico. En el caso del tratamiento de siembra de embriones de *C. apicicephalum*, se removió totalmente la testa de la semillas para así retirar cualquier impedimento mecánico de ésta. Los

resultados fueron negativos puesto que ninguna de las semillas germinó (Tabla 13), posiblemente por algún daño ocasionado al embrión y por la ausencia de un promotor adicional como el GA₃.

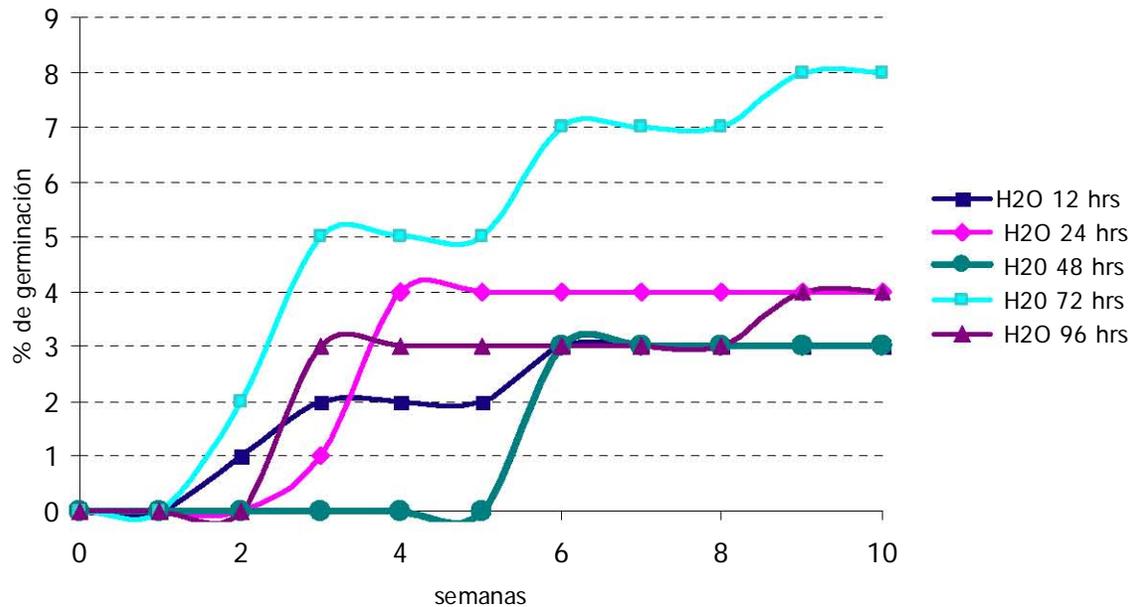
Medio líquido MS 50% líquido con puente de papel filtro

El primer proceso que ocurre durante la germinación es la absorción de agua, para que ésta se lleve a cabo intervienen tres factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de la cubierta de la semilla y la disponibilidad de agua en estado líquido o gaseoso en el ambiente. En el cultivo *in vitro*, la composición del medio de germinación es la que establece la imbibición de las semillas, puesto que determina la disponibilidad de agua (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982). En nuestro estudio, se realizó un ensayo utilizando medio líquido MS 50% con puente de papel filtro, de modo que la disponibilidad de agua fuera mayor y de esta manera favorecer la imbibición de las semillas y lograr su germinación, pero los resultados fueron negativos, con un porcentaje de 0% de semillas germinadas (Tabla 13).

La utilización de medio líquido se encuentra reportada para *Pelecypora strobiliformis* en donde se obtuvo un porcentaje de germinación de 89.23% en un periodo de 7-14 días (Flores, 2004) y para *P. aselliformis* con la utilización de puentes de papel filtro en cajas Petri adicionando agua destilada y esterilizada, obteniendo un porcentaje de germinación del 46% (Giusti *et al.*, 2002).

Imbibición

Se utilizaron 5 tiempos distintos de imbibición (12, 24, 48, 72 y 96 h) cuyos resultados fueron los más satisfactorios en relación con los otros tratamientos ensayados para lograr la germinación. El porcentaje de germinación obtenido fue de 12, 16, 12, 32 y 16% respectivamente (Tabla 13 y Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de germinación de *C. apiccephalum* en tratamientos de imbibición en medio MS 50%

La presencia de inhibidores solubles presentes en la testa o en la pulpa del fruto, al parecer controlan la germinación manteniendo a las semillas en estado de latencia hasta que se encuentren en condiciones ambientales óptimas para su crecimiento. Los patrones de precipitación pluvial pueden afectar la germinación de algunas especies de cactáceas, como en el caso de las semillas de *Melocactus curvispinus* sp. *caesius*, las cuales germinan inmediatamente después de un breve enjuague, mientras que las semillas de *Stenocereus griseus* necesitan una inmersión prolongada en agua. Esto sugiere que pueden ser necesarios periodos de imbibición de distinta duración para desencadenar los procesos necesarios para que se de la germinación (Williams y Arias, 1978; Arias y Lemus, 1984 en Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

La utilización de diferentes tiempos de imbibición se encuentra apoyada por diversos autores como tratamiento para germinar semillas de cactáceas. Potter *et al.* (1984), demostraron que varias especies del género *Opuntia* requieren distintos periodos de imbibición para promover su germinación. Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet (1998), encontraron que la imbibición de semillas en agua corriente por distintos periodos de tiempo (12, 24 y 48 h), no incrementó la germinación en comparación con

el tratamiento control. Asimismo, los porcentajes de germinación de *Neobuxbaumia tetetzo* y *Myrtillocactus geometrizans* disminuyeron significativamente, cuando sus semillas se colocaron en tratamientos de imbibición por 48 y 24 h respectivamente. Por otra parte, en algunas especies de cactáceas del desierto de Sonora, varía mucho el tiempo de imbibición requerido para que las semillas comiencen a germinar, por ejemplo *Pachycereus pringlei*, necesita 24 h de imbibición (Dubrovsky, 1996).

La cantidad de agua óptima para la germinación puede ser diferente para distintas especies. De acuerdo a dos estudios realizados por Dubrovsky (1996 y 1998), el agua en cantidades sin límite es más favorable para la germinación que las condiciones de disminución gradual de la humedad para *Stenocereus thurberi* y *Pachycereus pecten-aboriginum*, así como también para *S. gummosus* y *Ferocactus peninsulæ*. Sin embargo, se encontraron porcentajes de germinación significativamente mayores para los tratamientos de hidratación discontinua.

La hidratación discontinua se da como resultado de los patrones de precipitación, en donde las semillas son expuestas a periodos de hidratación seguidos por otros de sequía o deshidratación, por ello para sobrevivir en el desierto, deben de estar adaptadas a estos ciclos (Dubrovsky, 1996). Esta adaptación se da gracias a que, probablemente las semillas de cactus poseen lo que se le llama "memoria de hidratación", es decir, el fenómeno de la habilidad de las semillas de retener durante los periodos de deshidratación, los cambios inducidos como resultado de la hidratación de las semillas, lo que les permite resistir periodos de sequía y germinar rápidamente después de la rehidratación (Dubrovsky, 1996, 1998). Ésto se ha encontrado como una estrategia adaptativa a las condiciones desérticas, puesto que las hace tolerantes a las sequías después de que han sido hidratadas.

Diversos estudios han demostrado que la hidratación discontinua tiene un efecto promotor de la germinación, en especies como *Carnegiea gigantea* (McDonough, 1964), *Stenocereus thurberi* (McDonough 1964 y Dubrovsky 1996), *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Ferocactus peninsulæ* (Dubrovsky, 1996). *Cephalocereus apicicephalium* podría ser una de ellas por el tipo de hábitat en el que habita con condiciones de suelo muy poroso y con poca retención de agua (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978),

desafortunadamente en este caso no hubo material suficiente para realizar experimentos de este tipo.

Escarificación

La entrada de agua a la semilla es determinada por la permeabilidad de su cubierta. La impermeabilidad de la testa, o su permeabilidad selectiva es de manera frecuente la causa de latencia (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Las semillas de muchas especies de cactáceas son ingeridas y dispersadas por aves y mamíferos. Se han realizado diversos estudios que han demostrado que el efecto de la ingestión de los frutos sobre la cubierta de la semilla, permite que las semillas germinen si las condiciones son adecuadas (Escobar y Huerta, 1999 en Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004 y Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Con la ingestión de los frutos, las semillas pasan a través del tracto digestivo en donde reciben un tratamiento ácido que suaviza su cubierta, reduce el grosor de la misma, o remueve su cubierta cerosa, aumentando por ello la permeabilidad de la semillas y probablemente mejorando el intercambio gaseoso y la imbibición de las mismas, preparándolas para la germinación en el momento en el que son depositadas en las heces fecales (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004 y Nolasco *et al.*, 1996).

Para simular las condiciones naturales del fenómeno ocurrido en las semillas, debido a la ingestión de las mismas por animales, uno de los métodos utilizado en los experimentos de germinación para romper la latencia, es por medio de escarificación química (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004). Para el caso de *C. apicicephalum*, sus frutos son comestibles, pero no son de buena calidad, debido al pobre desarrollo de los funículos, que los hace ser frutos secos (Casas, 2002), lo que reduce la posibilidad de que sean ingeridos por animales. Aún así, se realizaron varios ensayos con tratamientos escarificantes (Tabla 13) para observar si la latencia o falta de germinación de las semillas se debía a algún tipo de impedimento mecánico impuesto por la testa o a alguna sustancia inhibidora de la germinación presente en la misma.

En nuestros experimentos, se utilizaron tres sustancias escarificantes: agua oxigenada (H_2O_2) por 20 min, ácido clorhídrico concentrado (HCl) por 5 min y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) por un min. El porcentaje de germinación más alto obtenido en los tratamientos de escarificación fue con la utilización de H_2SO_4 concentrado, registrando un 16% de germinación (Tabla 13), es decir, menor al obtenido con los tratamientos de imbibición.

La escarificación con H_2SO_4 para suavizar la cubierta de la semilla y/o remover inhibidores químicos de la testa se conoce bien en estudios de germinación de muchos taxa (Baskin y Baskin, 1998). Así como también, la utilización de sustancias con pH ácido para romper la latencia de semillas de cactáceas de diversas especies.

Rosas-López y Collazo-Ortega (2004), en un estudio de germinación de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus*, utilizaron H_2SO_4 y HCl concentrado por un periodo de una hora como tratamiento de escarificación. Encontraron que para *P. chichipe*, cuyo porcentaje de germinación era por lo general bajo, los tratamientos de escarificación disminuían aún más la germinación de sus semillas, mientras que para *E. platyacanthus*, la utilización de los métodos de escarificación química con ácidos fuertes favorecía la velocidad de la germinación.

De la Rosa-Ibarra y García (1994), realizaron experimentos de germinación con 5 especies consideradas en peligro de extinción. Dos de las especies fueron *E. grusonii* y *E. platyacanthus*, para las cuales se obtuvo un incremento de la germinación con la utilización de H_2SO_4 concentrado teniendo un porcentaje de germinación de 68% y 60% respectivamente.

Potter *et al.* (1984) estudiaron la germinación en *Opuntia edwardsii*, *O. discata* y *O. lindheimeri*, mediante escarificaciones con H_2SO_4 concentrado. Los resultados indican que mediante este procedimiento los porcentajes de germinación se incrementan consistentemente, siendo los mejores tratamientos aquellos en que las semillas se expusieron al H_2SO_4 por 30 y 60 minutos. Los porcentajes de germinación obtenidos fueron de 28%, 74% y 34% respectivamente.

En otro estudio, semillas de *O. ficus indica* y de *O. amyclaea* se escarificaron con H_2SO_4 concentrado por 3, 6 y 12 minutos, bajo condiciones de invernadero. Los

resultados mostraron que las semillas de dichas especies no requieren escarificación con H_2SO_4 . El porcentaje de germinación del tratamiento control superó el valor reportado para los tratamientos de escarificación, siendo que para la mayor parte de los tratamientos, los porcentajes de germinación fueron inferiores a 10% (Muratalla *et al.*, 1984, citado por Sánchez, 1997).

Olguín (1994) reporta para *Ariocarpus retusus*, la utilización de H_2SO_4 concentrado por un periodo de 30 seg con resultados satisfactorios. Sin embargo, menciona que las semillas de esta especie no respondieron después de estar expuestas 1 minuto al ácido, probablemente debido a la penetración del ácido y al daño consecuente del embrión.

La rápida inmersión de semillas en soluciones ácidas a bajas concentraciones se ha reportado que incrementa la germinación en algunas especies de cactáceas como a continuación se señala.

Nolasco *et al.* (1996), encontraron que las semillas de *Pachycereus pringlei* incrementaban su germinación después de ser sumergidas en soluciones de HCl 0.25 y 0.75 M, mientras que la utilización de concentraciones más altas disminuía la germinación.

También se encuentra reportado que *Pilosocereus chrysanthus*, *Cephalocereus columna-trajanii*, *Ferocactus latispinus*, *Stenocereus stellatus* y *Wilcoxia viperina* no mostraron un incremento en sus porcentajes de germinación con el uso de escarificación química (Álvarez y Montaña, 1997 en Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004). Así como también, Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet (1998), encontraron que la inmersión de semillas en soluciones ácidas de distintos pH (ácido hidroclicórico de pH 1, 2, 3 y 6 por 1 h) no presentaron un incremento significativo en los porcentajes de germinación en 7 de las 8 especies estudiadas provenientes del valle de Tehuacán, con relación al tratamiento control (*Neobuxbaumia tetetzo*, *Coryphantha pallida*, *Ferocactus flavovirens*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Pachycereus hollianus*, *Ferocactus latispinus*, *Echinocactus platyacanthus* y *Opuntia puberula*). La única especie que presentó un incremento significativo en el número de semillas germinadas después de la inmersión en una solución ácida de pH 1, fue *Pachycereus hollianus*.

Ramírez-Padilla y Valverde (2005) encontraron que no existió diferencia significativa, con respecto al tratamiento control, en los resultados finales de germinación de *Neobuxbaumia tetezo*, *N. mezcalaeinsis* y *N. macrocephala*, sumergiendo sus semillas en soluciones de HCl (pH 1.5 y 3) por una hora, previo a su siembra. Los resultados sugieren que, a pesar de que las semillas de estas especies, no requieren de un tratamiento ácido para germinar, resisten la acidez del tracto digestivo de sus dispersadores, sin sufrir daño, como es el caso de otras especies de cactus.

Temperatura

Semillas diferentes tienen distintos rangos de temperaturas en los cuales germinan, siendo que a muy bajas o altas temperaturas se inhibe la germinación. La sensibilidad exacta es muy diferente entre especies (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Se ha observado en semillas de diversas especies que una o varias alternancias de temperatura pueden favorecer o disparar la germinación. El efecto de la alternancia de temperatura parece tener relación con la hidratación de la semilla, pues la escarificación de éstas en muchos casos, es suficiente para permitir la germinación a una temperatura constante. Los cambios fisicoquímicos producidos en las semillas por causa del termoperiodo, que conducen al rompimiento de la latencia, son muy diversos entre las especies. En general, se piensa que la fluctuación de temperatura permite la activación de ciertas enzimas y hace permeables algunas membranas, lo que finalmente trae consigo el desencadenamiento de la germinación. Así mismo, las semillas que responden a este cambio ambiental, pueden presentar diversos mecanismos para detectar este factor, como por ejemplo, la presencia de una testa impermeable que se hace permeable con el calentamiento, o la presencia de un mecanismo químico endógeno que sólo se puede activar el proceso de la germinación al ocurrir fluctuaciones de la temperatura (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

En el rango de temperaturas en donde ciertas semillas germinan, existe usualmente una óptima, alrededor de la cual la germinación es retrasada pero no inhibida. La temperatura óptima puede ser tomada como aquella temperatura a la cual

se alcanza el más alto porcentaje de germinación en el tiempo más corto. La mínima y la máxima temperatura de germinación son la más alta y la más baja temperaturas en las cuales la germinación apenas ocurre. (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

El rango de temperatura y la temperatura óptima en la cuales las distintas semillas germinan, son determinados por la fuente de las mismas, diferencias genéticas para una especie dada (*i. e.* diferencias en variedades), así como también por su edad. Sin embargo, es importante hacer notar que el efecto de la temperatura en la germinación no es independiente de otros factores (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

Para las semillas de cactáceas, se encuentra reportado que el rango de temperatura en el cual germinan es entre los 17 y 34 °C, y la temperatura óptima es frecuentemente 25 °C (Alcorn y Kurtz, 1959). Aunque otros autores sugieren que la mayoría de las plantas desérticas alcanzan su porcentaje máximo de germinación entre los 15 y 25 °C (Nobel, 1988 en Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001).

Diversos estudios han demostrado que tanto la temperatura constante como la alternada pueden jugar un papel importante en la germinación. La estimulación por la alternancia de temperaturas ha sido comúnmente atribuida a un efecto de la temperatura en reacciones secuenciales durante la germinación o bien a cambios mecánicos ocurridos en la semilla (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982).

En algunas especies que habitan ambientes áridos, las fluctuaciones de temperatura incrementan la germinación (Hammouda y Bakr, 1969), sin embargo, en especies de cactáceas no se ha encontrado diferencia significativa en comparación con los tratamientos a temperatura constante (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Existen reportados varios estudios en donde se hace uso de diversas temperaturas para lograr la germinación de varias especies de cactáceas. Algunos de ellos son con temperaturas constantes y otros más, utilizando variaciones de las mismas para simular los cambios que se dan en la naturaleza y de esta manera inducir la germinación. En el presente trabajo, todos los tratamientos para inducir la germinación de *C. apicicephalum* se colocaron en la cámara de incubación a 26 ± 2 °C. Esta temperatura se encuentra reportada como óptima para un gran número de especies de cactáceas tales como *Carnegiea gigantea*, en donde se encontró que la tasa máxima de

germinación observada era a los 25 °C y que la germinación decrecía considerablemente debajo de los 20 °C y arriba de 30 °C (Alcorn y Kurtz, 1959). Benítez-Rodríguez *et al.* (2004) en un estudio con 4 especies de *Mammillaria*, encontraron que los porcentajes máximos de germinación se dieron a 25 °C. Por su parte, Rojas-Aréchiga *et al.* (2001) en un estudio con semillas de *Stenocereus stellatus*, observaron que la fluctuación de temperatura no incrementó el porcentaje de germinación en contraste con los resultados obtenidos a 25 °C. Asimismo, Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet (1998), encontraron que en 5 de 8 especies de cactáceas estudiadas, la proporción de semillas germinadas mantenidas a temperatura constante (17 °C), no difería de aquellas obtenidas con fluctuaciones de temperatura (20-25 °C).

Sin embargo, también se encuentran reportadas otras temperaturas como óptimas para la germinación para algunas especies de cactus, como es el caso del estudio realizado por De la Rosa-Ibarra y García (1994), en donde encontraron que para *Astrophytum myrostigma* y *A. capricorne*, los mejores resultados de germinación se obtuvieron a 28 °C, mientras que para *Echinocactus grusonii*, *E. platyacanthus* y *Leuchtenbergia principis* los mejores resultados se obtuvieron a una temperatura de 20 °C.

También se encuentra reportado para 3 especies del género *Neobuxbaumia* que sus porcentajes de germinación no se vieron afectados con la aplicación de dos tratamientos a temperatura constante (17 y 27 °C), lo que apoya la teoría de que los cactus son capaces de germinar en un amplio rango de temperaturas (10-40 °C), generalmente alcanzando los porcentajes de germinación más altos entre los 15 y 30 °C (Ramírez-Padilla y Valverde, 2005).

Existen varios reportes en donde se utiliza la fluctuación de temperatura para inducir la germinación. En el caso de *C. apicicephalum*, el ensayo de germinación que hizo uso de una fluctuación en temperatura fue al embeber las semillas en agua a 50 °C por 5 min dejándola enfriar a temperatura ambiente durante 24 h. Este ensayo se realizó tomando como base la metodología empleada en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, para sembrar semillas *ex vitro* de diversas especies (Reyes y Arias, 1995). En este caso se utilizaron dos tiempos de imbibición (12 y 24 h), y

desafortunadamente no fueron exitosos, así como tampoco fue exitosa la utilización del mismo método en la siembra de semillas de este lote en condiciones *ex vitro*. El empleo de este tratamiento *in vitro* se encuentra reportado por Rosas-López y Collazo-Ortega (2004), en semillas de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus*, con la diferencia de que dichos autores utilizaron agua con agar 10 g/l, contrastando sus resultados con la siembra de semillas *ex vitro* en una mezcla de suelo/tepojal (1:1). Ellos observaron que *P. chichipe* no germinó en la mezcla de agua-agar, mientras que en el tratamiento *ex vitro* se obtuvo un 30% de germinación y *E. platyacanthus* tuvo un 80% con el tratamiento *in vitro* y en suelo no germinó.

Algunos autores sugieren que el estrés por frío puede inducir la germinación de ciertas semillas (Bewley y Black, 1985 en Nolasco *et al.*, 1996). En el caso de *C. apicicephalum*, el tratamiento de estratificación a 4 °C, no tuvo como resultado la estimulación de la germinación. Nolasco *et al.* (1985) tampoco obtuvieron resultados satisfactorios para *Pachycereus pringlei*, con la exposición de sus semillas a bajas temperaturas (12 °C).

Tratamientos combinados

La combinación de distintos métodos para romper la latencia de las semillas se encuentra reportada por Bradbeer (1988), en donde hace alusión a que muchas semillas no logran germinar o muestran menos del 100% de germinación en respuesta a un solo tratamiento de rompimiento de la latencia. En dichos casos, tasas altas de germinación, resultan comúnmente de la combinación de dos tratamientos distintos aplicados ya sea simultánea o sucesivamente. Pero desafortunadamente para el caso de *C. apicicephalum*, los resultados no fueron satisfactorios.

Los tratamientos combinados en este estudio se escogieron con base al porcentaje de germinación obtenido en el total de los tratamientos de imbibición, escarificación y estratificación, en donde a pesar de que en general fueron muy bajos, en los que se obtuvieron los mejores resultados fueron con la escarificación con H₂SO₄ con 16% y con los de imbibición por 24, 72 y 96 h con porcentajes de 16, 32 y 16%

respectivamente (Tabla 13), de los que sólo se escogieron los tiempos de 24 y 72 h para combinarlos con escarificación previa con H₂SO₄.

Desafortunadamente, la combinación de estos dos factores (escarificación + imbibición) no fue favorable para la germinación de las semillas de *C. apicicephalum*, puesto que los porcentajes de germinación estuvieron por debajo de los obtenidos con los tratamientos por separado. En los tratamientos de H₂SO₄ con 24 y 72 h de imbibición, los porcentajes de germinación fueron de 4 y 8%, en medio MS 50%, mientras que en medio MS al 100% de sus componentes, sólo se obtuvo un 4% en el tratamiento de H₂SO₄, con 24 h de imbibición (Tabla 13).

La combinación de tratamientos de escarificación con ácidos fuertes y tiempos de imbibición con agua caliente por 5 min y después a temperatura ambiente por 24 h, se encuentra reportada para la germinación de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus*. En este estudio se encontró que para estas especies, al igual que para *C. apicicephalum*, no fue favorable para su germinación la combinación de tratamientos de rompimiento de latencia, puesto que los porcentajes obtenidos fueron de 0 y 25% respectivamente (Rosas-López y Collazo-Ortega (2004).

Luz y oscuridad

En el caso de *C. apicicephalum*, no hubo respuesta al tratamiento de germinación en oscuridad con una imbibición previa de 72 h, tratamiento en el que se obtuvieron mejores resultados, mientras que en el tratamiento con luz se obtuvo una germinación del 4% (Tabla 13). Estos resultados, aunados con los obtenidos en el tratamiento de barrido hormonal ANA/BAP en oscuridad, se puede decir que es posible que *C. apicicephalum* sea una especie con semillas fotoblásticas, aunque son necesarios futuros estudios para llegar a resultados concluyentes a este respecto.

Mayer y Poljakoff-Mayber (1982), mencionan que la sensibilidad de las semillas a la luz se incrementa con el tiempo de imbibición, la máxima sensibilidad se alcanza mientras la imbibición ocurre y no exactamente coincide con la completa imbibición de la semilla.

Comparación de medios

Existen reportes de germinación en medio MS para diversas especies como: *Ariocarpus retusus* para la cual se utilizó medio MS, MS 50% con 15 g de sacarosa y MS 50% con 30 g de sacarosa, obteniendo porcentajes de germinación de 66.3, 63.8 y 33% respectivamente, después de 50 días (Olguín, 1994); para *Turbincarpus laui*, se reportó una germinación de 41.7% en MS y 28% en MS 50% al cabo de 5 semanas (Mata-Rosas *et al.* 2001); en *Ariocarpus kotschoubeyanus*, se reportó un porcentaje de germinación entre el 74 y 90% en medio MS (Moebius-Goldammer, 1999); Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) encontraron que *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis*, tuvieron alrededor de 50% de germinación en medio MS. Dávila-Figueroa *et al.* (2005), obtuvieron porcentajes de germinación en medio MS de 46 y 90% para *Turbincarpus valdezianus* y *T. subterraneus*, respectivamente.

Ahora bien, los resultados de *C. apicicephalium* no concuerdan con las tasas de germinación reportadas en la literatura, aunque sustentan que el medio MS al 100% de sus componentes no es favorable para su germinación.

Rosas-López y Collazo-Ortega (2004), encontraron que el medio MS 50% estimulaba la germinación en *Polaskia chichipe* y en *Echinocactus platyacanthus*, así como también observaron que se obtenía un mejor y mayor crecimiento de las plántulas germinadas, en comparación con el MS al 100% de sus componentes. Dichos autores mencionan que esta situación puede ser atribuida a que los solutos en el medio MS 50%, son menores que los presentes en el MS al 100% de sus componentes, los cuales disminuyen el potencial hídrico, así como también la disponibilidad de agua, obteniéndose por ello porcentajes menores de germinación y bajo vigor en las plántulas.

Estadística comparativa de tratamientos de germinación de *Cephalocereus apicicephalium*

El análisis estadístico de los resultados arrojados por los distintos tratamientos aplicados a las semillas de *C. apicicephalium*, exceptuando el barrido hormonal ANA/BAP, apoyan que la imbibición fue el mejor de los tratamientos para el lote de semillas utilizado.

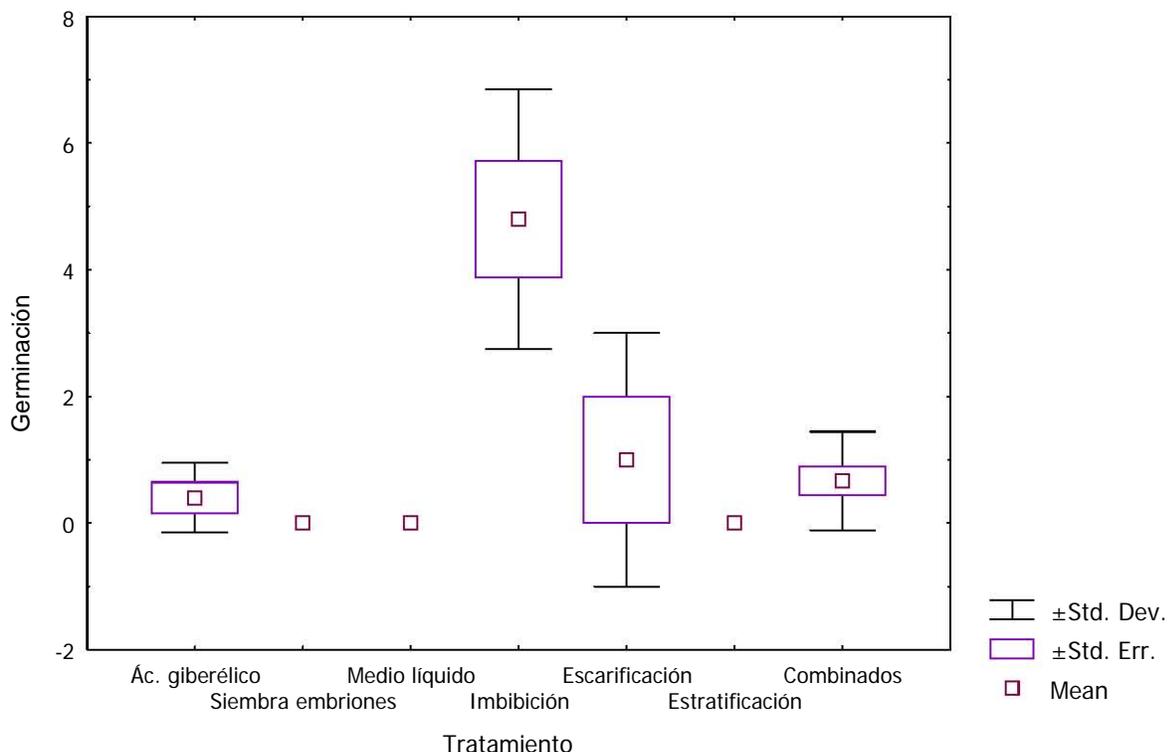
La prueba MANOVA aplicada a los tratamientos de germinación agrupados arrojó un valor de $F=7.55402279$ y una $p=0.00017385$, dicho resultado de p , al ser menor de 0.05, nos indica que existe diferencia significativa en al menos un grupo de tratamientos, por lo que se aplicó una prueba LSD (plano de comparación) para determinar en que tratamiento(s) estaban las diferencias.

Tabla 14. Media y desviación estándar de semillas germinadas de *C. apicicephalium* en tratamientos agrupados por tipo, sembradas en medio MS 50% y MS.

Tratamiento	M y DS
Ác. giberélico	0.4000 ± 0.5477 c
Embriones	0.0000 ± 0 c
Medio líquido	0.0000 ± 0 c
Imbibición	4.8000 ± 2.04939008 abdef
Escarificación	1.0000 ± 2 c
Estratificación	0.0000 ± 0 c
Combinados	0.6666 ± 0.77849895 c

***Las letras diferentes muestran las diferencias entre tratamientos**

En la prueba LSD, se determinó que el tratamiento de imbibición presentó diferencia significativa con los otros tratamientos, ya que fue el tratamiento en el que más semillas germinaron con una media de 4.8 semillas germinadas, por lo que pudimos decir que fue el mejor para este estudio (Tabla 14 y Gráfica 2).



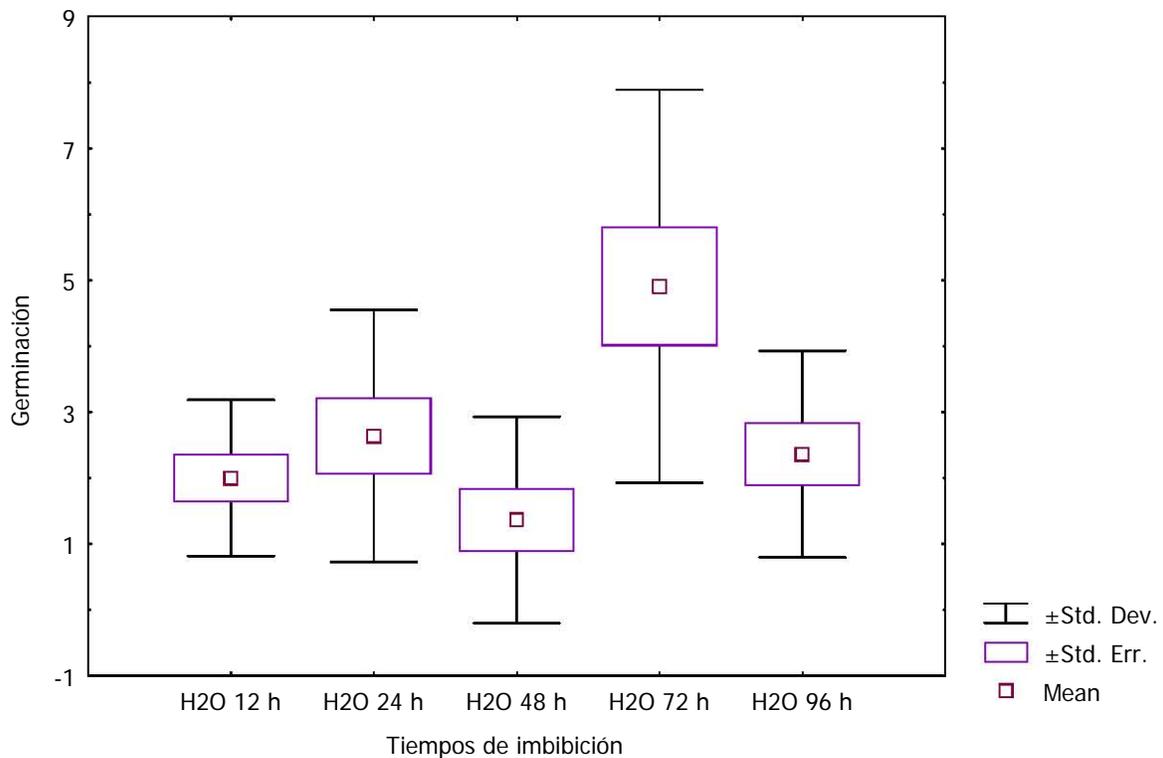
Gráfica 2. Media, error estándar y desviación estándar entre grupos de tratamientos de germinación de *C. apiccephalum*.

Al aplicar la MANOVA entre los diferentes tiempos de imbibición se comprobó que si existió diferencia significativa entre estos, obteniendo una $F=5.29652834$ y un valor de $p=0.00123234$. Al aplicar la prueba posthoc LSD (plano de comparación) se determinó que el tratamiento de imbibición por 72 h fue el que presentaba diferencia significativa con respecto a los otros tiempos de imbibición (Tabla 15).

Tabla 15. Media y desviación estándar de semillas germinadas de *C. apiccephalum* en los distintos tiempos de imbibición, sembradas en medio MS 50%.

Tratamiento	M y DS
H ₂ O 12 h	2.0000 ± 1.18321598 d
H ₂ O 24 h	2.6363 ± 1.91168654 d
H ₂ O 48 h	1.3636 ± 1.56669891 d
H ₂ O 72 h	4.9090 ± 2.98176265 abce
H ₂ O 96 h	2.3636 ± 1.56669891 d

***Las letras diferentes muestran las diferencias entre tratamientos**



Gráfica 3. Media, error estándar y desviación estándar entre los diferentes tiempos de imbibición como tratamiento de germinación en semillas de *C. apicicephalum*

Se observa (Tabla 15 y Gráfica 3) que el tratamiento de imbibición por 72 horas fue el que presentó diferencia significativa con los resultados de los otros tiempos de imbibición, presentando una media de 4.9 semillas germinadas, por lo que se determinó que este tratamiento de imbibición fue el mejor.

Prueba de viabilidad con TTC

Los resultados obtenidos para la prueba de viabilidad aplicada a una muestra de los dos lotes de semillas utilizados en este estudio, según el manual de prueba de Tetrazolium (*"Tetrazolium Testing Handbook"*), podrían ser viables, puesto que todo el embrión presentó una coloración rojo pálido uniforme. El manual menciona en el apartado para semillas de cactáceas, que para considerar que las semillas son viables, todo el embrión debe presentar una coloración uniforme, mientras que las semillas no viables, presentan una parte esencial del embrión sin tinción, sin mencionar la tonalidad de la coloración. Sin embargo, mencionan que la prueba de viabilidad de TTC no es muy confiable, ya que una prueba de germinación resulta un método más acertado para probar la viabilidad de las semillas. Los géneros que se mencionan en el manual para los que ha sido empleada esta prueba son *Carnegiea*, *Ferocactus*, *Lophocereus*, *Opuntia* y *Pachycereus*.

Sin embargo Shie y Kuo (1999) mencionan que en semillas que no se encuentran en estado de latencia de *Carica papaya*, el hecho de que el embrión en su totalidad, se tiña de un color rojo pálido significa que no son viables, mientras los únicos tres casos para considerar que las semillas de dicha especie eran viables son cuando todo el embrión se tiñe de rojo, cuando la parte basal de la radícula se tiñe de rojo pálido y el resto de rojo intenso y cuando la parte distal de la mitad de los cotiledones se tiñe de rojo pálido y el resto de rojo intenso. Siguiendo lo establecido por Shie y Kuo (1999), las muestras de semillas de *C. apicicephalum* no son viables, aunque hay que considerar que dichos autores mencionan que las semillas que ellos emplearon no se encuentran en estado de latencia, y ese aspecto es incierto en el caso de *C. apicicephalum*, debido a la baja tasa de germinación presentada con los diversos tratamientos de germinación.

Germinación de semillas de *Echinocereus pentalophus*

El porcentaje de germinación para *E. pentalophus*, fue del 98% aproximadamente, después de 4 semanas de cultivo. No sabemos de donde provinieron las semillas, ni su edad, pero de acuerdo a los reportes, las semillas de la mayoría de las cactáceas permanecen viables por largos periodos de tiempo (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). De acuerdo con el porcentaje tan alto de germinación, podemos decir que el medio MS 50% fue el adecuado para los requerimientos de las semillas de esta especie, contrario a lo citado por algunos reportes, en donde se han obtenido mayores porcentajes de germinación con la utilización de medio MS o MS 50% con 15 g de sacarosa (Mata-Rosas et al. 2001, Olguín, 1994).

En esta especie, la germinación de las semillas siempre dio lugar a una plántula bien diferenciada con aréolas y raíz, mientras que en *C. apicicephalum* en muchos casos se dio la emergencia de la radícula, pero no hubo una posterior diferenciación del tejido que diera lugar a la formación de una plántula.

Los patrones de germinación y el éxito de este proceso, pueden tener un impacto directo en el nivel de rareza de las especies, lo que se ve reflejado en el número de individuos en las poblaciones, afectando por ello, su distribución y abundancia. La germinación se trata de un elemento clave que afecta la dinámica poblacional de las especies, especialmente en los ambientes semiáridos (Ramírez-Padilla y Valverde, 2005).

A pesar de que un gran número de factores pueden interactuar para determinar una distribución altamente restringida y la abundancia de las especies, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la baja tasa de germinación de *C. apicicephalum* puede estar jugando un papel con respecto a su distribución restringida, así como la alta tasa de germinación obtenida en *E. pentalophus*, parece apoyar su amplia distribución y abundancia en la naturaleza.

2. Cultivo de secciones de plántulas

a) *Cephalocereus apicicephalium*:

A partir de la germinación *in vitro* de semillas de *C. apicicephalium*, se obtuvieron un total de 20 plántulas bien diferenciadas de distintas edades por el largo proceso de los tratamientos de germinación aplicados. La longitud de las plántulas fue de 0.7 a 1.2 cm aproximadamente, todas presentando aréolas con espinas y raíz bien diferenciada, aunque algunas menos ramificadas y desarrolladas. Éstas se disectaron en 4 explantes, uno apical, dos laterales y uno basal (Figura 3).

b) *Echinocereus pentalophus*:

Al término de alrededor de 5 meses, a partir de la germinación de las semillas de *E. pentalophus in vitro*, las plántulas desarrollaron de 2-3 tubérculos en el ápice y una longitud aproximada de 0.3 cm, algunas presentaban raíz un poco ramificada pero no muy larga (0.5-0.7 cm). Debido al tamaño de las plántulas se disectaron sólo en 2 explantes, uno apical y el otro basal conteniendo a la raíz.

3. Inducción

Cephalocereus apicicephalium

Inducción con dos pares de auxina-citocinina: ANA/BAP y 2,4-D/KIN

ANA/BAP

Los resultados obtenidos a partir de la inducción de explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apicicephalium*, después de 9 semanas en el medio de inducción (Tabla 8 y 9) fueron la formación incipiente de muy pocos brotes de lento crecimiento o la aparición de raíz en solo uno de los explantes apicales (Figura 10a). Los explantes apicales mostraron agrandamiento de aréolas, sin llegar a formación de brotes consolidados que pudieran ser individualizados. Los escasos brotes presentes en uno de los explantes laterales, no llegaron a consolidarse (Figura 10d), y cesaron su crecimiento cuando el tejido de callo que les dio origen comenzó a mostrar oxidación al subcultivarlo en medio semisólido adicionado con PVP 1 g/l, para evitar la hiperhidratación del tejido y ayudar a su consolidación.

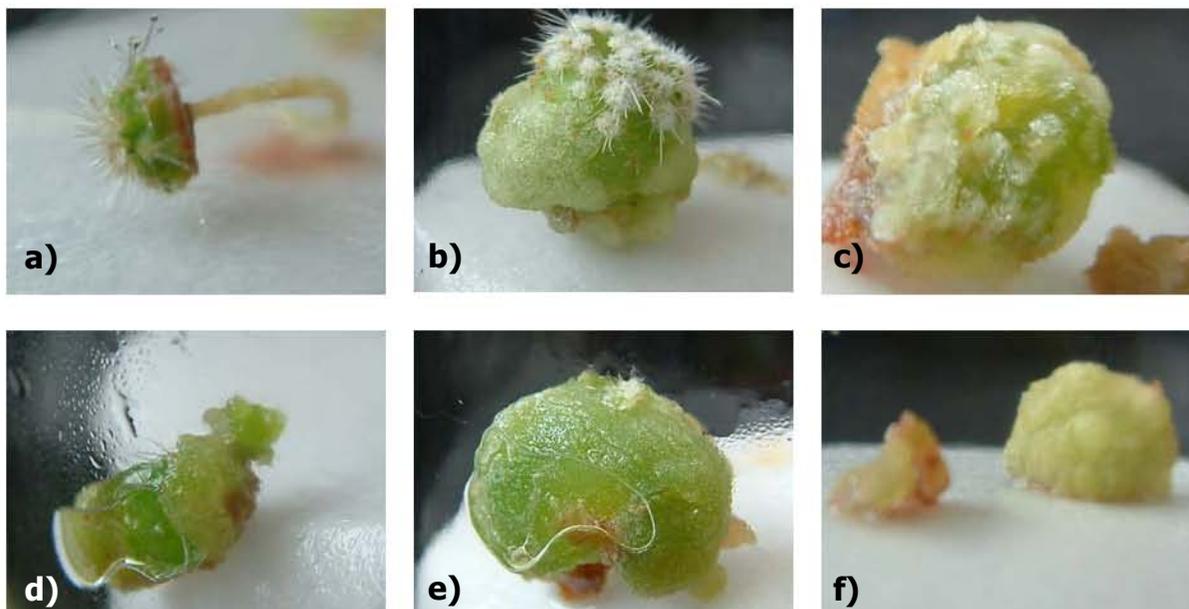


Figura 10. Respuestas morfogénicas de ex plantes de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apicicephalum* en medio de inducción MS 50% líquido en puente de papel filtro, adicionado con PVP 1g/l, ANA(0.1 mg/l) y BAP(2 mg/l), después de 9 semanas en el medio de inducción (a) explante apical con surgimiento de raíz; (b) explante apical con aparición de callo hiperhidratado y agrandamiento de aréolas; (c) explante apical hinchado con formación de callo vitrificado, sin respuestas morfogénicas y poca oxidación; (d) explante apical con aparición de brotes no consolidados y con presencia de muy pocas espinas; (e) explante lateral hincado sin aparición de respuestas morfogénicas; (f) explantes laterales con formación de callo no morfogénico y poca oxidación.

2, 4-D/KIN

El tratamiento de inducción con 2,4-D/KIN, después de 9 semanas, indujo la formación de callo hiperhidratado en la mayoría de los casos, sin ninguna respuesta de regeneración (Figura 11 c, d, e y f). La única respuesta morfogénica aparente, fue el surgimiento de raíces en 3 de los 4 explantes apicales utilizados en este ensayo (Figura 11 a y b), pero dicho explante no continuó su desarrollo y presentó oxidación en el subcultivo a medio semisólido adicionado con PVP 1 g/l, al igual que los demás cultivos. Estos resultados sugieren que dicho tratamiento puede ser adecuado para el enraizamiento de los brotes de esta especie.

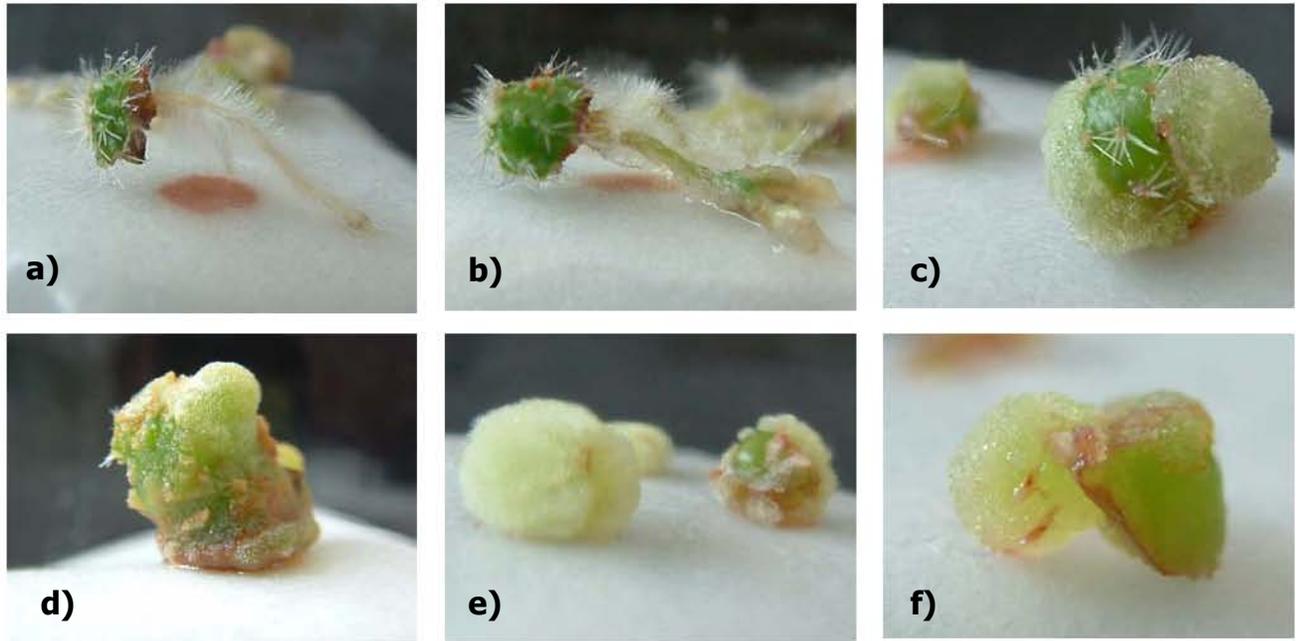


Figura 11. Respuestas morfogénicas de ex plantas de plántulas germinadas *in vitro* de *C. apicicephalium* en medio de inducción MS 50% líquido en puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l, 2,4-D (0.1 mg/l) y KIN (2 mg/l), después de 9 semanas en el medio de inducción. (a y b) explantes apicales con surgimiento de raíz bien desarrollada con presencia de pelos radicales; (c) explante apical hincado con aparición de callo vitrificado; (d) explante lateral con formación de callo compacto verde intenso y callo vitrificado en poca cantidad, con presencia de oxidación leve en la base; (e y f) explantes laterales con formación de callo vitrificado sin respuestas morfogénicas aparentes.

Se encuentra reportado en la literatura que Dabekaussen *et al.* (1991), no encontró diferencia en la proliferación de *Sulcorebutia alba* con la utilización de distintas citocininas usadas en concentraciones equimolares. En contraste, Giusti *et al.* (2002), encontraron que la KIN es más efectiva que BAP estimulando la proliferación de brotes en *P. aselliformis*, mientras que encontró lo opuesto en *M. pectinifera*.

Johnson y Emino (1979), reportaron para *Mammillaria elongata*, que la máxima proliferación de callo friable y de rápida proliferación, fue con la utilización de 2,4-D (2-10 mg/l) con niveles complementarios de KIN y 2iP (1-2 mg/l). Ellos encontraron que la formación de brotes fue promovida en distintos niveles para las 2 citocininas empleadas (KIN y BAP), siendo que 20 mg/l de KIN, 10-60 mg/l de 2iP y 80 mg/l de BAP dieron buenos resultados, y el mejor resultado con brotes más consistentes se obtuvo con la utilización de 10 mg/l de 2iP y 1 mg/l de IBA.

Smith *et al.* (1991), reportó la regeneración de *Coryphanta macromeris* en medio MS a partir de callo inducido con 2,4-D (0.1 mg/l) y BAP (10 mg/l).

Barrido hormonal ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7 mg/l)

Los resultados obtenidos a partir de la inducción con barrido hormonal ANA/BAP, en explantes de plántulas de *C. apicicephalum* germinadas *in vitro*, no fueron satisfactorios, puesto que en ningún caso se presentó la proliferación de brotes bien consolidados y de rápido crecimiento, así como tampoco hubo la proliferación de gran cantidad de callo. En este experimento se pudo observar que la mejor respuesta se obtuvo en los explantes apicales (Figura 12 y 13), encontrándose la máxima proliferación de brotes incipientes a partir del agrandamiento de las aréolas (organogénesis directa), en los tratamientos 2 y 6 (Tabla 9) con 3 mg/l de BAP tanto en ausencia como en presencia de auxina ANA, con 7 y 5 brotes respectivamente (Figura 12 b y d). El tratamiento 3 (Tabla 9) con 5 mg/l de ANA presentó también un agrandamiento de aréolas y proliferación de callo compacto opaco (Figura 12 c).

Los explantes laterales, mostraron en todos los casos la formación de callo compacto hiperhidratado de tonalidades amarillo con tinte rosa (Figura 13b), a excepción del tratamiento 3 (Tabla 9) con 5 mg/l de ANA en donde se dio la formación de 5 brotes por organogénesis directa y 2 más vía organogénesis indirecta (Figura 13a). Los explantes de raíz, no mostraron respuesta alguna, más que la formación esporádica de nódulos que no se desarrollaron, en los tratamientos 2, 3, 6 y 7 (Tabla 9) con 3 y 5 mg/l de BAP.

Todos los brotes obtenidos en el barrido hormonal ANA/BAP, no lograron consolidarse y los más grandes mostraron hiperhidratación causando anomalías en su morfología. Éstos al ser subcultivados a medio semisólido sin reguladores de crecimiento, cesaron su crecimiento y murieron a causa de oxidación.

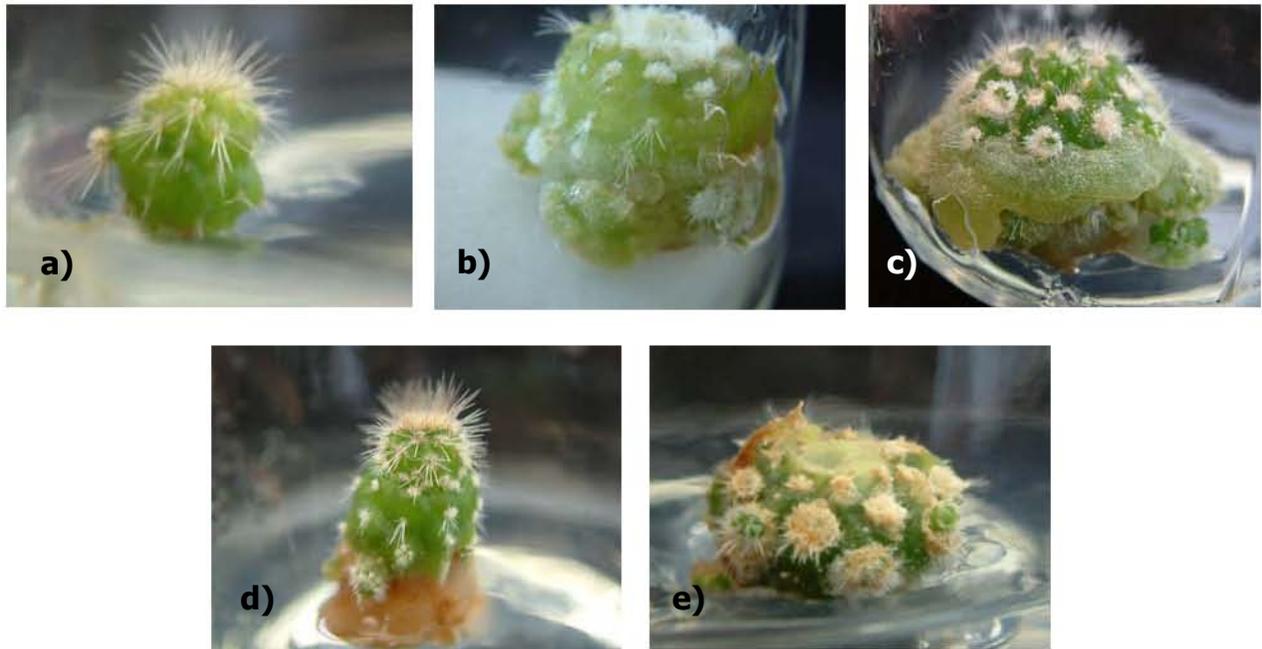


Figura 12. Resultados obtenidos a partir de la inducción del explante apical de *C. apicicephalum* en medio MS 50% adicionado con reguladores de crecimiento ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7 mg/l). (a) tratamiento 1 (1 mg/l ANA), se jido hinc hado con la aparición de un brote incipiente vía organogé nesis directa; (b) tratamiento 2 (3 mg/l ANA) , formación de 7 brotes incipientes vía organogé nesis directa; (c) tratamiento 3 (5 mg/l ANA), agr andamiento de aréolas sin consolidación de brotes; (d) tratamiento 6 (0.1 mg/l ANA/3 mg/l BAP), 5 brotes incipientes a partir del ag randamiento de las aréolas; (e) tratamiento 7 (0.1 mg/l ANA/5 mg/l BAP), agr andamiento de aréolas con presencia de oxidación en la superficie del tejido.

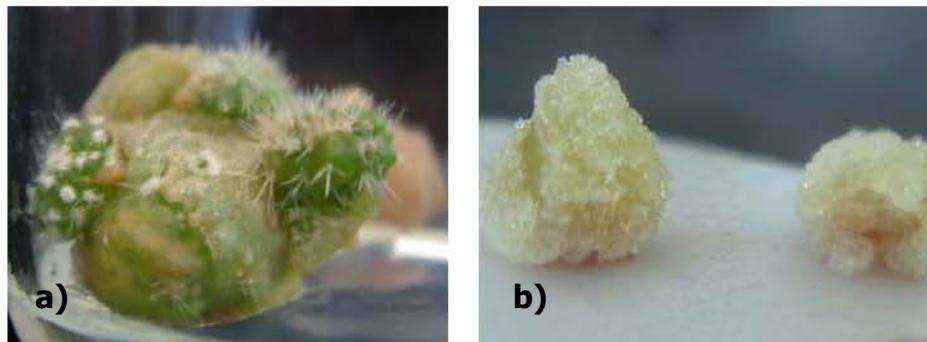


Figura 13. Resultado s obtenido s a partir de la inducción de explantes laterales *C. apicicephalum* en medio MS 50% adicionado con reguladores de crecimiento ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7 mg/l). (a) tratamiento 3 (5 mg/l ANA) formación de 5 brotes por organogé nesis directa y 2 más vía organogé nesis indirecta; (b) tratamiento 8 (0.1 mg/l ANA/7 mg/l BAP), callo compacto hiperhidratado de tonalidades amarillo con tinte rosa.

La elección de los tratamientos del barrido hormonal, se dio con base en los resultados obtenidos a partir de la germinación en presencia del barrido hormonal ANA/BAP, en el que se vió que se obtuvieron mejores resultados con bajas concentraciones de auxina. Los resultados obtenidos en los tratamientos en ausencia de auxina fueron mejores en comparación con los obtenidos con 0.1 mg/l de ANA. Aún así no se logró la proliferación de brotes consolidados que pudieran ser individualizados para la obtención de material vegetal para realizar otros ensayos con otras concentraciones de reguladores de crecimiento (Figura 12 y 13).

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) reportó para 21 especies de cactáceas mexicanas pertenecientes a los géneros, *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*, que las tasas más altas de proliferación se dieron en medio adicionado con citocinina (BAP), en ausencia de auxina. Siendo que para *Cephalocereus senilis*, en particular, se obtuvo una mayor proliferación de brotes adicionando BAP (1 mg/l) en combinación con ANA (0.01 mg/l).

Ahora bien, en los dos experimentos realizados con plántulas de *C. apicicephalium*, se contó con muy poco material, por la baja o nula germinación de los dos lotes de semillas empleados en nuestro estudio. Las plántulas tenían características fenotípicas muy diferentes, presentando diferencias notable en su vigor, aunado al hecho de la diferencia de edades, debida a la germinación gradual de la especie y al largo proceso de germinación para obtenerlas (Figura 14). Todo esto pudo ser causa de las respuestas tan distintas presentadas entre tratamientos y no sólo por la diferencia en la concentración de los reguladores de crecimiento de cada tratamiento.

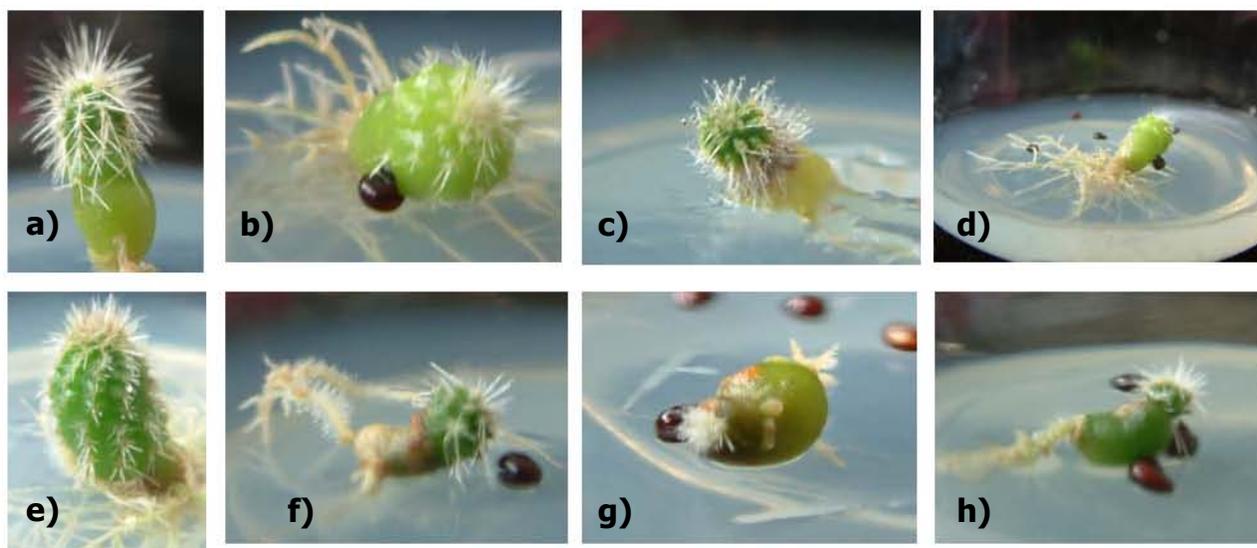


Figura 14. Variación fenotípica de las plántulas de *C. apicicephalum* germinadas *in vitro*. (a) Plántula de 8 semanas (0.8 cm), con desarrollo de gran cantidad de espinas, con sistema radicular poco ramificado; (b y e) Plántulas de 7 semanas (0.9 cm), vigorosas con desarrollo de un sistema radicular muy ramificado y desarrollo de gran cantidad de espinas; (c) Plántula de 9 semanas (0.6 cm) con base amarillenta, gran cantidad de espinas y poco desarrollo de sistema radicular; (d) Plántula de 7 semanas (0.6), con poca vigorosidad, pocas espinas y con desarrollo de un sistema radicular ramificado; (f) Plántula de 8 semanas (0.7 cm), con base delgada, pocas espinas y sistema radicular poco ramificado; (g) Plántula de 7 semanas (0.6 cm) con base hinchada y concentración de espinas en el ápice, sistema radicular no muy ramificado; (h) Plántula de 8 semanas (0.6 cm) con base un poco hinchada, espinas en la parte superior no muy numerosas y raíces ramificadas y desarrolladas.

Por otro lado, ambos experimentos se realizaron empleando medio líquido MS 50% en puente de papel filtro adicionado con PVP 1 g/l. Esta técnica fue en la que se obtuvieron mejores resultados para el control de la oxidación al subcultivar el material obtenido a partir de la germinación en presencia de un barrido de reguladores de crecimiento. Sin embargo, se sabe que el medio líquido presenta la limitación de la aparición de la hiperhidratación, un gran desorden fisiológico causado principalmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos celulares (Pérez, 1998). Desafortunadamente en nuestro estudio, al pasar el material obtenido en medio líquido en puente de papel filtro, a medio semisólido tratando de revertir la hiperhidratación de los explantes, éstos en su mayoría cesaron su desarrollo y al tratar de inducir respuestas cortando el callo en 2 ó 3 partes, éstos se oxidaron y murieron a causa de la oxidación excesiva. Esto ocurrió a pesar de que se

realizó la disección de los explantes sumergidos en una solución antioxidante (ácido cítrico 100 mg/l y ácido ascórbico 150 mg/l), también se utilizó medio adicionado con PVP 1 g/l y los cultivos se mantuvieron dentro de la cámara de incubación evitando la incidencia de luz directa con hojas de papel.

Echinocereus pentalophus

Inducción con barrido hormonal ANA (0 y 0.1 mg/l)/BAP (1, 3, 5 y 7)

En la familia Cactaceae, remover el ápice se ha usado para romper o reducir la dominancia apical, e incrementar la respuesta morfogénica de los explantes (Vyskot y Jara, 1984; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Mohamed Yasseen, 2002).

En *E. pentalophus*, el resultado obtenido del explante basal fue prácticamente nulo, puesto que la mayoría se necrosaron, no tuvieron respuesta a los tratamientos o sólo se dio la formación de callo sin respuestas morfogénicas. Es por eso que los resultados reportados se basan en lo obtenido en el explante apical (Figura 15). Esto es contrario a lo que se encuentra reportado para *Pelecypora aselliformis*, especie en la cual la mejor respuesta, se dio en el explante basal, así como también para *Escobaria minima* se encontró que el explante basal tuvo una respuesta ligeramente mayor con respecto al explante apical (Giusti *et al.*, 2002).

Asimismo, de los resultados obtenidos en los explantes laterales y basales de *C. apicicephalum*, se pudo observar que mostraron una respuesta mucho menor que la obtenida para el explante apical.

Callo

La formación de callo ocurrió en todos los tratamientos, aún en la ausencia de auxina, excepto en el tratamiento control, sin reguladores de crecimiento. Mata-Rosas (2001), reporta para *Turbinicarpus laui*, con la utilización de ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/l) en combinación con BAP (0, 0.5, 1, 2 y 3 mg/l), la proliferación de callo en todos los tratamientos. A pesar de que por lo general, se requiere la adición de auxinas al medio de cultivo para inducir la proliferación de callo en los explantes (George y Sherrington, 1984). Olguin (1994) encontró para *Ariocarpus retusus*, un incremento en la proliferación de callo y en la respuesta de los explantes, a medida que fue aumentando la concentración de citocinina, no importando la ausencia de auxina en el medio de cultivo. En nuestro estudio, las concentraciones de auxina (ANA) utilizadas fueron bajas o nulas (0, 0.1 y 0.5 mg/l), en relación con la concentración de citocinina (BAP 0, 1 y 3 mg/l). Los resultados obtenidos pueden deberse a la acción conjunta de auxinas endógenas con las citocininas exógenas, dando como resultado la proliferación de callo en todos los tratamientos utilizados (Olguín, 1994).

En este estudio se observaron en general, dos tipos de callo, uno compacto vitrificado de color verde claro, encontrado por lo general en la parte en contacto con el medio de cultivo, y el otro compacto color verde intenso, con la superficie oxidada, el cual fue más abundante, sobre todo después de 5 meses de cultivo, y en donde hubo la formación de mayor cantidad de brotes y raíces (Figura 15).

Organogénesis

Se obtuvo el desarrollo de brotes a partir de callo, vía organogénesis indirecta, en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento. En el tratamiento control, sin presencia de reguladores de crecimiento, el desarrollo de brotes fue vía organogénesis directa (Figura 15a).

Los primeros estudios de cultivo de tejidos en miembros de la familia Cactaceae a menudo incluyen la etapa de callo en los métodos de propagación. Más recientemente, la propagación *in vitro* de cactáceas, se ha alcanzado a través de la activación de meristemas existentes, sin organogénesis indirecta, debido a que puede ocasionar variación somaclonal. Sin embargo, la regeneración de brotes permite tasas de proliferación más altas, y en el caso de especies amenazadas la variabilidad genética inducida por el cultivo de tejidos puede ser benéfica, favoreciendo la sobrevivencia de las especies al ser introducidas en su hábitat natural (Starling, 1985; Rubluo *et al.*, 1993).

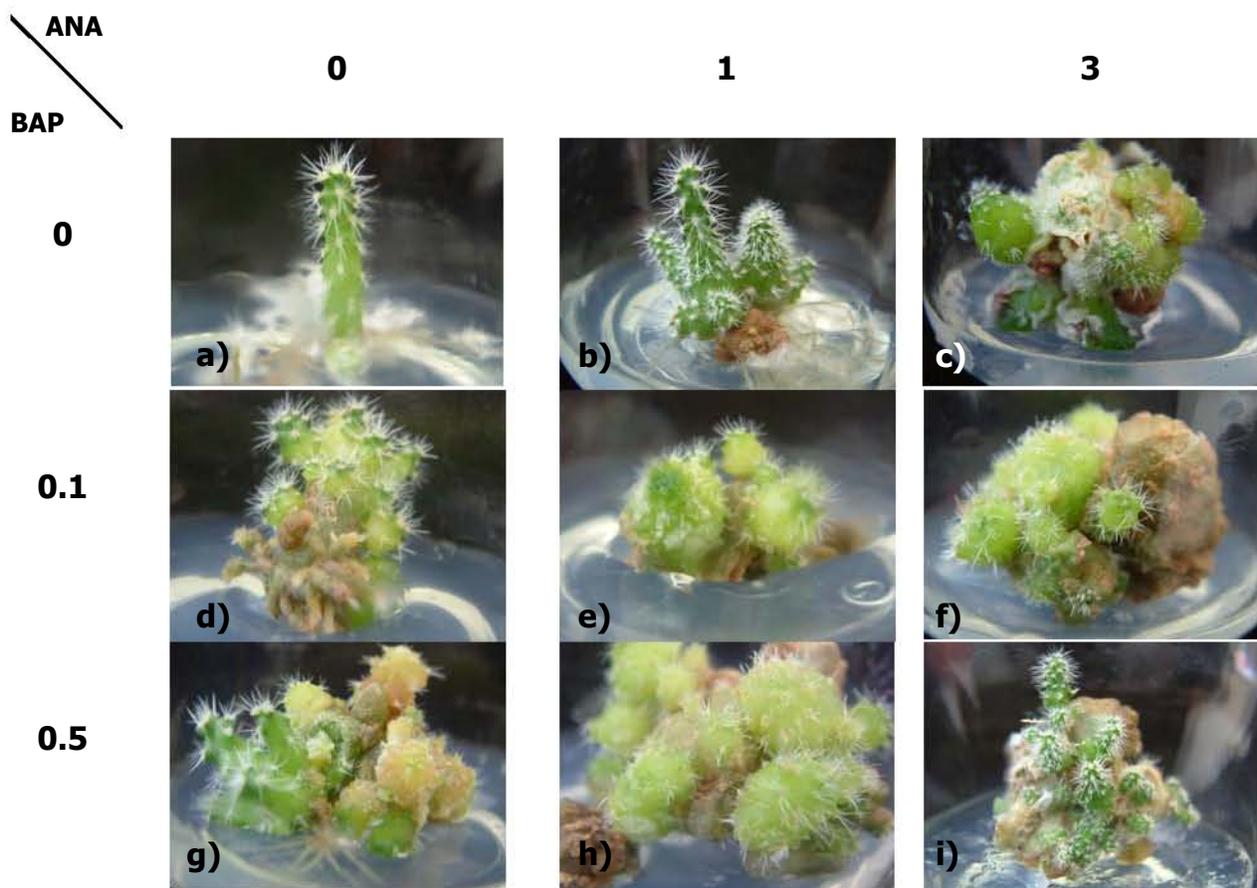
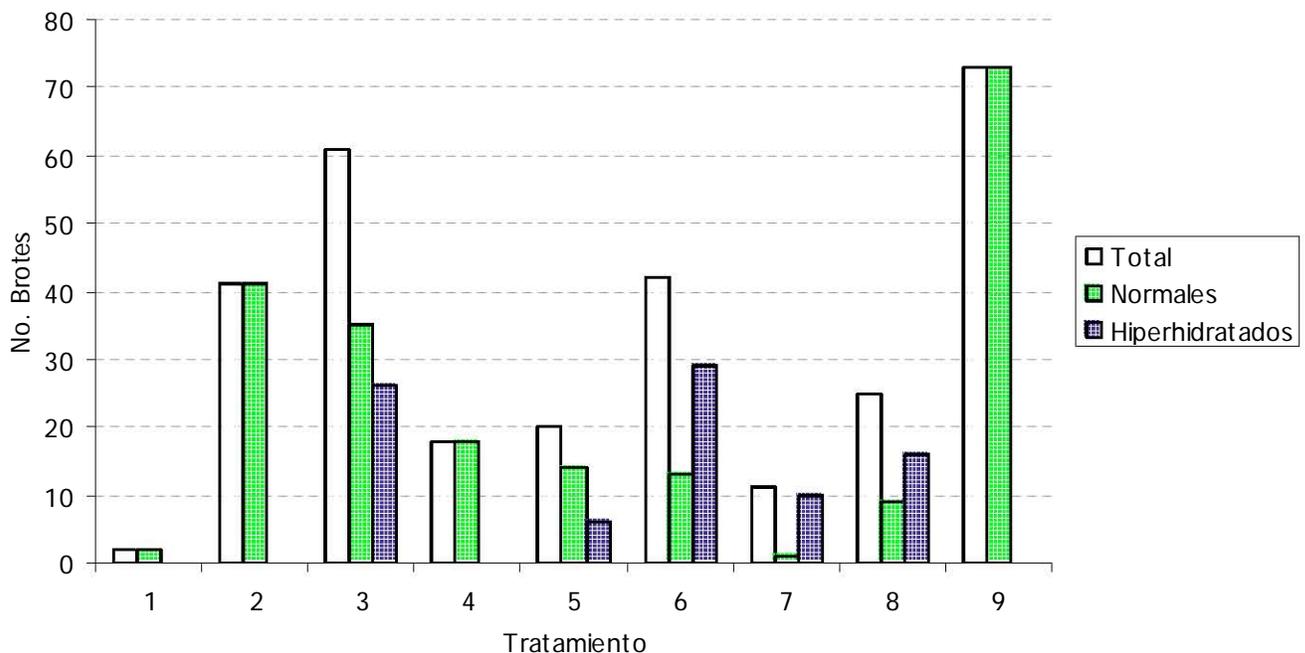


Figura 15. Respuestas morfogénicas del explante apical de *E. pentalophus* después de 5 meses de cultivo. (a) Tratamiento control, sin reguladores de crecimiento, b rotación via organogénesis directa; (b, d, g y i) Tratamientos con mayor cantidad de brotes sin mostrar hiperhidratación severa, vía organogénesis indirecta. (c, e, f y h) Tratamientos con mayor cantidad de brotes hiperhidratados.

Después de 2 meses del subcultivo en el medio sin reguladores de crecimiento se realizó una evaluación del número de brotes producidos en cada uno de los tratamientos. Se observa que el tratamiento 9 (0.5 mg/l ANA / 3 mg/l BAP), fue en donde se presentó el mayor número de brotes, mismos que presentaban una morfología muy parecida a la presentada por las plántulas sin disección ni tratamiento alguno (Figura 15 i y Gráfica 4). Siendo que los brotes regenerados de los tratamientos 3, 5, 6, 7 y 8 (Tabla 10) mostraron hiperhidratación, provocando anomalías en su morfología (Figura 15 c, e, f y h y Gráfica 4). Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) reportan la aparición de hiperhidratación de los brotes de varias especies de cactáceas, mismos que mostraban una apariencia vidriosa y reducido número de espinas y los cuales fueron incapaces de sobrevivir al ser transferidos a suelo.



Gráfica 4. Brotes totales obtenidos de *E. pentalophus* en barrido hormonal ANA/BAP después de 5 meses de cultivo, antes de la individualización y fragmentación del callo morfo genético.

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), reportó para *Echinocereus dubius* y *E. pectinatus*, que el tratamiento que dio mejores resultados con respecto a la proliferación de brotes fue adicionando BAP (1 mg/l) en combinación con ANA (0.01 mg/l).

Giusti *et al.* (2002), en un estudio con *Escobaria minina*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis*, en la presencia de BAP, los brotes mostraron buen crecimiento pero la proliferación de los mismos sólo se observó en la concentración de 5 mg /l. En estas especies, la proliferación de brotes con BAP fue menor que la obtenida con TDZ, pero los brotes no mostraron hiperhidratación y pudieron ser propagados satisfactoriamente.

Estadística comparativa de tratamientos de barrido hormonal ANA/BAP

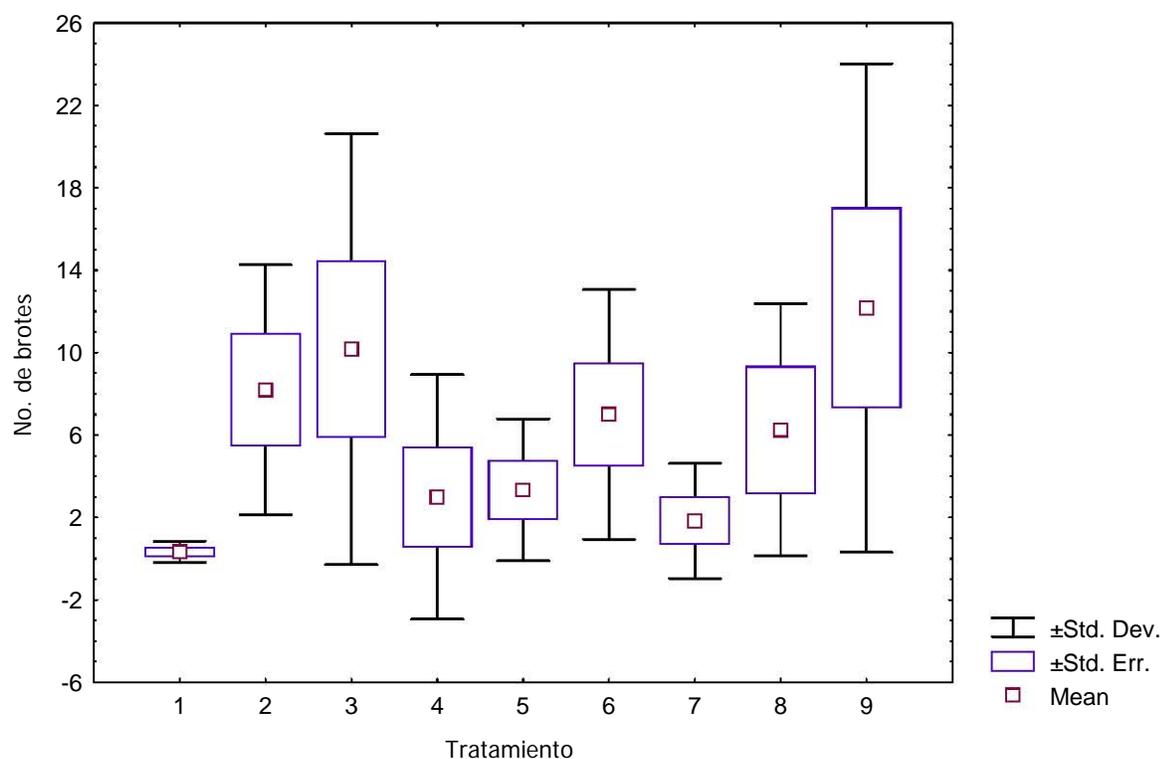
Se realizó una prueba MANOVA con los datos del número de brotes después de 2 meses en el medio sin reguladores de crecimiento. Ésta, arrojó un valor de $f = 2.4991$ y un valor de $p = 0.026$, de la comparación de medias del número de brotes por tratamiento en el barrido hormonal (Tabla 10), lo que nos indica que si existe diferencia significativa entre tratamientos. Al aplicar la prueba de LSD (plano de comparación), se observó que existe diferencia entre algunos de los tratamientos (Tabla 16).

Tabla 16. Media del número de brotes de *E. pentalophus* por tratamiento en barrido hormonal ANA/BAP con desviación estándar y diferencia entre tratamientos, después de 2 meses de inducción.

Tratamiento	M ± DS
1	0.333 ± 0.516 ci
2	8.2 ± 6.058
3	10.167 ± 10.458 ag
4	3 ± 5.933 i
5	3.333 ± 3.445 i
6	7 ± 6.066
7	1.833 ± 2.787 c i
8	6.25 ± 6.130
9	12.167 ± 11.856 adeg

***Las letras muestran las diferencias entre tratamientos**

El tratamiento 9, fue el que presentó una mayor diferencia con los otros tratamientos, así como también fue en el que se encontró la media más grande de 12.167 (Tabla 16). El valor de error y desviación estándar tan altos, fueron debidos debido a que no todos los explantes tuvieron la misma respuesta, encontrándose uno de los frascos sin formación de brotes, y 2 más con muy baja proliferación de los mismos, con 4 y 5 brotes respectivamente (Gráfica 5). Esto se le atribuye a que las respuestas morfológicas se encuentran determinadas por el genotipo, así como también por los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento, los cuales pueden variar por la edad fisiológica del explante, haciéndose evidente cuando se toman explantes de plantas provenientes de semilla de distintas edades (George y Sherrington, 1984).

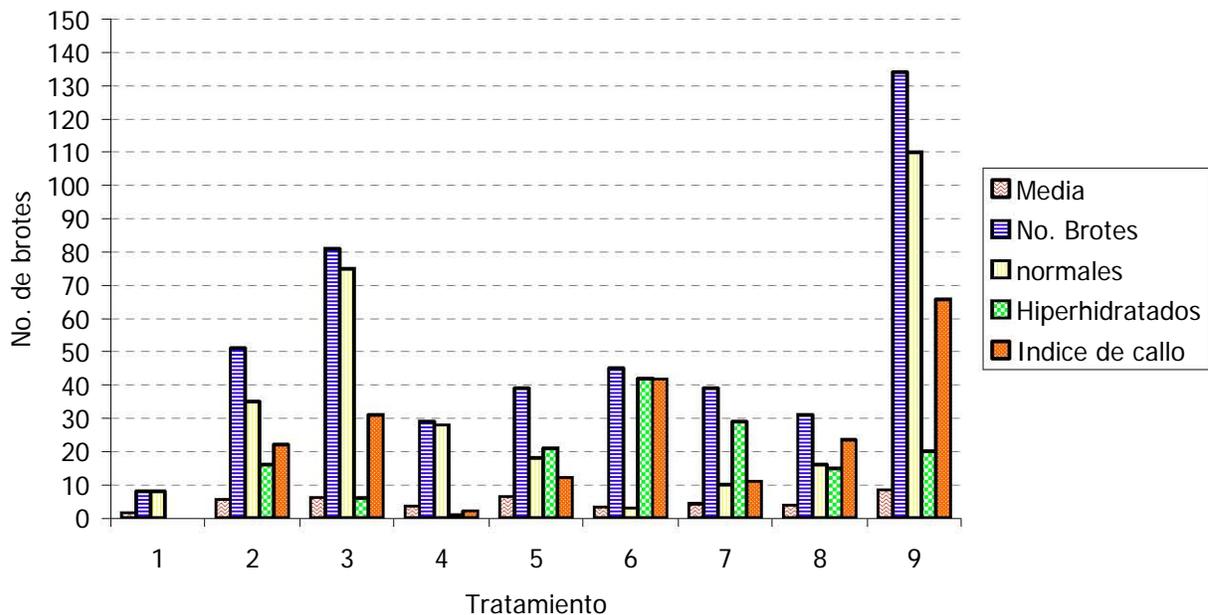


Gráfica 5. Media, error estándar y desviación estándar del número de brotes de *E. pentalophus* en barrido hormonal ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/l) / BAP (0, 1 y 3 mg/l), después de 2 meses de inducción.

Asimismo, los valores de desviación y error estándar tan elevados, se le atribuye a la variabilidad genética inherente de las plántulas obtenidas a partir de semilla, así como también a la diferencia de edades de las mismas, a causa de una tasa de germinación asincrónica, fenómeno presente en algunas especies de cactáceas, como fue el caso de *C. apicicephalum*, para la cual se requirieron de 1 a 8 semanas para la germinación de sus semillas, aunque en el caso de *E. pentalophus*, el rango en el que se presentó la germinación fue de 2 semanas, a partir de que la primera semilla germinó después de 8 días de haber sido sembradas *in vitro*.

Los resultados de proliferación de brotes en el presente estudio coinciden con aquellos reportados por algunos autores en diversas especies de cactáceas. Ault y Blackmon (1987) reportaron un rango de proliferación de 7.9 para *Ferocactus acanthodes*, Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) reportaron para *Mammillaria san-angelensis* de 3-35, Infante (1992) reportó 7.8 brotes para explantes de *Melocactus coccineus*.

Después de 4 meses en medio sin reguladores de crecimiento y después de 2 meses del subcultivo para la individualización de brotes, la evaluación de los cultivos arrojó los siguientes resultados (Gráfica 6).



Gráfica 6. Respuestas obtenidas a partir del explante api cal de *E. pentalophus* después de 6 meses de cultivo, y 2 semanas después de la individualización de los brotes mayores de 0.5 cm.

En esta evaluación pudimos observar que el tamaño del callo, fue aumentando de manera directamente proporcional a la concentración de citocinina (BAP) en el medio de cultivo. El tratamiento 9 (0.5 mg/l ANA / 3 BAP mg/l), nuevamente fue en el que se obtuvieron mayor cantidad de brotes, con un total de 134, seguido por el tratamiento 6 (0.1 mg/l ANA / 3 mg/l BAP) con un total de 45 brotes. El menor número de brotes fue de 25 en el tratamiento 4 (0.1 mg/l ANA). Los resultados obtenidos en esta evaluación nos indican que quizás, el subcultivo para la individualización de los brotes, favoreció la proliferación de los mismos, aumentando considerablemente el número de brotes para todos los tratamientos. Esta respuesta también puede atribuirse a que los cultivos mantuvieron su potencial morfogénico y continuaron regenerando brotes, a pesar de encontrarse en medio sin reguladores de crecimiento. Esto se encuentra reportado para *Turbinicarpus laui*, en donde los cultivos mantenidos en medio sin reguladores de crecimiento conservaron su capacidad proliferativa hasta después de un año del periodo de inducción (Mata-Rosas *et al.*, 2001). Observaciones similares se reportan para *Mammillaria prolifera* (Minocha y Menhra, 1974).

4. Enraizamiento

En *E. pentalophus*, los brotes alcanzaron una altura adecuada para la individualización (≥ 5 mm) después de 8 semanas del subcultivo en medio sin reguladores de crecimiento. Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), en donde para 21 especies de cactáceas mexicanas estudiadas, los brotes pertenecientes a todas las especies, alcanzaron un tamaño adecuado para su individualización (≥ 5 mm) después de 8 a 12 semanas de ser sembradas en el medio de inducción.

El surgimiento de raíces de los brotes individualizados de *E. pentalophus*, ocurrió de manera espontánea después de una semana del subcultivo en medio MS 50% sin reguladores de crecimiento, gelificado con Phytigel 5 g/l. Después de 2 semanas, algunos brotes tenían un sistema radicular bien desarrollado, siendo que algunos de ellos ya mostraban la aparición de pelos radicales (Figura 16c). Estos resultados sugieren, que para esta especie, no es necesaria la aplicación de un medio especial para inducir la formación de raíces, como ha sido reportado para diversas especies de cactáceas.

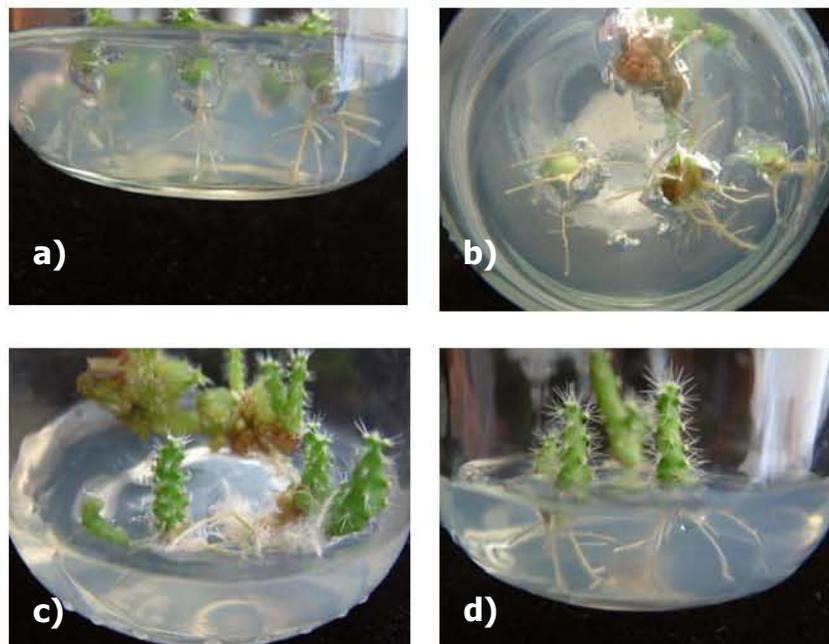


Figura 16. Enraizamiento en *E. pentalophus* después de 2 semanas de la individualización de los brotes. (a, b y c) Raíces ramificadas de 0.3 a 1.5 cm de longitud; (c) Raíces ramificadas con pelos radicales.

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), reportaron para 21 especies de cactáceas mexicanas que el surgimiento de raíces se dio de 3 a 5 semanas después de la siembra en medio adicionado con IAA o IBA (1, 0.5 mg/l). En este estudio todas las especies mostraron un enraizamiento entre el 100 y 75% después de 4 semanas en el medio de inducción de raíces. Johnson y Emino (1979), reportaron para *Mammillaria elongata*, que el proceso de enraizamiento fue optimizado por ANA o IBA (60 mg/l).

Uno de los factores de gran importancia para lograr una estable y adecuada tasa de propagación es el genotipo a propagar, ya que el índice de propagación es diferente para cada una de las especies y para las distintas variedades o clones dentro de la misma especie. Este es un aspecto que debe tenerse siempre en cuenta al planificar un esquema de propagación y en muchos casos la diferencia entre genotipos suele ser determinante, existiendo algunos casos en donde la multiplicación es extremadamente difícil, como es el caso de *Cephalocereus apicicephalum*, conocidos como genotipos recalcitrantes (Pérez, 1998). Al ser diferente la respuesta para cada genotipo, sus requerimientos hormonales, las condiciones de cultivo (temperatura, luz, concentración de sacarosa, etc.) van a variar, por tanto es necesario establecer las condiciones específicas para cada uno de ellos, así como la forma de su manejo *in vitro* con vistas a lograr tasas de multiplicación razonables (Ponce, 1998). En este estudio, se pudo observar claramente la diferencia entre un genotipo y otro, como son *C. apicicephalum* y *E. pentalophus*, especies en las que se obtuvieron respuestas muy variables en condiciones idénticas de cultivo (Tablas 11 y 12, Figuras 12, 13 y 15).

Los resultados obtenidos para ambas especies confirman lo citado por Johnson y Emino (1979), los cuales mencionan que las distintas especies de cactáceas responden de manera muy distinta a los reguladores de crecimiento.

La estabilidad genética se debe de tomar en cuenta seriamente, para fines de conservación y de propagación masiva, debido a la necesidad de obtener plantas idénticas. La ocurrencia de variación somaclonal en miembros de la familia Cactaceae ha sido reportada para *Mammillaria* sp (Corneanu *et al.*, 1990 en Giusti *et al.*, 2002) y *Cereus peruvianus* Mangolin *et al.*, 1994).

VIII. CONCLUSIONES

Cephalocereus apicicephalum

- ✓ Con el procedimiento de desinfección utilizado en el lote de semillas proveniente de la localidad de Oaxaca, se obtuvo el 100% del material libre de contaminación microbiana.
- ✓ La utilización de PPM como tratamiento de desinfección para el segundo lote de semillas, donado por un vivero en Texas, EUA, se obtuvo el 100% del material libre de contaminación microbiana.
- ✓ El mejor tratamiento de germinación fue con la imbibición de las semillas por 72 h con siembra en medio MS al 50%, registrando 32% de germinación (8 semillas germinadas de un total de 25), la cual fue gradual entre la segunda y séptima semana de cultivo.
- ✓ De los cultivos obtenidos a partir de la germinación en presencia de reguladores de crecimiento:
 - El tratamiento con ANA 2 mg/l + BAP 1 mg/l indujo la proliferación de callo friable con capacidades regenerativas incipientes después de un año de subcultivo en el mismo medio de inducción y después de someterlo a un periodo de 6 meses sin subcultivo.
 - El tratamiento con ANA 0.1 mg/l + BAP 2 mg/l, fue en el que se obtuvieron mejores resultados con respecto a la proliferación de brotes.
- ✓ La inducción morfogénica en explantes de plántulas germinadas *in vitro* con el tratamiento de ANA 0.1 mg/l / BAP 2 mg/l, estimuló la formación de raíces en un explante apical después de 3 semanas en el medio de inducción, la formación de callo compacto, y brotes incipientes que no lograron consolidarse. La misma concentración, usando otro par de auxina-citocinina (2,4-D / KIN), promovió el desarrollo de raíces en explantes

apicales, así como también la formación de callo compacto hiperhidratado en poca cantidad.

- ✓ La mayor proliferación de brotes en *C. apicicephalum*, se logró con la inducción de explantes de plántulas germinadas *in vitro* con la citocinina BAP 3 mg/l, sola o en presencia de auxina ANA 0.1 mg/l (7 y 5 brotes incipientes respectivamente).
- ✓ El método de control de oxidación con el que se obtuvieron mejores resultados fueron la utilización de una solución antioxidante (ácido cítrico 100 mg/l y ácido ascórbico 150 mg/l) para sumergir los explantes durante la disección y medio líquido con puente de papel filtro, adicionado con PVP 1 g/l.

Echinocereus pentalophus

- ✓ Con el procedimiento de desinfección utilizado se obtuvo el 100% de material libre de contaminación microbiana.
- ✓ La germinación de *E. pentalophus* en medio MS 50% fue de 98% después de 4 semanas de cultivo.
- ✓ El explante apical mostró gran capacidad organogénica.
- ✓ El mejor tratamiento para la inducción de brotes, vía organogénesis indirecta, fue con el tratamiento: medio MS 50% adicionado con ANA (0.5 mg/l) y BAP (3 mg/l).
- ✓ Esta especie no requirió de la adición de reguladores de crecimiento para el enraizamiento de los brotes individualizados.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C., E. Martínez y L. Arriaga. 2000. Deforestación y fragmentación de ecosistemas: ¿Qué tan grave es el problema en México? CONABIO. *Biodiversitas* 30: 7-11.
- Alcorn, S. M. y E. B. Kurtz, Jr. 1959. Some factors affecting the germination of seed of Saguaro Cactus (*Carnegiea gigantea*). *Amer. J. Bot.* 46 (7): 526-529.
- Álvarez-Sánchez, J. 1993. Contribución de la Sociedad Mexicana de Botánica a la Investigación y Conservación de la Biodiversidad. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. Vol. Esp.* 44:51-57.
- Anderson, E. F. 2001. *The cactus family*. Timber Press. Portland, Oregon, U. S. A. 776 p.
- Arias, S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto Galvan y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cact. Suc. Mex.* 50(4):100-124.
- Arias-Montes, S., 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. *Rev. Soc. Hist. Nat.* 44: 109-115.
- Ault J. R. y W. Blackmon. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species. *HortScience* 20:541.
- Ault, J. R. y W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22(1): 126-127.
- Babaoglu M. y M. Yorgancilar. 2000. TDZ-specific plant regeneration in salad burnet. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 440 : 31-34.
- Baskin C. C. y J. M. Baskin. 1998. *Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. San Diego CA, USA. Academic Press. 666 p.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. Conabio. *Biodiversitas* 32:2-5.

- Benítez, H. y P. Dávila. 2002. Las Cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. Conabio. Biodiversitas 6(40): 8-11.
- Benítez-Rodríguez, J. L., A. Orozco-Segovia y M. Rojas-Aréchiga. 2004. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *The Southwestern Naturalist* 49(1):11-17.
- Bonnes, M. S., P. W. Pare y T. J. Mabry. 1993. Novel callus suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cact. & Succ. J. (US)* 55(3):144-147.
- Bradbeer, J. W. 1988. Seed dormancy and germination. Blackie and Son. Nueva York, USA. 146 p.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. UNAM. México. 743 p.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México. 643 p.
- Casas, A., 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. Conabio. Biodiversitas. 40: 18-23.
- Clayton, P. W., J. F. Hustenberger y G. C. Phillips, 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(2):337-343.
- Compton M. E. y J. M. Koch. 2001. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 37: 259-261.
- Curtis, J. 1986. Microtecnia vegetal. Trillas. México. 106 p.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. van der Laken y J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Raush. *Sci. Hortic.* 46, 283-294.
- Daily, C. G., S. Alexander, P.R. Ehrlich, L. Goulder, J. Lubchenco, P.A. Matson, H.A. Mooney, S. Postel, S.H. Shneider, D. Tilman y G.M. Woodwell. 1996. Ecosystem services: benefits supplied to human societies by natural ecosystems. *Issues in Ecology* 2:1-16.

- Davies, P. J. 1995. Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 832 p.
- Dávila-Figueroa, C. A., M. de L. De la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41:540-545.
- De la Barrera, E. y P. S. Nobel. 2003. Physiological ecology of seed germination for columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. Journal of Arid Environments 53: 297-306.
- De La Rosa-Ibarra, M. y H. García. 1994. Estimulación de la germinación de cinco especies de Cactáceas consideradas en peligro de extinción. Phytón. 56(12): 147-150.
- De Robertis, E. M. F., J. Hib y R. Ponzio. 1996. Biología Celular y Molecular. El Ateneo. 111 p.
- Dehgan, B. y H. E. Pérez. 2005. Preliminary study shows germination of Caribbean applecactus (*Harrisia fragrans*) improved with acid scarification and gibberellic acid. Native Plants Journal; 6(1): 91-96.
- Deno, N. C. 1994. The critical role of gibberellins in germination and survival of certain cacti. Cactus and Succulent Journal (U.S.), 66:28-30.
- Dickison, W. C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press. U. S. A. 517 p.
- Dodds, J. H. and Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. New York (USA): Cambridge University Press. 50 p.
- Donelly, D. J. y W. E. Vidaver. 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Vol. 3. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 141 p.
- Dubrovsky, J. G. 1996. Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. American Journal of Botany 83(5): 624-632.
- Dubrovsky, J. G. 1998. Discontinuous hydration as a facultative requirement for seed germination in two cactus species of the Sonoran Desert. Journal of the Torrey Botanical Society, 125(1): 33-39.

- Fay, M. F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10: 33-48.
- Flona, A. R. 1991. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of *Saintpaulia ionantha* Wendl, (African violet). *Plant Science*. 73: 243-251.
- Flores, J. C. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pelecypora strobiliformis* (Wendermann) Fric *et* Schelle (Cactaceae). Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México 58p.
- Flores-Villela, O. y P. Gerez, 1994. Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso de suelo. México. Comisión para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 439.
- Geerts P., K. Sassi, G. Mergeai y J. P. Baudoin. 2000. Development on an *in vitro* pod culture technique for young pods of *Phaseolus vulgaris* L. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 36: 481-487.
- George, E. F. y P. D. Sherrington, 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Exegetics Limited, England. 709 p.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchi, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *HortScience* 95: 319-332.
- Godínez-Álvarez, H. y A. Valiente-Banuet. 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments* 39: 21-31.
- Hammouda, M. A. y Z. Y Bakr. 1969. Some aspects of the germination of desert seeds. *Phyton* 13:183-201.
- Harper, J. L. 1957. The Ecological Significance of Dormancy and its Importance in Weed Control. *Proceedings of the 4th International Congress of Crop Protection, Vol. 1.* Hamburgo.

- Hernández-Hernández, J., G. Ruíz-Campos y E. Sánchez-Martínez. 1994. Apuntes sobre la propagación in vitro de *Melocactus bellavistensis* Rauh et Backeb, del Perú. Botanic Gardens Micropropagation News Vol. 1 Part 7.
- Infante, R. M. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocalcoccus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31(2): 155-159.
- Johansen, D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill. U. S. A. 523 p.
- Johnson, J. L. y E. R. Emimo, 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. Cact. & Succ. J. (U.S.) 51:275-277.
- Johnson, J. L. y E. R. Emimo. 1979^a. In vitro propagation of *Mammillaria elongata*. HortScience 14(5): 605-606.
- Kobayashi, A. 1993. Cacti and succulents in Japan. Cact. & Succ. J. (US). 65(3): 126-127.
- Krulik G. A. 1981. Experiments with seed germination. National Cactus and Succulent Journal 36:18-20.
- Magaña, P. y J. L. Villaseñor. 2002. La flora de México ¿se podrá conocer completamente? Ciencias 66: 24-26.
- Maiti, R. K., J. L. Hernández-Piñero y M. Valdez-Marroquín. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. Phytion 55(5): 97-105.
- Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus, 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81: 71-87.
- Mandujano, M. C., J. Golubov y C. Montaña. 1997. Dormancy and endozoochorous dispersal of *Opuntia rastrera* in the Southern Chihuahuan Desert. Journal of Arid Environments 36:259-266.
- Mandujano, M. C., J. Golubov y J. Reyes. 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. Conabio. Biodiversitas 40: 4-7.

- Mangolin, C. A. A., A. J. A. Prioli y M. A. Machado. 1994. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics* 32(7-8): 237-247.
- Mangolin, C. A., A. J. Prioli y M. F. P. S. Machado. 1997. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics* 35: (5-6) 189-204.
- Márquez, V. A. 2001. Inducción y multiplicación in vitro de tejido calloso de *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria herrerae* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M. México, D. F. 68 p.
- Martínez-Vázquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In-vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64(1): 99-105.
- Mata-Rosas, M., M. A. Monroy de la Rosa, K. G. Moebius-Goldammer y V. M. Chávez-Ávila, 2001. Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered specie. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37:400-404.
- Mauseth, J. D. 1976. Cytokinin- and giberelic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 63(10): 1295-1301.
- Mauseth, J. D. 1977. Cytokinin- and giberelic acid-induced effects on the determination of morphogenesis of leaf primordia in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 64(3): 337-346.
- Mauseth, J. D. 1979. Cytokinin-Elicited formation of the pit-rib meristem and other effects of growth regulators on the morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) seedling shoot apical meristems. *Amer. J. Bot.* 66(4): 446-451.
- Mauseth, J. D. 1988. *Plant Anatomy*. University of Texas, Austin, The Benjamín/Cummings Publishing Company, Inc. U. S. A. 109-118 p.
- Mauseth, J. D. y W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62(8):869-877.

- Mauseth, J. D., 1979a. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. & Succ. J. (US)* 51: 186-187.
- Mayer, A. M. y A. Poljakoff-Mayber. 1982. The germination of seeds. Pergamon Press. 211 p.
- Mc Donough, W. T. 1964. Germination responses of *Carnegieia gigantea* and *Lemaireocereus thurberi*. *Ecology*, 45(1): 155-159.
- Meffe, K. G. y C. R. Carroll. 1997. Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 729 p.
- Minocha, S. C. y P. N. Menhra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2):168-173.
- Moebius-Goldammer, K. 1999. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica de México. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México. 76 p.
- Moebius-Goldammer, K. G., M. Mata-Rosas y V. M. Chávez-Ávila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican specie. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant* 39:388-393.
- Mohamed-Yasseen, Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britt. et Rose). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 427-429.
- Moreno, P. N., G. L. Arce y De La Rosa M. 1991. Germination of an endangered cactus species: *Echinomastus mariposensis* Hester. *Amer. J. Bot.* 78:132.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nava-Esparza, V. C. Y L. L. Yáñez, 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cact. Suc. Mex.* 29:3-7.
- NG, S. Y. C. y N. Q. NG. 1991. Reduced growth storage of germoplasm. pp 11-40. En: J. H. Dodds. (Ed.). *In vitro* methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall. London. 239 p.

- Niedz, R. P. y M. G. Bausher. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. In *Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 38:468-471.
- Nolasco, H., F. Vega-Villasante, H. L. Romero-Schmidt y A. Díaz-Rondero. 1996. The effects of salinity, acidity, light and temperature on the germination of seeds of cardón (*Pachycereus pinglei* (S. Wats.) Britton & Rose, Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 33: 87-94.
- Olalde, P. G. 2001. La familia de las cactáceas. *Gaceta de Coapa*. Julio-agosto: 6.
- Oldfield, S. 1985. The Western European Trade in Cacti and other Succulents. *TRAFFIC Bulletin* 7(3/4): 44-56.
- Olguín, L. P., 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Fac. Ciencias, U.N.A.M. México, D. F. 85 p.
- Ortiz E. B. y V. Toledo. 1998. Tendencias en la deforestación de la selva lacandona (Chiapas México): El caso de las cañadas. *Nov-Dec* 23, 6.
- Ortiz-Montiel, J. G. y R. Alcántara-García. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire)Coulter). *Cact. Suc. Mex.* XLII: 3-6.
- Pare, P. W., C. F. Mischke, R. Edwards, R. A. Dixon, H. A. Norman y T. J. Mabry, 1992. Induction of Phenylpropanoid pathway enzymes in elicitor-treated cultures of *Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry* 31: 149-153.
- Pare, P. W., N. Dmitrieva y T. J. Mabry, 1991. Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspensión culture. *Phytochemistry* 30: 1133-1135.
- Pasqual, M. y E. Hoshika. 1992. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalidium buldiamur* L. e *Mammillaria bocassana* L. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia* 27(4): 589-593.
- Peña, A. y L. Neyra. 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País 1998. Conabio. México. 293 p.

- Pérez-Molphe-Bach, E. y C. A. Dávila-Figueroa, 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *P. Strobiliformis* Wendermann (Cactaceae). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. del R. Morones-Ruíz y H. J. Lizalde-Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant 34: 131-135.
- Pérez-Ponce, J. N. (Ed). 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390 p.
- Poljuha, D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubescic y M. Krsnik-Rasol. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in in vitro culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 117-123.
- Potter, R. L., J. L. Petersen y D. N. Veckert. 1984. Germination responses of *Opuntia* sp. to temperature, scarification, and other seeds treatments. Weed Science 32: 106-110.
- Preece, J. E. y M. E. Compton. 1991. Problems with Explants Exudation in Micropropagation. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 17. High-Tech and Micropropagation I (ed. By Y. P. S. Bajaj). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 168-189.
- Ramírez-Padilla, C. A. y T. Valverde. 2005. Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity. Journal of Arid Environments 61: 333-343.
- Renfroe, M. H., J.T. Hitt, J. P. McNicholas, J. A. Priday and V. B. Delgaiza. 1999. Comparison of laboratory and field *Portulaca* culture establishment techniques. In Vitro - Plant 35(3): 53-A.
- Reyes, J. 1994. Propagación de Cactáceas Mexicanas: una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción: 108-109. En: Encuentro Internacional sobre el Impacto de la Biotecnología en el Desarrollo Sustentable. PROMESUP, OEA.

- Reyes, J. y S. Arias. 1995. Cactáceas de México: Conservación y Producción. *Revista Chapingo* 3: 85-92.
- Robert, M. L. y V. M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 159 p.
- Roberts, E. H. 1972. Dormancy: a factor affecting seed survival in the soil. En Roberts, E. H. (Ed.), *Viability of Seeds*, pp. 321-359. London: Chapman & Hall. 448 pp.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo, 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Broedker). *Cact. Succ. J. (U.S.)* 64(3):116-119.
- Rojas-Aréchiga M., A. Orozco-Segovia y C. Vázquez-Yanes. 1997. Effect on light on germination of seven species of cacto from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. *Journal of Arid Environments* 36:571-578.
- Rojas-Aréchiga, M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
- Rojas-Aréchiga, M., A. Casas y C. Vázquez-Yanes. 2001. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. *Journal of Arid Environments* 49: 279-287.
- Rojas-Aréchiga, M., C. Vázquez-Yanes y A. Orozco-Segovia. 1998. Seed response to temperature of Mexican cacti species from two life forms: and ecophysiological interpretation. *Plant Ecology* 135: 207-214.
- Rosas-López, U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. Grandis (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *Phyton* 213-220. 53 anniversary.
- Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol. Conserv.* 63:163-169.

- Sánchez, G. 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma Cuaresmero. Cact. Suc. Mex. XLII.
- Sandoval, E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 278 p.
- Santos-Díaz, M. del S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. de L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: 480-484.
- Sarukhán J. y R. Dirzo. 2001. Biodiversity-Rich Countries. En Levin S. (Ed.) Enciclopedia de biodiversidad. Volumen 1. Academia Press. U. S. A. 419-436.
- Sass, J. 1958. Botanical microtechnique. The Iowa State University Press. Ames, Iowa. U. S. A. 228 p.
- Semarnat. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, marzo 2002.
- Shie, C. H. y W. H. J. Kuo. 1999. Tetrazolium Test for the Seed of *Carica papaya* L. Seed and Nursery (Taiwan) 1:47-56.
- Smith. R. H. 1991. *In vitro* propagation of *Coryphanta macromeris*. HortScience 26(3): 315.
- Soberón, M. J. y J. Llorente. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). Rev. Soc. Hist. Nat. Vol. Esp. 44:3-17.
- Soh, W-Y y S. S. Bhojwani. 1999. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 520 p.
- Starling, R., 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cact. Suc. J. (US) 57, 114-115.
- Taylor, N. P. 1985. A Kew Magazine Monograph: The Genus *Echinocereus*. The Royal Botanic Gardens, Kew in association with Collingridge. Great Britain. 160 p.

- Tetrazolium Testing Handbook. 2001. Association of official seed analysts. Family: Cactaceae.
- Thorpe, T. A. and Patel, K. R. 1984. Clonal Propagation: Adventitious buds. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.1. Vasil, I.K. (Ed.), Academic Press, New York. pp. 49-60.
- Toledo, V. M., 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 81:17-30.
- Valles, S. C. (Ed.), 1997. Suculentas Mexicanas, Cactáceas. CVS Publicaciones. México, D. F.
- Vázquez-Yanes, C., A. Orozco-Marina Rojas, M. E. Sánchez y V. Cervantes. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemos. Fondo de Cultura Económica, Colección: La ciencia para todos. Vol. 157. 167 p.
- Vyskot, B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*. 59(3): 449-452.
- Walter, L. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer. Austria. 506 p.

Citas de internet

<http://www.cites.org>

<http://www.FAO.org>

<http://www.ppm4plant-tc.com/>

<http://www.sermanat.gob.mx>

APÉNDICE

Apéndice I: Composición del medio Murashige y Skoog (1962).

Componente		MS (g/l)	MS 50% (g/l)
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	1.65	0.825
	KNO ₃	1.9	0.950
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	0.185
	KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
CaCl₂ * 2H₂O		0.44	0.220
Micronutrientes	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689	0.0084445
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	0.0043
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
	KI	0.00083	0.000415
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025	0.000125
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025	0.0000125
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025	0.0000125
FeEDTA	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.0278	0.0139
	Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
Vitaminas	Tiamina	0.0001	0.00005
	Ac. nicotínico	0.0005	0.00025
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.00025
Inositol		0.10	0.5
Glicina		0.002	0.001
Sacarosa o azúcar refinada		30	
Agente gelificante	Agar bacteriológico	8.5	
	Gel rite	5	
	Phytigel	5	

Apéndice II: Preparación de fijador Navashin (Sandoval, 2005).

Solución "A"

Formaldehído (37-40%)	10 ml
Alcohol (96%)	50 ml
Agua destilada	35 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Solución "B"

Formaldehído (37-40%)	30 ml
Agua destilada	70 ml

Las soluciones "A" y "B" se mezclan en el momento de fijar las muestras.

Apéndice III: Preparación de soluciones de alcohol terbutílico (TBA) (Sandoval, 2005).

Proporciones usadas en la preparación de soluciones de TBA, para el proceso de deshidratación en alcoholes graduales.

TBA %	H₂O (ml)	EtOH 95% (ml)	TBA (ml)	EtOH 100% (ml)
30	65	30	5	0
50	50	40	10	0
70	30	50	20	0
85	15	50	35	0
95	0	45	55	0
100	0	0	75	25

Apéndice IV: Preparación de colorante Safranina "O" (IC 50240) (Sandoval, 2005).

Safranina "O"	1 g
Metilcelosolve	50 ml
Alcohol 96%	25 ml
Agua destilada	25 ml
Acetato de sodio	1 g
Formaldehído al 37%	2 ml

Apéndice V: Preparación de colorante Verde rápido FCF (grado reactivo, IC 42053) (Sandoval, 2005).

Solución "A"

Verde rápido	4 g
Alcohol etílico absoluto	75 ml
Metilcelosolve	25 ml

Se disuelve el colorante en el alcohol y se agrega el metilcelosolve

Solución "B"

Alcohol etílico absoluto	25 ml
Aceite de clavo	75 ml

Se mezclan las soluciones "A" y "B" y posteriormente se filtran.