



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN FISIOLÓGICA DE BROTES
REGENERADOS *in vitro* DE *Echinocactus grusonii*
HILDMANN (CACTACEAE), ESPECIE AMENAZADA DE
EXTINCIÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
PRESENTA:

ALMA YADIRA MARTÍNEZ RENDÓN

TUTORA: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA
CO-TUTORA: DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Evaluación fisiológica de brotes regenerados in vitro de Echinocactus grusonii Hildmann (Cactaceae), especie amenazada de extinción”

realizado por **Martínez Rendón Alma Yadira**, con número de cuenta **099214689** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario Dra. Rocío Cruz Ortega

Tutor(a)
Propietario Dra. Ana Laura López Escamilla

Suplente Biól. Laura Patricia Olguín Santos

Suplente
Co-tutora Dra. Margarita Collazo Ortega

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 25 de junio del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le envíe la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones de la Unidad de Enseñanza de Biología sobre el mismo.

UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla y Co-dirección de la Dra. Margarita Collazo Ortega en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller titulado “Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas”.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- ☼ Al proyecto FOMIX-HGO-2005-C01-53 “El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del estado de Hidalgo” por la beca proporcionada para participar como asistente en el proyecto y realizar el presente trabajo.
- ☼ Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por facilitar sus instalaciones y equipo necesario para la realización de este proyecto.
- ☼ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, M. en C. Florencia García Campusano y M. en C. Karina Jiménez Durán, profesoras del Taller “Biología del Desarrollo y Función de las estructuras Reproductoras en Cactáceas”, por sus comentarios y sugerencias.
- ☼ A la Biol. Laura Patricia Olguín Santos, técnico académico de la Unidad de Ambientes Controlados, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las cámaras y el invernadero para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* y *ex vitro*.
- ☼ A la M. en C. Ma. Eugenia Muñoz Díaz de León, técnico académico del Taller de Biología de Plantas I y II, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las instalaciones y equipo necesario para las evaluaciones realizadas en este trabajo.
- ☼ A la Biól. Marisol Rodríguez González y al Laboratorio de Morfofisiología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH por proporcionar el material biológico utilizado en esta investigación.
- ☼ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Rocío Cruz Ortega y Biol. Laura Patricia Olguín Santos, por sus sugerencias y correcciones al trabajo escrito.
- ☼ A la Dra. Ana Laura López Escamilla y Dra. Margarita Collazo Ortega por dirigir este proyecto.
- ☼ A la Dra. Rosa Rodés García de la Universidad de la Habana, al M. en C. José Ricardo Wong y Dra. Clara Ezquivel Huesca del Laboratorio de Desarrollo en Plantas por sus sugerencias y aportaciones durante la realización de este trabajo.

Personales

- ☼ A toda la familia Rendón, que es numerosa, por su paciencia y apoyo incondicional, así como por la esperanza que siempre han tenido en ver destacar a la primera nieta de la familia. En especial a Verónica, Paulina, Mirna, Valeria y Tadeo, gracias por considerarme su orgullo, ya que ustedes son también el mío.
- ☼ A la Dra. María Sol Robledo y la M. en C. Ma. Eugenia Muñiz por ser unas excelentes profesoras y sembrar en mí el interés y la gran pasión que tengo hoy en día por las plantas.
- ☼ A Berenice por ser mi inseparable compañera de trabajo, mi amiga y mi confidente. Por su gran corazón y por hacer esas largas horas de trabajo tan divertidas. A Ivonne por su excepcional apoyo e incomparable amistad, por los jalones de orejas y por los buenos consejos.
- ☼ A Esmeralda, Mariana, Gaby, Dafne, Emma, Bárbara, Miguel, Yadira, Anuar, Rodrigo, Metzli, Claudia, Viridiana, Iván, Lizbeth y Marcos. Por todos esos momentos de fiesta, por compartir gustos y sentimientos, por las largas charlas y por el intercambio de consejos, por ser una parte tan importante de mi vida.
- ☼ A Benjamín, Fernanda, Isabel, Jesús y Memo, por ser tan buenos compañeros y por las divertidas experiencias vividas tanto en el laboratorio como en el campo.
- ☼ A Ana Laura y Mague por el apoyo, en todos los sentidos, que siempre recibí por parte de ambas. Espero nunca haberlas defraudado.

...y a todos los que me faltaron, por que cada uno es una parte esencial de mi formación durante la carrera y de mis experiencias de vida...muchas GRACIAS

***Para mis padres Rita y Salvador,
éste es el resultado de todo su esfuerzo y sacrificio.***

ÍNDICE

Listado de Abreviaturas	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	12
1. Familia Cactaceae: importancia y situación.....	12
2. Estrategias para la conservación de cactáceas.....	12
3. Métodos de propagación vegetal y su aplicación en cactáceas.....	14
A. Propagación convencional en la familia Cactaceae.....	15
B. Propagación por cultivo de tejidos vegetales y sus efectos en aspectos fisiológicos.....	17
C. Efectos fisiológicos y morfológicos de la propagación por CTV en cactáceas.....	21
4. Generalidades e importancia de la especie en estudio.....	27
A. Género <i>Echinocactus</i>	27
B. <i>Echinocactus grusonii</i> Hildmann.....	28
C. Propagación por CTV de <i>Echinocactus grusonii</i> y estudios sobre aspectos fisiológicos.....	30
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. OBJETIVOS	32
1. Objetivo General.....	32
2. Objetivos Particulares.....	32
V. MATERIAL Y MÉTODO	32
1. Material Biológico.....	32
A. Siembra <i>ex vitro</i> (suelo).....	32
B. Siembra <i>in vitro</i>	33
C. Mantenimiento de brotes regenerados y enraizados <i>in vitro</i>	33
2. Evaluaciones Fisiológicas.....	34
A. Tasa de asimilación de CO ₂	34
B. Determinación de ácido málico.....	35
C. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	36
D. Análisis de resultados.....	37

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
1. Germinación <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i>	39
2. Evaluaciones fisiológicas.....	41
A. Tasa de asimilación de CO ₂	41
B. Concentración de ácido málico.....	48
C. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	54
VII. CONCLUSIONES	63
Anexo I. Descripción botánica de <i>Echinocactus grusonii</i> Hildmann.....	65
Anexo II. Formulación de los medios de cultivo MS y MS 50% (Murashige y Skoog, 1962).....	66
Anexo III. Tablas de probabilidad de análisis estadístico de las evaluaciones fisiológicas.....	67
Literatura Citada	69

Listado de Abreviaturas

AIA	Ácido indol-acético
ANA	Ácido naftalenacético
BA ó BAP	Benciladenina ó Bencilaminopurina
AIB	Ácido indol-butírico
CAM	Crassulacean Acid Metabolism (Metabolismo ácido de las crasuláceas)
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
IUCN	International Union for Conservation of Nature (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)
KIN	Kinetina (6-furfurilaminopurina)
2iP	N ⁶ -2-isopentil adenina
PEPC	Fosfoenolpiruvato-carboxilasa
ppm	partes por millón (unidad de concentración molecular)
RUBISCO	Ribulosa Bifosfato Carboxilasa Oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5-bifosfato

RESUMEN

Se evaluaron la tasa de asimilación de CO₂, la concentración de ácido málico y el porcentaje de pigmentos fotosintéticos en brotes regenerados y enraizados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* para conocer el comportamiento metabólico de los mismos durante su aclimatización *in vitro*. Los brotes se obtuvieron a partir de la activación areolar inducida con KIN en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹ y 2iP en las mismas concentraciones por separado, dichos brotes se individualizaron y se transfirieron a MS con 100% y 50% de la concentración de sacarosa. Se emplearon de 2 a 3 brotes enraizados de cada tratamiento hormonal y de ambas concentraciones de sacarosa en el medio para realizar las evaluaciones después de 7 meses de individualización en el caso de los brotes de KIN y de 12 meses para los brotes de 2iP. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA y la de comparación múltiple de datos de Tukey. La tasa de asimilación de CO₂ se vio más influenciada por los tratamientos hormonales previos que por la diferencia en la concentración de sacarosa en el medio, se registraron varios datos negativos lo que significa que hubo difusión de CO₂ del interior del tejido hacia el exterior probablemente por respiración a través de los estomas o a través de la epidermis debido a la delgadez de las cutículas. Los brotes procedentes de los tratamientos de KIN reflejaron una alternancia entre CAM y C₃, mientras que los brotes de 2iP mostraron un metabolismo CAM más definido. En cuanto a la concentración de ácido málico se observó una mayor influencia de la concentración de sacarosa en el medio que de los tratamientos hormonales previos. La cantidad de ácido almacenado en el tejido fue significativamente mayor en los brotes enraizados en 100% de MS que en 50% de MS y las fluctuaciones de ácido málico a través de los periodos del día fueron muy pequeñas, lo que puede interpretarse como un almacenaje de energía extra que será utilizada al momento de la transferencia de los brotes al ambiente *ex vitro*. Finalmente, el porcentaje de pigmentos fue significativamente mayor en los brotes regenerados *in vitro* que en las plántulas del grupo control, principalmente las clorofilas *a* y *b*. La aplicación de citocininas al momento de la inducción de los brotes tiene un efecto a largo plazo en el aumento de la síntesis de pigmentos fotosintéticos aún durante la fase de aclimatización *in vitro*, donde la aplicación de fitohormonas ya es nula. En general, existe un efecto combinado de la concentración de sacarosa en el medio y los tratamientos hormonales previos que actúan de diferente forma en cada uno de los parámetros evaluados, lo que permite determinar que ciertas condiciones medioambientales del cultivo *in vitro* de *Echinocactus grusonii* definen la plasticidad del metabolismo CAM o C₃ y el nivel de síntesis de los pigmentos fotosintéticos.

I. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son plantas nativas y exclusivas del continente americano. Se distribuyen desde Canadá, a una latitud de 56° N, hasta el estrecho de Magallanes en América del Sur a una latitud de 55° S. La gran mayoría, alrededor del 70%, habitan los ecosistemas áridos y semiáridos aunque también podemos encontrar algunas especies en ecosistemas templados húmedos, sólo los ambientes acuáticos no cuentan con la presencia de estas fascinantes plantas (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991; Becerra, 2000). La familia esta conformada aproximadamente por 100 géneros y casi 2000 especies. Actualmente casi todas las especies de la familia Cactaceae en nuestro país se ven severamente amenazadas debido a la destrucción de su hábitat natural y al saqueo inmoderado de ejemplares silvestres. La mayoría se utilizan para alimentación humana o son medicinales, algunas sirven como materia prima de la pequeña industria rural y casi todas son ornamentales (Rubluo, 1990; Becerra, 2000; Scheinvar, 2004). En México, existen alrededor de 52 géneros y 850 especies (cerca del 45% de toda la familia), de las cuales, cerca del 80% (715 especies) son endémicas y el resto son compartidas con el sur de Estados Unidos y con Centro y Sudamérica (Hernández y Godínez, 1994; Becerra, 2000; Benítez y Dávila, 2002). Desafortunadamente, del total de especies presentes en nuestro país, 279 (39%) se encuentran bajo alguna categoría de riesgo en la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002).

La propagación de estas plantas es de vital importancia para evitar su completa desaparición en la naturaleza. En la actualidad existen dos medios por los que se lleva a cabo la propagación, tanto vegetativa como sexual, de la gran mayoría de especies de cactáceas y de muchas otras especies pertenecientes a otras familias: la propagación tradicional o convencional y el cultivo de tejidos vegetales.

Desde la década de los 70 el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) representa una alternativa de propagación viable, ya que permite la producción rápida y continua de cientos de plantas libres de patógenos, cultivadas en un medio estéril rico en nutrientes básicos, promotores de crecimiento y una fuente de carbono artificial (Evans, 1990; Rubluo, 1990; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Malda *et al.*, 1999a; Seelye *et al.*, 2003; Razdan, 2003). Esta técnica se ha aplicado ya en más de 35 especies de cactáceas representantes de 20 géneros (Pérez-Molphe-

Balch *et al.*, 1998; Santos-Díaz *et al.*, 2003). Por lo general, y con el fin de conservar la variabilidad genética de las poblaciones, la micropropagación de cactáceas se lleva a cabo a partir de la germinación de semillas *in vitro*, ya que se han observado porcentajes de germinación más altos que los que se obtienen por propagación convencional (Fay y Gratton, 1992; Fay, 1994; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Sin embargo, las condiciones ambientales en las que se mantiene a las plantas mediante el CTV les provocan cambios importantes en sus características morfológicas y fisiológicas que influyen en el establecimiento *ex vitro* de los brotes regenerados después de un periodo de aclimatización (Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecěk *et al.*, 2001; Premkumar *et al.*, 2001; Seelye *et al.*, 2003; Hazarika, 2003). Particularmente, el conocer aspectos fisiológicos de plantas obtenidas por CTV proporciona elementos importantes para el manejo de su cultivo con fines comerciales o de conservación, mejorando la capacidad fotosintética, reduciendo el tiempo de aclimatización y aumentando la sobrevivencia de los brotes regenerados por esta técnica.

Se seleccionó como modelo a la especie *Echinocactus grusonii*, catalogada en la categoría “en peligro de extinción” (P) por la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) para obtener información de la influencia que tiene el CTV, particularmente el tratamiento hormonal aplicado para la proliferación de brotes, así como la concentración de sacarosa en el medio durante la fase de individualización, enraizamiento y aclimatización en el metabolismo fotosintético, por medio de la determinación de la concentración de pigmentos, de ácido málico y la tasa de asimilación de CO₂.

II. ANTECEDENTES

1. Familia Cactaceae: importancia y situación

Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal por poseer ciertas características ecológicas que las hacen, quizá, las más vulnerables a las perturbaciones de su ambiente como la restringida distribución geográfica de un gran número de especies, su prolongado ciclo de vida y las bajísimas tasas de crecimiento de cada individuo; además de que algunas dependen de polinizadores especializados y varios agentes dispersores de semillas para asegurar su éxito reproductivo (Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006). Las poblaciones naturales de la mayoría de las especies son afectadas por las diversas actividades humanas, como la destrucción del hábitat debido a la conversión de terrenos para usos agrícolas, pecuarios o incluso industriales, así como la extracción de plantas de su hábitat, por su particular belleza, para su venta ilegal la mayoría de las veces, como plantas de ornato en mercados nacionales e internacionales, especialmente a Estados Unidos, Japón y varios países europeos. De esta forma han sido destruidas poblaciones completas de estas extraordinarias plantas o el número de individuos de algunas especies se ha reducido drásticamente (Rubluo, 1990; Hernández y Godínez, 1994; Becerra, 2000; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Anderson, 2001; Mandujano *et al.*, 2002; Benítez y Dávila, 2002).

2. Estrategias para la conservación de cactáceas

Tomando en cuenta la situación crítica de la familia Cactaceae, algunos de los países con la más alta diversidad de especies, como México, han implementado acciones de conservación como el decreto de áreas naturales protegidas así como la inclusión de las especies con alto grado de amenaza o en peligro de extinción en listados especiales con el fin de definir su estado de conservación (Hernández y Godínez, 1994; Anderson, 2001; Arias *et al.*, 2005). Tal es el caso de la Norma Oficial Mexicana en su apartado de Protección Ambiental cuyo listado de especies amenazadas están definidas con base en un método de evaluación de riesgo de extinción (MER) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) que consideran dentro de sus categorías varias especies de cactáceas pertenecientes

a los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epiphyllum*, *Escobaria*, *Lophophora*, *Mammillaria* y *Turbincarpus* (SEMARNAT, 2002).

Por otro lado, la Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) se encarga de establecer un marco legal internacional para la prevención del comercio de especies amenazadas y su regulación, en algunos casos llega a prohibir su colecta y comercio nacional e internacional (Arias *et al.*, 2005). Aproximadamente 50 representantes de los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphantha*, *Discocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecypora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus*, *Turbincarpus* y *Uebelmannia* se ubican dentro del Apéndice I de la convención, lo que significa que se encuentran en grave peligro de extinción y por lo mismo está prohibida la colecta de individuos y semillas, salvo en casos excepcionales como el intercambio científico o ejemplares propagados artificialmente en viveros registrados ante la secretaría de la CITES con fines no comerciales. Mientras que el resto de la familia fue incluida en el Apéndice II donde se especifica que las especies pueden llegar a estar amenazadas si no se regula su comercio, el cuál requiere de un permiso de exportación emitido por la SEMARNAT tanto para ejemplares silvestres como para plantas propagadas en viveros (CITES, 1995; Becerra, 2000; Scheinvar, 2004).

Especialmente en México, la protección oficial de las cactáceas como recurso natural tiene cerca de 66 años y en este tiempo instancias federales, estatales, municipales, organizaciones no gubernamentales, académicos y amantes de las cactáceas han colaborado para perfeccionar un marco teórico y práctico para conservar y aprovechar estos recursos. Algunos investigadores se han dado a la tarea de estudiar la distribución y biología de las cactáceas, al mismo tiempo que se han creado centros de propagación y distribución de estas plantas como una medida que ayude a disminuir la presión sobre las poblaciones naturales (Becerra, 2000; Benítez y Dávila, 2002; Bárcenas, 2006).

3. Métodos de propagación vegetal y su aplicación en cactáceas

Todos los estudios de propagación constituyen una opción muy importante que se suma a las arduas labores de conservación de esta familia, ya que garantizan la posibilidad de obtener especies de gran valor a través de métodos artificiales que podrían disminuir considerablemente la alta demanda de especímenes silvestres (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

En la naturaleza, la propagación vegetal se lleva a cabo por dos vías, la *asexual* o *vegetativa* en la que sólo se producen clones de la planta madre y la *sexual* que involucra recombinación y variabilidad genética a través de la producción de semillas (Razdan, 2003).

Ambas vías de propagación, se pueden llevar a cabo en condiciones ambientales controladas ya sea en invernadero o en un laboratorio, principalmente de dos maneras, convencionalmente y por cultivo de tejidos vegetales. La gran diferencia entre ambas técnicas es que la propagación convencional se realiza bajo condiciones sépticas, es decir al aire libre, mientras que la propagación por cultivo de tejidos vegetales ocurre estrictamente en condiciones asépticas.

La propagación vegetativa es el método más importante utilizado para la producción comercial de muchas especies ornamentales, frutales, forestales y agrícolas en general; la formación de raíces adventicias es el proceso que asegura el éxito de este tipo de propagación. Por otro lado, la propagación por semilla precisa del conocimiento de los requerimientos de cada tipo de semilla, así como de un manejo cuidadoso de las condiciones de germinación como el suministro de agua, la temperatura adecuada y el control de luz hasta que las plántulas logren establecerse (Hartmann *et al.*, 1997). Según Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000) se conoce muy poco acerca de los requerimientos para la germinación en cactáceas, principalmente con respecto a la longevidad y viabilidad de las semillas, sin embargo, los diversos estudios que se han realizado y que se vayan realizando sobre la germinación y establecimiento de plántulas sirven como una importante herramienta para la comprensión de las estrategias reproductivas en la naturaleza y para las diferentes estrategias en la propagación artificial.

A. Propagación convencional en la familia Cactaceae

Esta forma de propagación representa una alternativa viable para los países que carecen de tecnologías y recursos económicos para el aprovechamiento comercial de sus recursos naturales como son las cactáceas y otras plantas suculentas. Debido a su bajo costo, se ajusta a las necesidades de nuestro país, en dónde no existen grandes laboratorios que produzcan comercialmente estas plantas con potencial ornamental. En las áreas rurales de México estos métodos se han aplicado con fines de aprovechamiento por los campesinos y de esta manera también se protege la estabilidad de las poblaciones naturales de cactáceas al reducir significativamente la colecta de ejemplares silvestres (Reyes *et al.*, 2006).

La propagación sexual es muy importante porque la mayoría de las cactáceas y suculentas producen una gran cantidad de semillas y por lo tanto permite la obtención de plantas con variación genética (Reyes *et al.*, 2006). Se lleva a cabo colocando las semillas en el sustrato saturado de humedad previamente desinfectadas con una solución de cloro en baja concentración (0.6%) y perfectamente enjuagadas. Además se recomienda el uso de algún fungicida aplicado tanto a las semillas como al sustrato para evitar la proliferación de hongos. El recipiente se mantiene cerrado herméticamente para que la humedad circule sin evaporarse creando un microambiente adecuado para la germinación y desarrollo temprano de las plántulas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

En cuanto a la propagación vegetativa, ésta se efectúa desprendiendo alguna parte de la planta madre, la cual puede formar raíces y establecerse como una planta independiente. Una ventaja importante de este tipo de propagación es la posibilidad de producir individuos nuevos más rápido que en la propagación sexual (Arias *et al.*, 2001). Algunas técnicas comunes de este tipo de propagación son:

- Esquejes: esta técnica se conoce también como estacado y consiste en la producción de nuevos individuos a partir de las ramificaciones de la propia planta. Estas ramificaciones se separan de la planta madre, deben cicatrizar en un lugar seco para que posteriormente formen raíces y sean plantados. Este método es útil en nopales, órganos y epífitas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Arias *et al.*, 2001).

- Vástagos: son brotes que emergen de las aréolas de la planta madre que son desprendidos y una vez cicatrizada la herida pueden formar raíces y plantarse individualmente. Para evitar la proliferación de hongos y bacterias se esparce azufre en polvo sobre la herida antes de que los brotes sean sembrados. Se utiliza comúnmente en formas globosas que forman clones como *Mammillaria*, *Coryphantha* o *Notocactus*, entre otras, incluso, es el mecanismo de propagación utilizado para el cultivo de maguey con fines comerciales (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Arias *et al.*, 2001). La ventaja de este método es la rápida obtención de plantas adultas y la desventaja consiste en la carencia total de recombinaciones genéticas, importante en la conservación (Reyes *et al.*, 2006).
- Injertos: esta técnica se emplea para acelerar el crecimiento de plántulas y vástagos cuando han perdido su sistema radicular. Básicamente se conectan directamente los sistemas vasculares de un injerto con el portainjerto o patrón para que éste proporcione los nutrientes necesarios para el desarrollo y rápido crecimiento del primero (Hartmann *et al.*, 1997). En cactáceas esta técnica se aplica más comúnmente en especies raras o en peligro de extinción que poseen características muy particulares o que tienen dificultad para crecer directamente en el suelo, ya sea con un fin ornamental o en el caso de plantas obtenidas con alguno de los métodos arriba mencionados pero que no lograron desarrollar raíces. Las especies más utilizadas como patrón o portainjerto son *Pereskopsis diguetii*, *Myrtillocactus geometrizans* e *Hylocereus* spp (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Reyes *et al.*, 2006). En Japón, estos injertos son producidos en grandes cantidades y vendidos al por mayor a viveros de otros países (Hartmann *et al.*, 1997).

Las plantas se mantienen en un ambiente semejante al de su hábitat natural, con riegos esporádicos para evitar la descomposición del tejido por exceso de humedad y una circulación constante de aire seco en el caso de especies desérticas, o con un riego constante en el caso de las especies epífitas. La temperatura en estas condiciones artificiales, generalmente establecidas en invernaderos, oscila entre 25° a

35°C y la intensidad luminosa es alta aunque también debe ser controlada para evitar la fotoinhibición, los rayos UV les son favorables; es muy importante la orientación del invernadero ya que la luz que reciban estas plantas debe proceder del sureste, no del norte. En cuanto al sustrato, generalmente se trata de una mezcla de sustrato humoso y mineral (piedras de río, grava, tezontle o tepojal) en una proporción 1:1 ó 1:2 respectivamente (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

B. Propagación por cultivo de tejidos vegetales y sus efectos en aspectos fisiológicos.

El CTV propone una alternativa eficaz para la propagación en un periodo más corto que el requerido en la naturaleza o por el método convencional, con la producción de un gran número de plantas desde un solo individuo o un fragmento del mismo (Rubluo, 1990). En un periodo de 6 meses es factible obtener más de 1 millón de propágulos e incluso plantas completas a partir de un solo explante (Phillips y Hubstenberger, 1995). El CTV se basa en el principio de la totipotencialidad celular y se refiere primordialmente a la inducción de la regeneración adventicia (a partir de meristemas) o *de novo* (a partir de callo o cultivo de células) de cualquier estructura de la planta para formar eventualmente plantas completas (Razdan, 2003). A pesar de que este método de propagación tiene varias ventajas con respecto a la propagación convencional, como la producción masiva de plantas genéticamente estables y el aumento de las tasas de germinación y crecimiento, también existen ciertas desventajas que deben considerarse cuando se planea crear un proyecto ya sea con fines comerciales o de conservación como son la reducción de la variabilidad genética por la alta producción de clones y los altos costos de infraestructura (Collin y Edwards, 1998; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

La propagación por CTV o micropropagación se divide en 5 etapas (Evans, 1990; Phillips y Hubstenberger, 1995; Phillips *et al.*, 1995; Collin y Edwards, 1998; Razdan, 2003):

Etapas 0. Selección del material vegetal, mantenimiento de las plantas madre que serán la fuente de explantes. De esta manera se asegura que la planta madre se encuentra libre de patógenos.

Etapas I. Inicio del cultivo aséptico. A partir de la planta madre se obtienen explantes, los cuales se desinfectan y lavan superficialmente, posteriormente se establecen en un medio de cultivo adecuado. En cactáceas generalmente se utilizan plántulas provenientes de la germinación de semillas *in vitro*. En todos los casos se utilizan reguladores de crecimiento para la inducción y formación de brotes o embriones somáticos.

Etapas II. Multiplicación de los brotes o de los embriones somáticos utilizando un medio de cultivo específico.

Etapas III. Germinación de los embriones somáticos o enraizamiento de los brotes regenerados *in vitro*. En algunos casos los brotes se transfieren directamente a un sustrato *ex vitro* para la formación de raíces y en otros los brotes son transferidos a medio de cultivo sin hormonas, las raíces se pueden formar espontáneamente o se añade una auxina para promover la rizogénesis.

Etapas IV. Transferencia de las plántulas a suelo esterilizado para la aclimatización en un ambiente controlado (invernadero). Esta etapa es la más crítica pues define el éxito o el fracaso de todo el método en cuanto a productividad.

La micropropagación resulta exitosa sólo cuando los brotes producidos *in vitro* muestran un alto porcentaje de sobrevivencia al ser transferidos a un medio *ex vitro*, lo cual no siempre ocurre. Esto se debe a que los brotes son expuestos al estrés provocado por el fuerte cambio ambiental que existe de un medio a otro. En cultivo *in vitro*, la humedad relativa y la concentración de gases en el medio es mucho mayor que en condiciones *ex vitro*, debido a que las plantas se mantienen en un ambiente completamente cerrado dentro de los frascos de cultivo, lo que impide el flujo de aire entre el ambiente interno y el exterior. Además, las lámparas utilizadas en los cuartos de incubación proporcionan una intensidad de luz muy baja comparada con la alta incidencia presente en un invernadero. Otro aspecto importante es el potencial hídrico del sustrato, que es más bajo en condiciones *in vitro* que *ex vitro* debido a la alta concentración de solutos (reguladores de crecimiento y sacarosa) agregados al medio de cultivo (Tabla 1) (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994; Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecek *et al.*, 2001; Premkumar *et al.*, 2001; Seelye *et al.*, 2003; Hazarika, 2003).

Tabla 1. Condiciones ambientales y nutricionales que prevalecen en los cultivos *in vitro* y condiciones ambientales y nutricionales *ex vitro* a las que son transferidos.

CONDICIONES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES	<i>In vitro</i> (Condiciones asépticas)	<i>Ex vitro</i> (Condiciones sépticas)	Referencia
Humedad relativa	Alta (90-100%)	Baja (30-60%)	Hazarika, 2003
Intensidad de luz	Baja (40-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Alta (200-1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Kadlecek <i>et al.</i> , 2001; Premkumar <i>et al.</i> , 2001
Concentración de gases como CO ₂ y etileno	Alta (0.1-1.2% de CO ₂ y 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno)	Baja (0.0035% de CO ₂ y 0.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno)	Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994
Flujo de gases	Limitado o nulo	Dinámico	Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994
Potencial hídrico del sustrato	Bajo (-0.7 a -1.5 MPa)	Alto (-0.1 a -0.5 MPa)	Pospíšilová <i>et al.</i> , 1999; Seelye <i>et al.</i> , 2003
Concentración de sacarosa y reguladores de crecimiento en el sustrato	Alta (30 g L ⁻¹ de sacarosa y de 0.1 hasta 10 mg L ⁻¹ de fitohormonas)	Nula	Premkumar <i>et al.</i> , 2001; Hazarika, 2003

Diversas investigaciones han demostrado que las condiciones a las que están sometidas las plantas cultivadas *in vitro* les provocan grandes cambios en sus características morfológicas, anatómicas y fisiológicas, lo cual impacta mucho en el índice de sobrevivencia que se alcance al momento de transferirlas al medio *ex vitro* (Phillips *et al.*, 1995; Yao-Hong *et al.*, 2005).

La alta humedad relativa (90-100%) promueve una disfuncionalidad de los estomas ya que no es necesario un control de la pérdida de agua, además, la deficiente síntesis de ceras epicuticulares induce el desarrollo de cutículas muy delgadas, lo cual provoca una alta tasa de desecación al transferir las plantas a condiciones *ex vitro*. El mesófilo de las hojas y en general el tejido fotosintético no está bien diferenciado, por lo que la fotosíntesis no se lleva a cabo adecuadamente, además la alta incidencia de luz en condiciones *ex vitro* puede provocar fotoinhibición en las plántulas (Pospíšilová *et al.*, 1999; Razdan, 2003).

Por otra parte, el limitado o nulo flujo de gases dentro de los frascos y el restringido movimiento de solutos en el medio de cultivo produce una falta de oxígeno en las raíces a la cuál las plantas responden produciendo una alta concentración de etileno, este gas desencadena una serie de reacciones que junto con la alta humedad relativa provocan el fenómeno de hiperhidricidad, éste se manifiesta en un tejido muy

turgente por el exceso de agua almacenada en el mismo, cuyas paredes celulares carecen de los elementos esenciales para su formación (celulosa y lignina) poco sintetizados o degradados por algunas enzimas activadas por el etileno (Ziv, 1991; Fay, 1994; Pospíšilová *et al.*, 1999; Kadlecěk *et al.*, 2001; Premkumar *et al.*, 2001; Seelye *et al.*, 2003). Este fenómeno además influye en la eficiencia fotosintética, pues se ha observado que en plantas hiperhidratadas la estructura de los cloroplastos es defectuosa y el contenido de clorofila es muy bajo, por lo tanto la tasa fotosintética es menor (Kevers *et al.*, 2004).

Los bajos niveles de actividad fotosintética también son consecuencia de la adición de sacarosa en el medio de cultivo ya que las plantas se hacen dependientes de una fuente de carbono artificial y no llevan a cabo correctamente las vías metabólicas encargadas de realizar la fotosíntesis (Roberts *et al.*, 1990).

Se han encontrado bajas concentraciones de clorofila y escasa actividad de la RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa) en tejido proveniente de plantas cultivadas *in vitro*, lo que hace difícil la sobrevivencia de dichas plantas al momento de transferirlas a suelo. Esta enzima, al ser la catalizadora de la carboxilación del CO₂ y el principal almacén de proteína en el tejido, juega un papel muy importante en la superación de la etapa crítica de la aclimatización: el cambio de conducta metabólica de mixotrófica a autotrófica (Premkumar *et al.*, 2001).

Para tratar de controlar estos efectos morfológicos y fisiológicos provocados por el CTV, es necesario considerar un periodo de *aclimatización* entre las últimas dos etapas de la micropropagación, en el que se van modificando gradualmente ciertas condiciones en el medio *in vitro* con el fin de que las plantas se vean obligadas a cambiar su condición mixotrófica por una condición autótrofa y se hagan más resistentes al cambio de ambiente tan drástico al que se ven sometidas.

Para comprender las diversas estrategias que se siguen para modificar determinados factores del cultivo *in vitro* y mejorar las características de las plántulas que serán transferidas a suelo *ex vitro*, es necesario conocer más acerca de las cualidades morfológicas y anatómicas de los brotes regenerados y mantenidos en condiciones *in vitro*.

C. Efectos fisiológicos y morfológicos de la propagación por CTV en cactáceas

Los cambios morfológicos y fisiológicos provocados por el CTV se han estudiado más frecuentemente en plantas que poseen un metabolismo fotosintético C₃ o C₄, mientras que las cactáceas poseen un metabolismo CAM y por lo tanto responden de manera distinta en ciertos aspectos, principalmente fisiológicos (Malda *et al.*, 1999a). Aunque hay que considerar que las plántulas de la subfamilia Cactoideae poseen metabolismo C₃ durante las primeras semanas después de la germinación, posteriormente, entre 70 y 140 días de edad cambian su metabolismo a CAM. Esta particularidad les permite enraizar y crecer rápidamente para asegurar su establecimiento e incrementar su sobrevivencia en el medio natural (Altesor *et al.*, 1992). Es muy posible, entonces, que los brotes enraizados obtenidos por medio de CTV también presenten esta característica metabólica.

El metabolismo CAM le confiere a las plantas un mecanismo ahorrador de agua por el eficiente control de la transpiración debido a la regulación del cierre y apertura de los estomas y un mecanismo concentrador de CO₂ por la capacidad que tienen de fijarlo durante la noche y almacenarlo en las vacuolas, principalmente en forma de ácido málico, el cual durante el día se descarboxila y el CO₂ se incorpora al ciclo de Calvin-Benson y es reducido a carbohidratos esenciales para el crecimiento (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2006) (Figura 1).

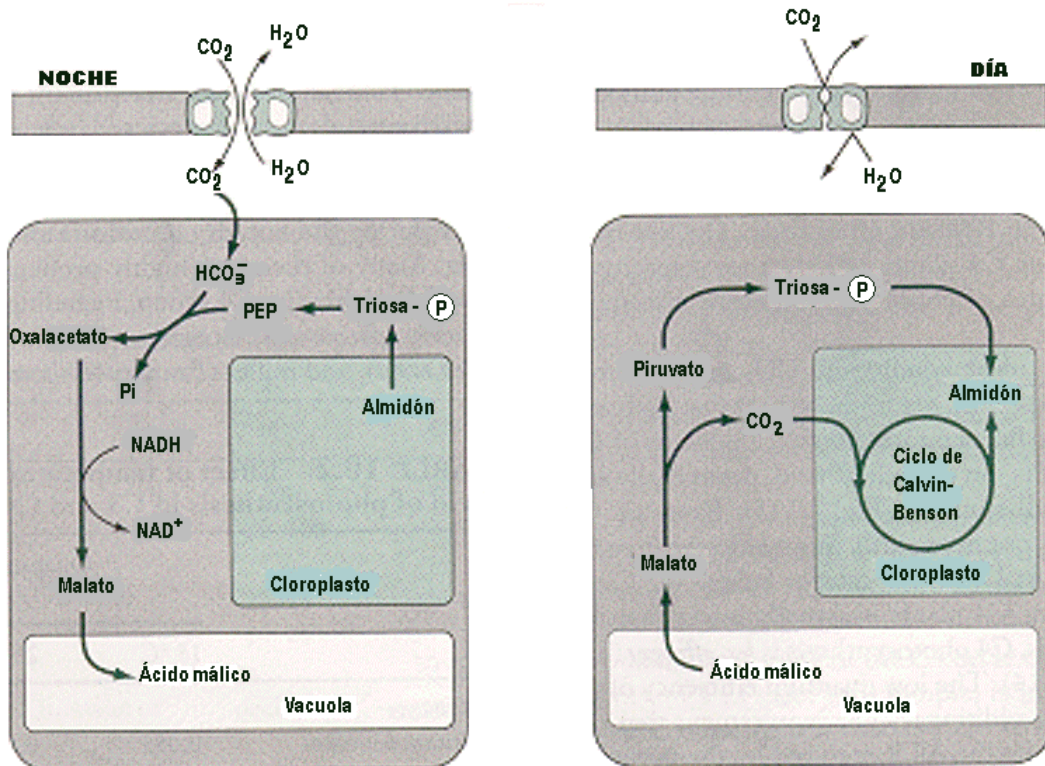


Figura 1. Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM). Tomada y modificada de Hopkins (2004).

Este tipo de metabolismo del carbono le confiere a la planta una estructura suculenta por la alta eficiencia del uso del agua debido al control del cierre y apertura de estomas con el fin de reducir al máximo la transpiración (Hopkins, 2004) (Figura 2).

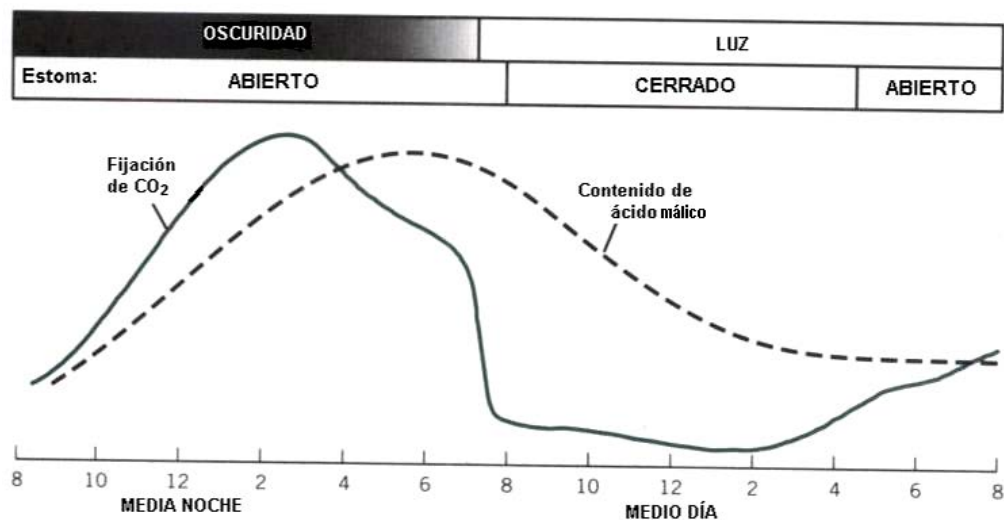


Figura 2. Relación del control cierre-apertura estomático, la fijación de CO_2 y el contenido de ácido málico en el metabolismo CAM. Tomada y modificada de Hopkins (2004).

Este metabolismo se encuentra sujeto a la creencia de que todas las especies que lo exhiben fijan CO₂ atmosférico exclusivamente de noche mientras los estomas permanecen abiertos. Aunque esto es cierto para algunas plantas, la flexibilidad del CAM involucra un espectro de respuestas mucho más amplio, que va desde extremos en los que no se fija CO₂ en 24 horas, hasta la asimilación continua de CO₂ durante el mismo periodo. Esta plasticidad está íntimamente ligada al medio ambiente, y puede ser modificada o perturbada por la temperatura, la intensidad de luz, el estatus nutricional, la humedad ambiental relativa y la disponibilidad de agua (Geydan y Melgarejo, 2005; Taiz y Zeiger, 2006).

De acuerdo a los aspectos que definen el metabolismo CAM, tales como el comportamiento estomático, las fluctuaciones de ácido málico, la acumulación de carbohidratos almacenados y la actividad de las enzimas PEPC (fosfoenolpiruvato-carboxilasa) y Rubisco, se ha definido un patrón de cuatro fases, en las que se describen sus principales atributos bioquímicos y fisiológicos (Cushman y Bohnert, 1997; Cushman, 2001; Geydan y Melgarejo, 2005) (Figura 3):

Fase I. Ocurre la asimilación nocturna (de las 20 h hasta antes de las 8 h) de CO₂ atmosférico y respiratorio por la acción de la PEPC para formar ácido málico acumulado en las vacuolas. Los estomas permanecen abiertos y no hay síntesis de carbohidratos.

Fase II. Al inicio del periodo de luz (8 a 12 h) las acciones combinadas de PEPC y Rubisco resultan en una repentina asimilación de CO₂.

Fase III. Removilización y descarboxilación diurna (12 a 16 h) del ácido málico almacenado en la vacuola. El CO₂ es asimilado en el ciclo de Calvin-Benson a través de la Rubisco, se induce el cierre estomático.

Fase IV. Hacia el final del periodo de luz (16 a 20 h), la PEPC puede ser catalíticamente activa, pero no tiene una contribución significativa en la formación de malato, por lo que los estomas se abren para la toma directa de CO₂ hacia el ciclo de Calvin cuando el acervo de ácido málico en la vacuola se agota.

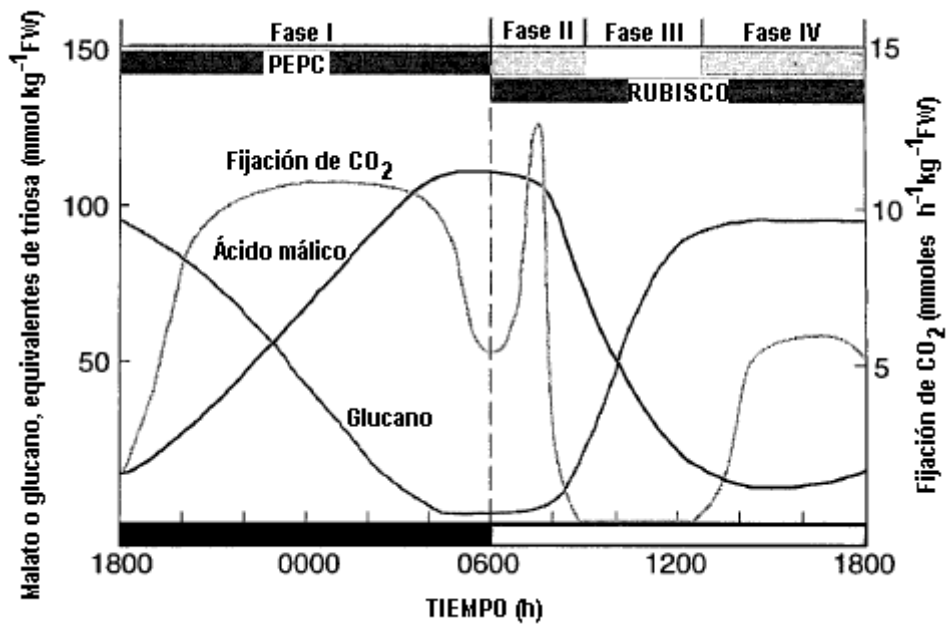


Figura 3. Ciclo de la fotosíntesis CAM. El ciclo día-noche de la vía CAM que se lleva a cabo en las células del mesófilo de una planta típica con este tipo de fotosíntesis se divide en cuatro fases distintas. Tomada y modificada de Cushman y Bohnert, 1997.

Garrido (1998) realizó el primer estudio *in vitro* relacionado con el metabolismo CAM en *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* (Cactaceae) evaluando la acidez titulable, el intercambio de CO₂ y el nivel de estrés hídrico a través de la concentración de prolina, proteínas solubles y clorofila. El autor encontró que la concentración de acidez fue comparativamente mayor a la asimilación de CO₂ lo que indica un reciclamiento de éste. Contrario a todas las investigaciones que demuestran que las condiciones del cultivo *in vitro* provocan una disminución o pérdida de la actividad fotosintética, este trabajo comprueba que las tres especies de cactáceas se desarrollaron de manera autotrófica con una alta tasa fotosintética a pesar de contar con el suministro de la fuente de carbono externa en el medio de cultivo. Específicamente en *Chamaecereus silvestrii* observaron que las plántulas *in vitro* se encontraban en condiciones estresantes (bajo potencial hídrico del medio y alta humedad relativa fueron las condiciones consideradas en este trabajo) que les impedía crecer rápidamente, pero que la vía CAM se potenció en respuesta al cambio de

ambiente durante la aclimatización en suelo, aumentando la tasa fotosintética (Garrido y Montiel, 1999).

Por otra parte, Malda *et al.* (1999a) al propagar por cultivo de tejidos plantas de *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*, observaron que el metabolismo CAM tenía una gran plasticidad al acoplarse a las condiciones del ambiente *in vitro* y a las condiciones del ambiente *ex vitro* después de la aclimatización. Observaron una tasa de crecimiento acelerado durante la propagación de brotes *in vitro* debido principalmente a la constante absorción de CO₂ dentro de los frascos de cultivo, incluso en *C. minima* hubo absorción de CO₂ durante el día, lo que indica una alternancia entre el metabolismo C₃ y CAM. Pero al momento de transferir las plantas a invernadero, la tasa de asimilación de CO₂ y la transpiración disminuyeron notablemente, lo que a su vez redujo la capacidad fotosintética pero aumentó la probabilidad de sobrevivencia de las plántulas (Malda *et al.*, 1999b).

Anicua y Rivas (2000) también han contribuido evaluando el estatus metabólico *in vitro* de *Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*; aunque en este último lo efectuaron en tejido desorganizado o callo ya que fue la única respuesta morfogénica que obtuvieron. Estimaron la concentración de proteínas solubles y de la pared celular, la actividad de invertasas y peroxidasas, la concentración de clorofilas, la acidez titulable y la asimilación de CO₂; los niveles de cada parámetro fueron más elevados en tejido de plantas *in vivo* que en tejido de brotes regenerados *in vitro*, en los que la actividad metabólica fue principalmente de tipo C₃ comparada con la actividad CAM bien definida en plantas *in vivo*. Esta respuesta fue atribuida principalmente al estrés hídrico, a la falta de iluminación y al efecto de las citocininas adicionadas al medio.

Finalmente, Rosas (2002) evaluó las tasas de intercambio de CO₂ y de vapor de agua en plántulas de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* obtenidas a partir de la germinación *in vitro* y sometidas a condiciones de estrés hídrico en medio MS 50% líquido adicionado con manitol como agente osmótico causante del estrés. Demostró que las plántulas presentaron una alternancia entre el metabolismo

fotosintético C₃ y CAM hasta los 100 días de edad, además de que el estrés hídrico no fue determinante para modificar significativamente las tasas de intercambio de CO₂ y de vapor de agua. Sólo en las plántulas de *P. chichipe* observó una correlación significativa entre ambos parámetros evaluados.

A pesar de que la succulencia y la gran plasticidad del metabolismo fotosintético confieren una mayor posibilidad de sobrevivencia durante la aclimatización de cactáceas cultivadas *in vitro*, existen casos en los que las plántulas no responden favorablemente al cambio y establecimiento *ex vitro*. Por ejemplo, Tapia (2006) propagó *Cephalocereus senilis* y a pesar de que produjo de 7 a 11 brotes por explante, cuando las plántulas fueron transferidas a invernadero se deshidrataron rápidamente, su tejido se hizo flácido y fueron susceptibles a daños por insectos. Para lograr una mayor sobrevivencia y mejorar el éxito de la micropropagación de esta especie, aplicó una estrategia de aclimatización *in vitro* en la cuál colocó los brotes en medio líquido a la mitad de sus componentes (nutrientes y sacarosa) con puentes de papel filtro para inducir la elongación de los mismos y tratar de convertir su condición mixótrofa a autótrofa. Posteriormente usó tapas perforadas y cubiertas con cinta microporo para reducir gradualmente la humedad relativa *in vitro*, así la fisiología estomática y la producción de ceras epicuticulares probablemente se podrían activar y aumentar la resistencia al momento de sacar las plántulas al medio *ex vitro*. De esta forma logró obtener hasta el 56% de sobrevivencia *ex vitro*.

Existen otras estrategias de aclimatización que también han resultado exitosas para el establecimiento *ex vitro* de plantas propagadas *in vitro*, como la aplicación de paclobutrazol, compuesto que retrasa el crecimiento y mejora la actividad estomática, incrementa la deposición de ceras epicuticulares y la concentración de clorofila por unidad de área, optimiza la diferenciación del mesófilo y reduce el marchitamiento durante el estrés hídrico (Hazarika, 2003). En cuanto a la hiperhidratación, ésta se puede controlar disminuyendo las concentraciones de amonio (NH₄⁺), citocininas y el potencial hídrico del medio al utilizarlo con la mitad de sus componentes, la humedad relativa y la producción de etileno se controlan colocando tapas perforadas para permitir el flujo de gases (Roberts *et al.*, 1990). Suprimiendo gradualmente la concentración de sacarosa en el medio, se aumenta el nivel de CO₂ circundante (a 350

ppm), con una alta intensidad de luz ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se reduce la humedad relativa y se promueve tanto el crecimiento como la actividad fotoautotrófica de las plantas, las cuales, al ser transferidas al ambiente *ex vitro* pueden sobrevivir hasta en un 96% (Hazarika, 2003; Razdan, 2003; Seelye *et al.*, 2003).

4. Generalidades e importancia de la especie en estudio

A. Género *Echinocactus*

El género *Echinocactus* según Barthlott y Hunt (1993) (citado en Scheinvar, 2004) es uno de los más primitivos de la tribu Cactaeae, la más diversa de la subfamilia Cactoideae que, a su vez, es la más derivada de la familia Cactaceae. Las características morfológicas distintivas de este género son la forma globosa a cilíndrica de las plantas de gran tamaño cuyo ápice está provisto de una densa masa lanosa (Scheinvar, 2004). Los representantes de este género se conocen comúnmente como “cactus barril” o “asiento de suegra” y se consideran los más representativos de los desiertos Norteamericanos (Anderson, 2001).

Este género se encuentra en las tres principales zonas áridas de México: la Queretano-Hidalguense, la Chihuahuense y la Sonorense (Scheinvar, 2004). Guzmán *et al.* (2003) definen la distribución de las seis especies consideradas para el género, las cuáles también son descritas por Anderson (2001) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies y distribución en México del género *Echinocactus*.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	DISTRIBUCIÓN
<i>Echinocactus grusonii</i> Hildm.	Barril dorado	Querétaro e Hidalgo
<i>Echinocactus horizonthalonius</i> Lem.	Barril azul, cabeza de diablo, biznaga meloncillo	Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas
<i>Echinocactus parryi</i> Engelm.	-	Chihuahua
<i>Echinocactus platyacanthus</i> Link y Otto*	Barril gigante, biznaga de dulce, asiento de suegra	Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas
<i>Echinocactus polycephalus</i> Engelm. y Bigelow	Biznaga de chilitos, barril de muchas cabezas	Sonora
<i>Echinocactus texensis</i> Hopffer	Cactus dulce, cabeza de diablo, mancacaballo	Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas

*Especie tipo

B. *Echinocactus grusonii* Hildmann

Echinocactus grusonii, llamada comúnmente “barril dorado” o “biznaga tonel dorada”, es una especie endémica de los estados de Hidalgo y Querétaro. Se distribuye en las localidades del Cañón del Infiernillo, Barranca del Río Moctezuma y Cadereyta en Querétaro, extendiéndose hasta el municipio de Zimapán en Hidalgo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Guzmán *et al.*, 2003; Scheinvar, 2004) (Figura 4).

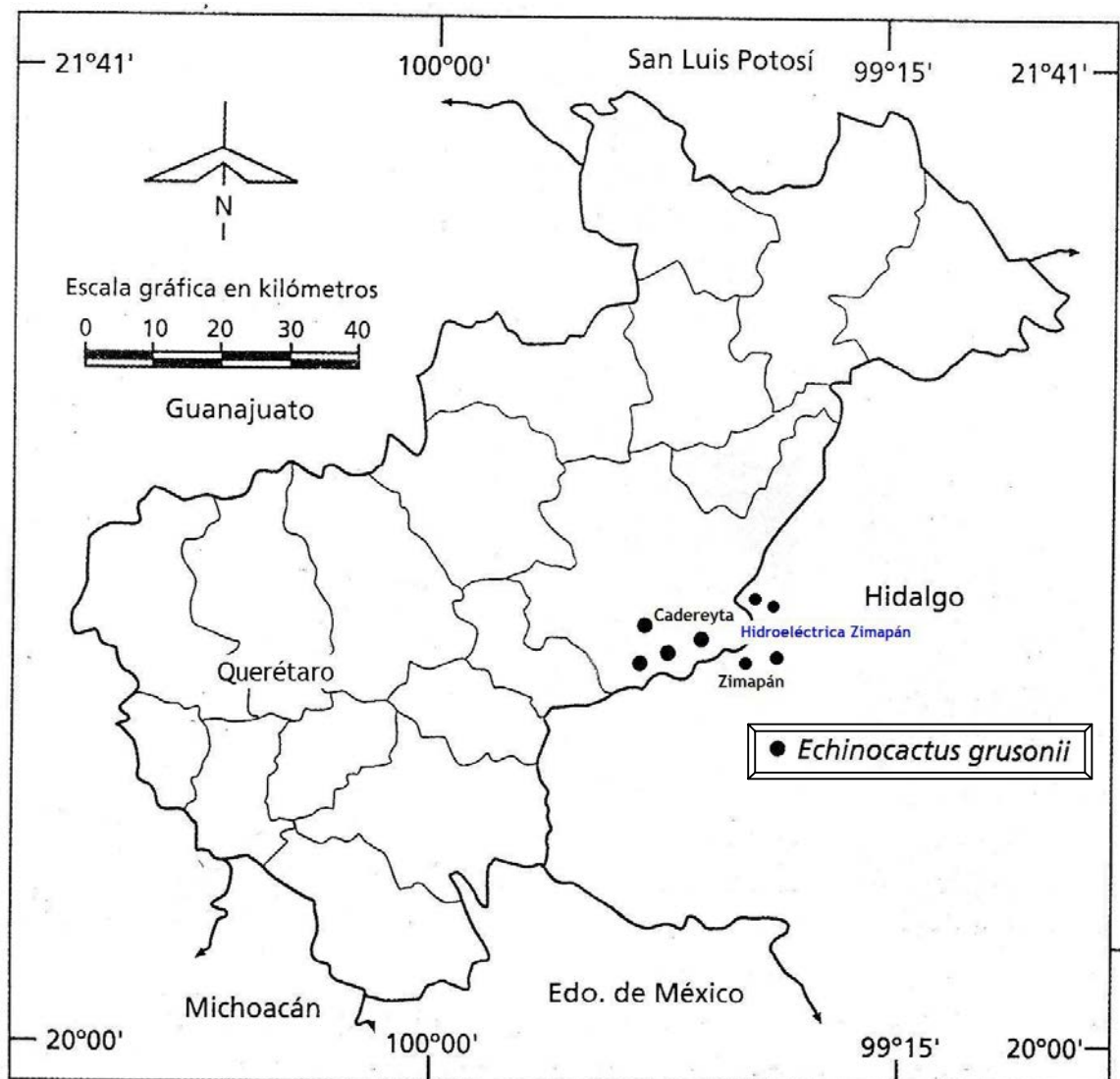


Figura 4. Distribución de *Echinocactus grusonii*, especie endémica de México. Tomada y modificada de Scheinvar (2004).

E. grusonii es una cactácea globosa de color verde claro que con el tiempo adquiere una forma cilíndrica, llega a medir hasta 130 cm de altura. Su ápice es lanoso y amarillento, posee espinas anuladas de color amarillo oro y forma flores amarillas que no abren ampliamente (Figura 5) (Anexo I). Florece de junio a agosto, habita en matorrales xerófilos micrófilos, en cañadas y pendientes muy marcadas sobre roca volcánica, con un clima semidesértico y en una altitud de 800 a 2000 msnm. Hasta el año 2002 se estimó un total de <250 individuos dentro de un área menor a los 10 km², la edad estimada de cada generación en la población es de 30 años (Fitz Maurice y Fitz Maurice, 2002; Scheinvar, 2004).



Figura 5. *Echinocactus grusonii*, ejemplar adulto en el Jardín Botánico de Cadereyta, estado de Querétaro.

Se ubica en la categoría “en peligro de extinción” (P) por la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002), la IUCN la ubica en la categoría CR (Critically Endangered o alto riesgo de extinción) y se encuentra dentro del Apéndice II del CITES. A pesar de ser una especie propagada exitosamente a partir de semilla en un gran número de colecciones particulares y jardines botánicos del mundo, su situación ecológica es bastante crítica ya que por su inigualable belleza es objeto de saqueo ilegal para su uso ornamental y además la Presa Hidroeléctrica Zimapán, construida en la década de los 90, inundó la mayor parte de su hábitat cambiando drásticamente las condiciones climáticas (aumento de la humedad atmosférica), lo que impide el óptimo desarrollo de las plantas nativas de la zona (Fitz Maurice y Fitz Maurice, 2002; Scheinvar, 2004). Actualmente sólo sobreviven unos cuantos individuos silvestres en las laderas más cercanas a la presa, y gracias a la ardua labor de rescate realizada por grupos ambientalistas, investigadores y estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de México fue posible salvar un número importante de individuos de *E. grusonii* y de otras especies antes de que el valle fuera inundado (Anderson, 2001). Los ejemplares se

conservan actualmente en reservas y jardines botánicos cercanos a la localidad tipo como son el Jardín Botánico de Cadereyta y la Reserva Ecológica Charco del Ingenio, en el estado de Querétaro (Pulido, 2006). Es un hecho que la colecta ejerce una mayor presión sobre la presencia de esta especie en condiciones silvestres, pues se trata de una planta altamente codiciada como ornamental, por lo tanto es necesario el desarrollo de planes especiales de propagación para satisfacer la demanda comercial y suprimir el saqueo ilegal de individuos silvestres muy longevos.

C. Propagación por CTV de *Echinocactus grusonii* y estudios sobre aspectos fisiológicos

Esta especie ha sido propagada por cultivo de tejidos a partir de la germinación *in vitro* de sus semillas. Uno de los primeros antecedentes que se tienen de la micropropagación de *E. grusonii* es el de Frías (1989) en el que sólo se desarrolla el diseño experimental para la germinación *in vitro* y la multiplicación de brotes por organogénesis directa, obteniendo de 2.5 a 4 brotes por explante con la aplicación de la combinación hormonal KIN 4 mg L⁻¹/ AIA 0.8 mg L⁻¹, pero no reporta resultados acerca de la fase de aclimatización ni del establecimiento de plantas *ex vitro*.

Anicua y Rivas (2000) determinaron algunas condiciones para la propagación *in vitro* de *E. grusonii* a partir del aislamiento de meristemas o aréolas de plantas adultas. Evaluaron el efecto independiente de diferentes concentraciones de las citocininas KIN (0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹) y BAP (0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹) en la activación areolar, pero en todos los tratamientos sólo se generó callo, con una respuesta más rápida en las concentraciones más altas de ambas citocininas.

Lizalde-Viramontes *et al.* (2004) obtuvieron, a partir de explantes laterales provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, hasta 4 brotes por explante aplicando un tratamiento de 2 mg L⁻¹ de BA. Posteriormente los brotes enraizados *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0.5 mg L⁻¹ de AIB, fueron transferidos a condiciones *ex vitro* después de un tiempo de aclimatización en una cámara de incubación por 2 o 3 semanas. De cada 20 brotes que fueron sacados a invernadero, sobrevivieron el 80% después de 4 semanas de la transferencia.

El último trabajo reportado es el de Rodríguez (2006) que utilizó también explantes laterales de plántulas germinadas *in vitro* y realizó pruebas de inducción con

tres diferentes citocininas (BA, 2iP y KIN) en tres distintas concentraciones (1, 2 y 3 mg L⁻¹ cada una). El mayor número de brotes los obtuvo con los tratamientos de BA (sintética), sin embargo, casi la mitad de los mismos presentaba anormalidades morfológicas. En cambio con 2iP (natural) en una concentración de 3 mg L⁻¹ logró una producción de 3.11 brotes por explante con morfología normal, considerando éste su mejor tratamiento. Los brotes enraizados en medio MS basal fueron aclimatizados por dos vías: previa *in vitro* y directa *ex vitro*, siendo la *in vitro* la más efectiva para tener el mayor porcentaje de sobrevivencia (100% de 280 brotes) en el tratamiento antes señalado.

Parte de los brotes regenerados *in vitro* por Rodríguez (2006) son los que se evaluaron en este trabajo. Específicamente los obtenidos en los tratamientos de KIN (sintética) y 2iP (1, 2 y 3 mg L⁻¹).

En cuanto a estudios fisiológicos con esta especie, el único antecedente que se tiene es el de Anicua y Rivas (2000), descrito previamente. Se espera que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean diferentes por tratarse de plantas completas formadas por activación areolar.

III. JUSTIFICACIÓN

Incrementar los conocimientos fisiológicos de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* durante la etapa de aclimatización, permitirá aplicar métodos que promuevan el exitoso establecimiento *ex vitro* en otras especies de la familia Cactaceae.

tres diferentes citocininas (BA, 2iP y KIN) en tres distintas concentraciones (1, 2 y 3 mg L⁻¹ cada una). El mayor número de brotes los obtuvo con los tratamientos de BA (sintética), sin embargo, casi la mitad de los mismos presentaba anomalías morfológicas. En cambio con 2iP (natural) en una concentración de 3 mg L⁻¹ logró una producción de 3.11 brotes por explante con morfología normal, considerando éste su mejor tratamiento. Los brotes enraizados en medio MS basal fueron aclimatizados por dos vías: previa *in vitro* y directa *ex vitro*, siendo la *in vitro* la más efectiva para tener el mayor porcentaje de sobrevivencia (100% de 280 brotes) en el tratamiento antes señalado.

Parte de los brotes regenerados *in vitro* por Rodríguez (2006) son los que se evaluaron en este trabajo. Específicamente los obtenidos en los tratamientos de KIN (sintética) y 2iP (1, 2 y 3 mg L⁻¹).

En cuanto a estudios fisiológicos con esta especie, el único antecedente que se tiene es el de Anicua y Rivas (2000), descrito previamente. Se espera que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean diferentes por tratarse de plantas completas formadas por activación areolar.

III. JUSTIFICACIÓN

Incrementar los conocimientos fisiológicos de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* durante la etapa de aclimatización, permitirá aplicar métodos que promuevan el exitoso establecimiento *ex vitro* en otras especies de la familia Cactaceae.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Conocer y evaluar algunas características fisiológicas de brotes enraizados de *Echinocactus grusonii* durante su aclimatización *in vitro* que puedan influir en su establecimiento *ex vitro*.

2. Objetivos Particulares

Estimar la tasa de asimilación de CO₂, la concentración de ácido málico y de pigmentos en:

- a) Plántulas obtenidas de germinación *in vitro* y *ex vitro* de *Echinocactus grusonii* como control.
- b) Brotes enraizados en fase de aclimatización *in vitro* de *Echinocactus grusonii*.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Material Biológico

Semillas de *Echinocactus grusonii* donadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM se almacenaron en bolsas de papel encerado a 4°C desde su colecta en Noviembre de 2002 hasta su siembra el 8 de junio de 2005. Se realizó la siembra tanto *in vitro* (25 de enero de 2006) como *ex vitro* (8 de junio de 2005) para obtener plantas juveniles que fueron el grupo control.

A. Siembra *ex vitro* (suelo)

Las semillas se desinfectaron en 50 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl, cloro comercial) al 20% durante 15 minutos, se enjuagaron y se dejaron remojando durante 15 minutos en agua destilada a temperatura ambiente. Antes de la siembra se esterilizó un sustrato compuesto por tepojal-tierra negra 1:1 y se saturó con agua hervida. Las semillas fueron enjuagadas varias veces para posteriormente aplicarles Captan (1gL⁻¹). Una vez sembradas en el sustrato se mantuvieron en condiciones de invernadero con iluminación difusa y una temperatura de entre 10° y 36 °C. El amplio rango de

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Conocer y evaluar algunas características fisiológicas de brotes enraizados de *Echinocactus grusonii* durante su aclimatización *in vitro* que puedan influir en su establecimiento *ex vitro*.

2. Objetivos Particulares

Estimar la tasa de asimilación de CO₂, la concentración de ácido málico y de pigmentos en:

- a) Plántulas obtenidas de germinación *in vitro* y *ex vitro* de *Echinocactus grusonii* como control.
- b) Brotes enraizados en fase de aclimatización *in vitro* de *Echinocactus grusonii*.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Material Biológico

Semillas de *Echinocactus grusonii* donadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM se almacenaron en bolsas de papel encerado a 4°C desde su colecta en Noviembre de 2002 hasta su siembra el 8 de junio de 2005. Se realizó la siembra tanto *in vitro* (25 de enero de 2006) como *ex vitro* (8 de junio de 2005) para obtener plantas juveniles que fueron el grupo control.

A. Siembra *ex vitro* (suelo)

Las semillas se desinfectaron en 50 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl, cloro comercial) al 20% durante 15 minutos, se enjuagaron y se dejaron remojando durante 15 minutos en agua destilada a temperatura ambiente. Antes de la siembra se esterilizó un sustrato compuesto por tepojal-tierra negra 1:1 y se saturó con agua hervida. Las semillas fueron enjuagadas varias veces para posteriormente aplicarles Captan (1gL⁻¹). Una vez sembradas en el sustrato se mantuvieron en condiciones de invernadero con iluminación difusa y una temperatura de entre 10° y 36 °C. El amplio rango de

temperatura se debe principalmente a las temporadas del año y depende en gran parte de las condiciones climáticas del ambiente externo al invernadero.

B. Siembra *in vitro*

Las semillas se escarificaron en H₂SO₄ concentrado durante 15 segundos, posteriormente se lavaron en 50 mL de agua destilada adicionada con 3 gotas de detergente líquido Dawn[®] durante 30 minutos, después se desinfectaron en 50 mL de agua destilada con 3 gotas de plata coloidal estable 0.32% (Microdyn[®]) durante 25 minutos. El tren de desinfección continuó en 50 mL de etanol al 70% durante 2 minutos y 15 minutos en NaOCl al 20% adicionado con 3 gotas de Tween-80. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación constante. Finalmente, en condiciones asépticas, las semillas fueron enjuagadas 4 veces en agua destilada esterilizada para ser sembradas en frascos con medio de cultivo MS al 50% de sus componentes (Anexo II). Una vez sembradas, se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado, con un fotoperíodo de 16/8 h, una intensidad luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 25 \pm 2°C. El criterio considerado para la germinación de las semillas fue la emergencia de la radícula. Cuando se alcanzó el mayor porcentaje de germinación, las plántulas fueron transferidas a sustrato esterilizado (tepojal-tierra negra 1:1) permaneciendo en la cámara de ambiente controlado durante 8 a 15 días. Posteriormente se transfirieron al invernadero donde continuaron su desarrollo (Figura 9A-D).

C. Mantenimiento de brotes regenerados y enraizados *in vitro*.

Brotos de *E. grusonii* regenerados por activación areolar inducidos con KIN y 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹ (Rodríguez, 2006) (Figura 10A-B) se individualizaron y se transfirieron a medio MS 100% y MS 50% (Anexo II). La edad de los brotes quedó establecida a partir de su individualización, de tal manera que los provenientes de KIN contaban con 7 meses de edad y los de 2iP con 12 meses de edad al momento de realizar las evaluaciones fisiológicas (Figura 11A-B). Se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado con las mismas especificaciones señaladas anteriormente.

2. Evaluaciones Fisiológicas

Se midió la tasa de asimilación de CO₂, la concentración de ácido málico y la concentración de pigmentos fotosintéticos tanto a plantas juveniles obtenidas de la germinación *in vitro* y *ex vitro* (control) como a brotes enraizados procedentes de los seis tratamientos hormonales antes mencionados.

Se emplearon de 2 a 3 brotes enraizados procedentes de cada tratamiento hormonal que permanecieron en medio MS 50% y MS 100% durante 7 y 12 meses antes de ser evaluados fisiológicamente. Así mismo, se tomaron 3 plántulas germinadas tanto *in vitro* como *ex vitro* de 7 y 12 meses de edad respectivamente. Una plántula o un brote representaron una unidad de muestra experimental, de tal manera que el número de plántulas o brotes utilizados por cada tratamiento equivalen al número de réplicas evaluadas.

A. Tasa de asimilación de CO₂

Se realizó la evaluación de las plántulas y brotes provenientes de cada tratamiento cada 4 horas durante 24 horas (4h, 8h, 12h, 16h, 20h, y 24h) con la metodología reportada por Rosas (2002) utilizando un analizador infrarrojo de gases (IRGA, Qubit Systems, Ontario) de sistema abierto y diferencial que permite la medición de moléculas heteroatómicas como el CO₂ (Figura 6).

Media hora antes de cada medición se obtuvo una curva basal para conocer la concentración de CO₂ (ppm) presente en el aire circundante y poder calcular con base a ésta la tasa de asimilación de CO₂ de cada muestra.

Al introducir la muestra a la cámara del IRGA se hace circular la corriente de aire de concentración de CO₂ conocida, la cuál llega hasta el analizador infrarrojo y registra las ppm de CO₂ presentes. La medición por cada brote y cada plántula duró de 10 a 15 minutos y fue registrada en la computadora con el programa Logger Pro[®] versión 1.2.

Por cada tratamiento en brotes enraizados *in vitro*, se realizaron de 2 a 3 réplicas dependiendo de la cantidad de material disponible ya que el número de brotes obtenidos no fue el mismo en todos los tratamientos de inducción. Mientras que el número de réplicas evaluadas para el control, tanto en plántulas de 7 meses como en plántulas de 12 meses fue de 3.

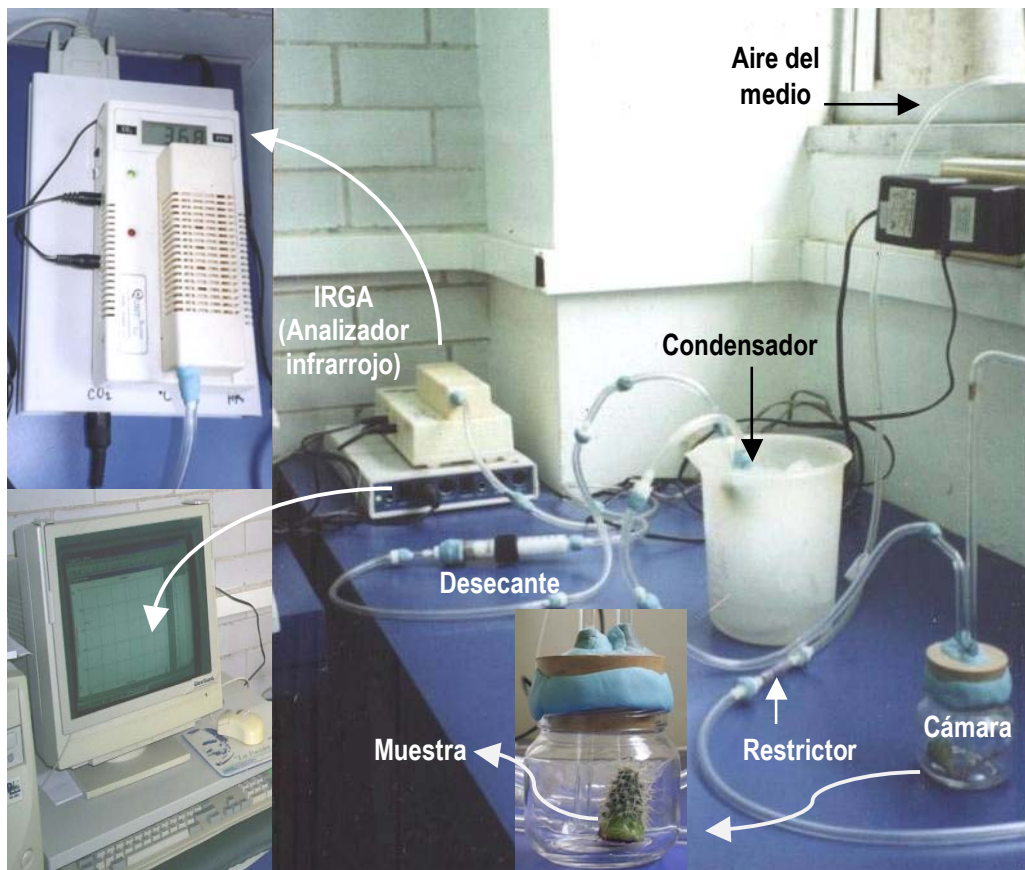


Figura 6. Dispositivo IRGA para evaluar la tasa de asimilación de CO₂. Se hace pasar un flujo de aire del ambiente por la cámara sellada donde se encuentra la muestra. El flujo circula hacia un contenedor que condensa la mayor parte de humedad del aire, el cual llega hasta el analizador infrarrojo que cuantifica las ppm de CO₂ presentes en el flujo.

B. Determinación de ácido málico

La cuantificación de ácido málico se realizó con el método reportado por Rodés y Collazo (2006). De cada muestra se pesaron 2 g de tejido, aquellas plantas que pesaron menos de 2 g se utilizaron completas, registrándose ese peso.

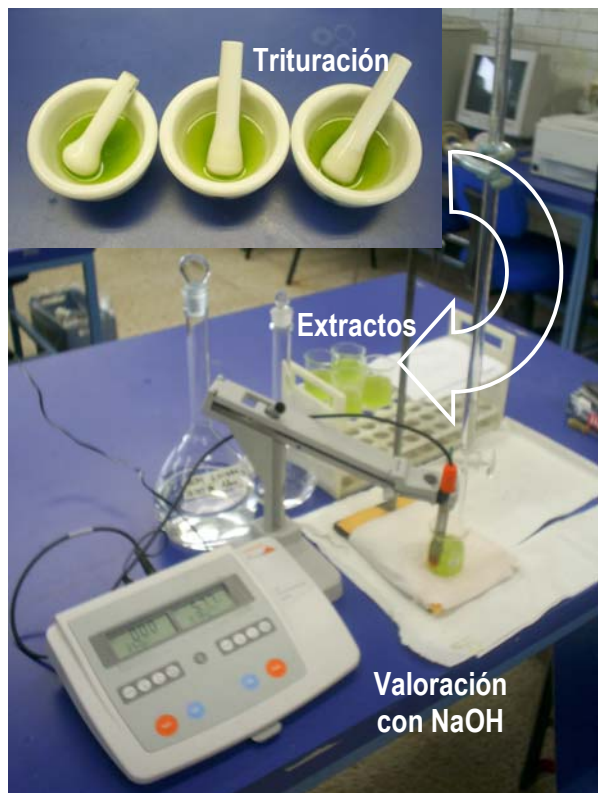


Figura 7. Equipo necesario para la determinación de ácido málico en plántulas y brotes enraizados.

Se trituroó cada muestra en un mortero con media cucharadita de arena reactivo, a cada una se le añaadió 10 mL de metanol 100% como solvente orgánico y 10 mL de agua destilada. Se filtraron los extractos con la finalidad de eliminar la arena y el material vegetal más grueso, a cada extracto se le añaadió lentamente con una bureta, solución de NaOH 0.01N recién valorada agitando continuamente. El pH de la solución fue monitoreada con un potenciómetro hasta alcanzar un pH de 9, que es el punto de equivalencia del pH alcalino (Figura 7). Se registró el volumen de NaOH consumido en cada caso.

Se calculó la concentración de ácido málico en miliequivalentes, con los

resultados obtenidos en la valoración de cada muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{meq ácido g}^{-1} = Vm (N) / Pm$$

donde Vm es el volumen en mL de NaOH consumido por la muestra, N es la concentración de la solución de NaOH (mol L^{-1}) y Pm es el peso de la muestra en gramos.

C. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Se calculó el contenido de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) en función del peso fresco expresado en gramos con base en el método reportado por Rodés y Collazo (2006), realizando algunas modificaciones propuestas por López Escamilla y López Herrera (comunicación personal). El alto contenido de agua y la baja concentración de pigmentos en el tejido proveniente del cultivo *in vitro* hizo difícil la lectura en el espectrofotómetro con un extracto muy diluido en el solvente orgánico que en este caso fue acetona al 80%. De tal manera que se planteó no

realizar las diluciones en 50 mL de solvente indicadas por Rodés y Collazo y medir los extractos obtenidos directamente con un volumen de 10 mL de acetona.

Se pesó 1 g de cada muestra y se trituró completamente el tejido en morteros, adicionando pequeños volúmenes de acetona 80% sin exceder los 10 mL. Los extractos se mantuvieron en la oscuridad cubriéndolos con papel aluminio para evitar la fotolabilidad y en hielo para mantenerlos fríos, enseguida se centrifugó la mezcla tejido-solvente de cada muestra a 2000 rpm durante 5 minutos y se extrajo el sobrenadante evitando resuspender el tejido. Posteriormente se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia utilizando acetona 80% como blanco y se midió la absorbancia de cada muestra a 663, 645 y 440 nm, registrándose los valores obtenidos.

Para calcular el contenido de pigmentos tomando en cuenta el peso fresco se utilizó la siguiente fórmula (Rodés y Collazo, 2006):

$$\% \text{ de pigmentos} = C (Pm / V) Pm$$

donde Pm es el peso de la muestra en gramos, V es el volumen final del extracto (10 mL) y C es la concentración de pigmentos expresada en mg L⁻¹ obtenida a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})]$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})]$$

$$C_{a+b} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})]$$

$$Cc \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 4.695 (A_{440}) - 0.268 (C_{a+b})$$

A. Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA y la de comparación múltiple de datos de Tukey en el programa Statistica versión 6.0[®]. Mientras que las gráficas fueron elaboradas con el programa SigmaPlot versión 9.0[®]. En la Figura 8 se muestra el diagrama del método seguido en este trabajo.

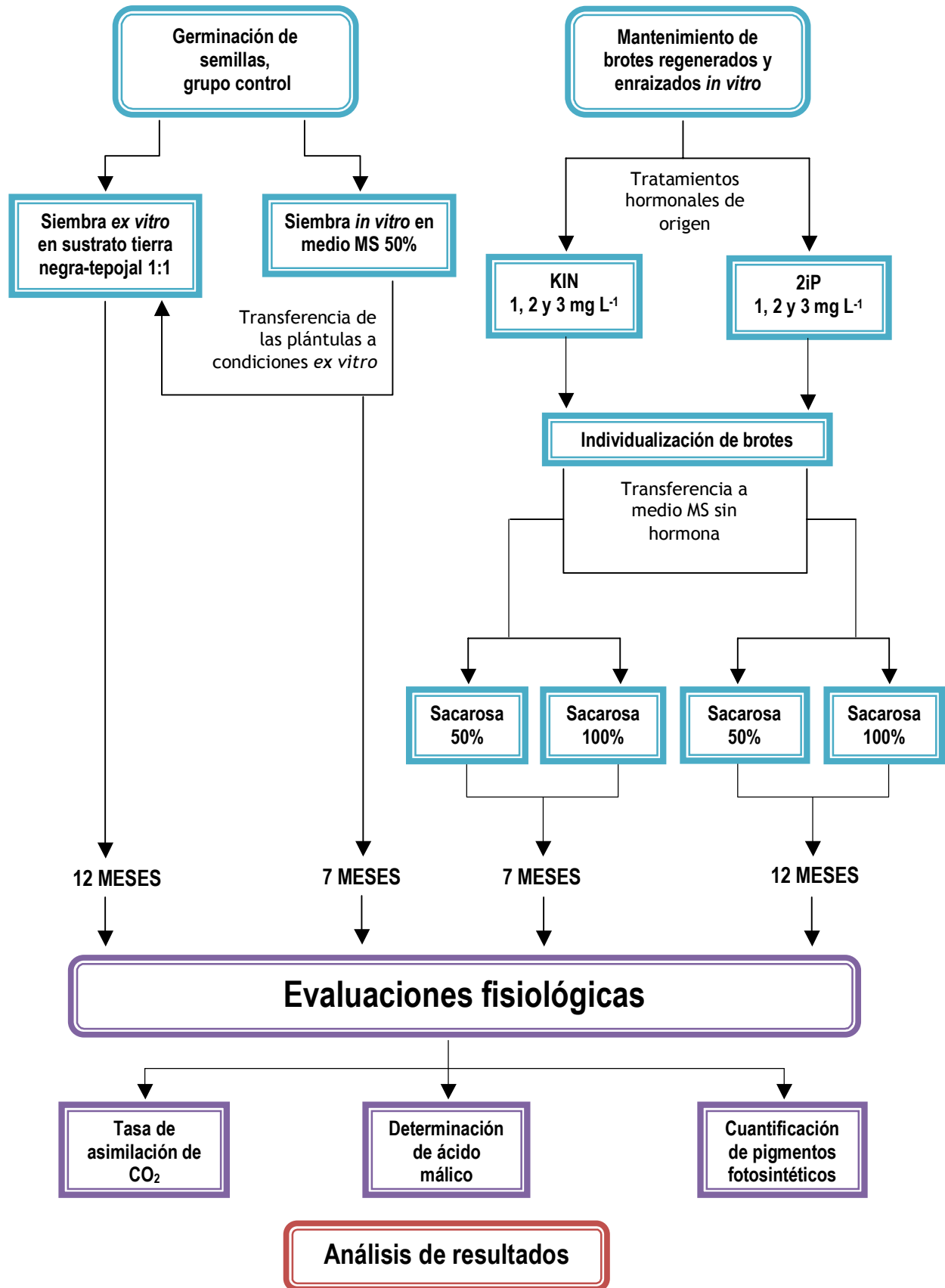


Figura 8. Diagrama de flujo del método seguido para la evaluación fisiológica de brotes enraizados y plántulas de *Echinocactus grusonii*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

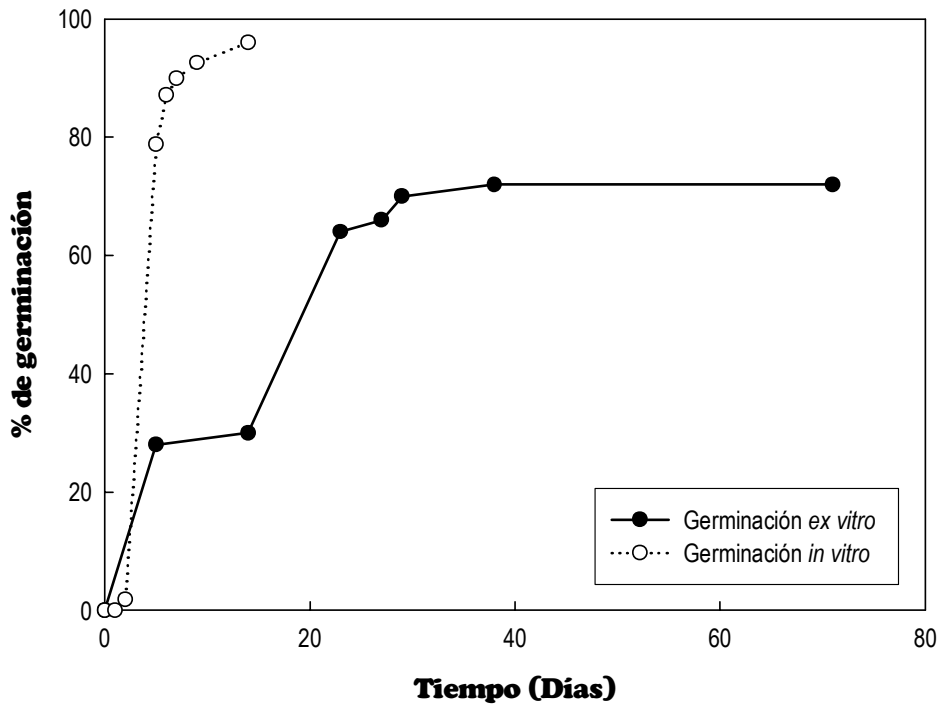
1. Germinación *ex vitro* e *in vitro*

Se obtuvo el 28% de germinación al quinto día posterior a la siembra *ex vitro*. Durante el periodo de 14 a 23 días se observó un rápido incremento de 30 a 64% de germinación, estabilizándose en el día 38 al alcanzar el mayor porcentaje (72%) el cual se mantuvo hasta los 71 días posteriores a la siembra (Gráfica 1).

A pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de germinación, el desarrollo de las plántulas se vio afectado después de la emergencia de la radícula, ya que la testa de las semillas permanecía muy rígida y no permitía su crecimiento por lo que ésta se tuvo que retirar manualmente, de lo contrario las plántulas morían.

Las semillas sembradas *in vitro* presentaron 96% de germinación, la cual inició al segundo día posterior a la siembra con un porcentaje de 1.8%, pero en los tres días siguientes el porcentaje se incrementó notablemente llegando a 78.8% al quinto día. En los siguientes nueve días el porcentaje aumentó paulatinamente hasta obtener un máximo de 96% en el día 14 (Gráfica 1). El desarrollo de las plántulas en este caso no fue impedido por las testas ya que no permanecieron unidas a los cotiledones (Figura 9A).

Es evidente que existe una ventaja al sembrar las semillas *in vitro* ya que se alcanza casi el 100% de germinación en sólo dos semanas, mientras que para lograr un porcentaje máximo en semillas sembradas *ex vitro* se requiere poco más de un mes. Por lo tanto el proceso de escarificación y la composición del medio de cultivo *in vitro* juegan un papel muy importante para que la germinación se efectúe de una manera más rápida y fácil.



Gráfica 1. Curva de germinación de semillas de *Echinocactus grusonii* tanto *ex vitro* como *in vitro*.

Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) y Rodríguez (2006) emplearon el mismo tren de desinfección para la germinación *in vitro* de semillas de *Echinocactus platyacanthus* y *E. grusonii*, respectivamente. En el último caso se utilizaron semillas de la misma colecta que las empleadas en el presente trabajo y se obtuvo un porcentaje de germinación similar (94% en 19 días), lo que significa que *E. grusonii* posee un periodo de viabilidad considerablemente amplio ya que a pesar de permanecer almacenadas por 5 años éstas aún muestran una excelente respuesta de germinación. Por su parte Rosas-López y Collazo-Ortega (2004), aplicaron el mismo tiempo de escarificación y obtuvieron el 88% de germinación en 34 días. Posiblemente las semillas de *E. platyacanthus* poseen una testa más gruesa que las de *E. grusonii* por lo que el agua disponible en el medio no las penetra tan fácilmente y demoran más en germinar.

Por otra parte, De la Rosa-Ibarra y García (1994) realizaron ensayos de germinación *ex vitro* con diferentes especies de cactáceas (*Astrophytum capricorne*, *A. myriostigma*, *Leuchtenbergia principis*, *Echinocactus grusonii* y *E. platyacanthus*)

probando varios tratamientos, empleando hipoclorito de sodio o escarificación con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). En *E. grusonii* la mejor respuesta de germinación (68%) se obtuvo con una previa escarificación con H_2SO_4 durante 30 segundos y a temperatura ambiente de 20°C. Con este resultado se confirma la necesaria acción corrosiva del H_2SO_4 en la propagación artificial para facilitar la germinación al agrietar la testa de las semillas y permitir el paso del agua y oxígeno.

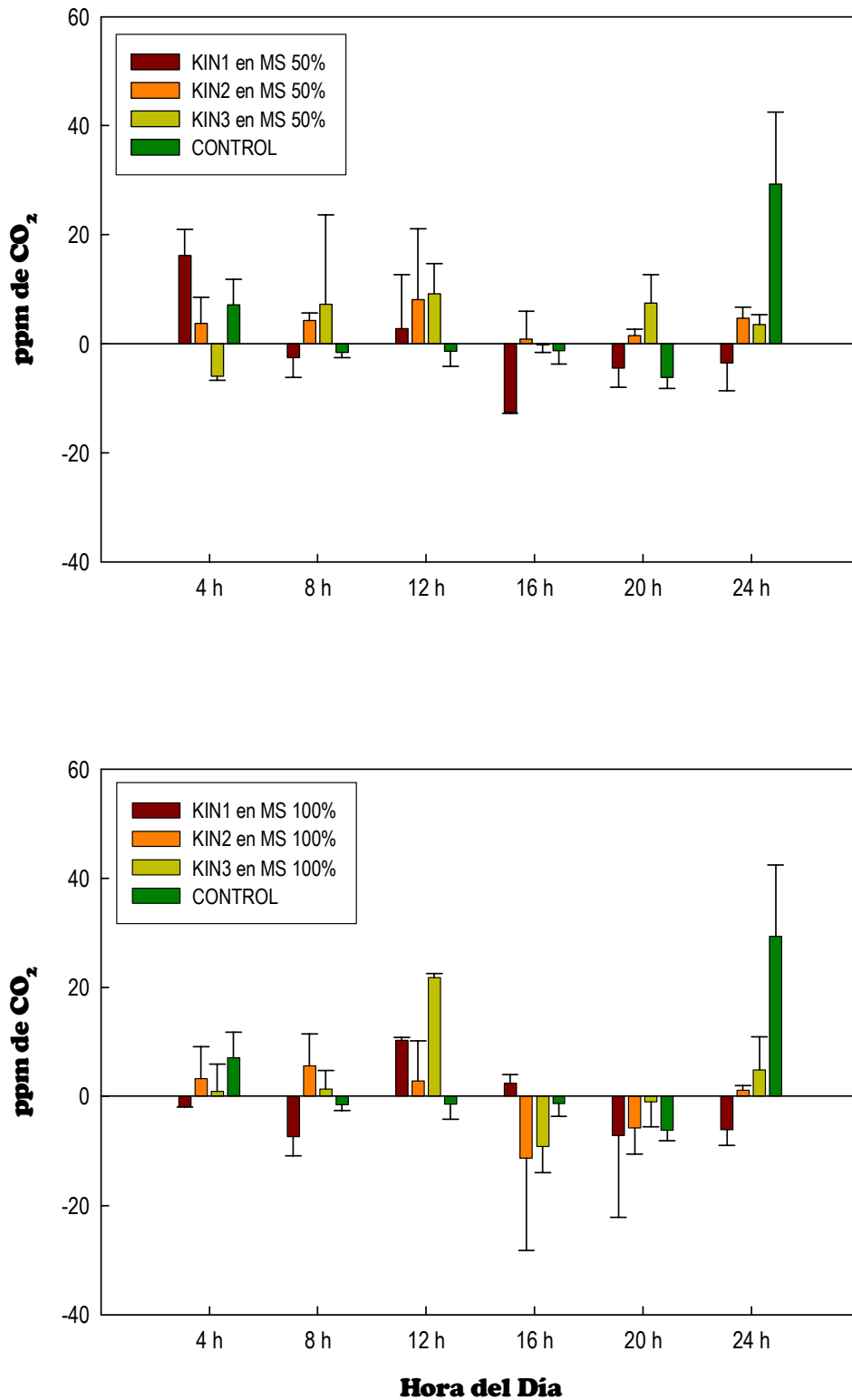
2. Evaluaciones fisiológicas

A. Tasa de asimilación de CO_2

Las tasas de asimilación registrada para los brotes enraizados de 7 meses en medio MS 50% y MS 100% procedentes de los tratamientos hormonales KIN 1, 2 y 3 $mg L^{-1}$ se muestran en la Gráfica 2.

De acuerdo a lo descrito por Cushman (2001), Geydan y Melgarejo (2005), los brotes de KIN 1 en MS 100% así como los de KIN 2 y 3 en ambas concentraciones de sacarosa en MS presentaron un comportamiento de tipo “CAM cíclico ó nearly C_3 ”, es decir, un intermedio entre metabolismo CAM y C_3 con mayor tendencia hacia el segundo, ya que registraron asimilación diurna de CO_2 principalmente en las fases II y III (8 a 16 h) del CAM; y asimilación nocturna, en menor grado, durante la fase I (20 a 8 h). En KIN 2 en MS 50% existe una mayor tendencia hacia C_3 ya que absorbieron CO_2 durante todo el día. Sólo los brotes del tratamiento KIN 1 en MS 50% reflejaron una tendencia más definida hacia el metabolismo “CAM obligado ó constitutivo” que se apega de forma más estricta al patrón de las cuatro fases del CAM típico con asimilación de CO_2 exclusivamente nocturna en la fase I con el mayor valor registrado a las 4 h (16.186 ppm) y un valor de asimilación menor (2.08 ppm) en la fase II, específicamente a las 12 h.

Aún así las diferencias entre tratamientos no fueron significativas, contrario a lo obtenido entre horas donde sí se registraron diferencias significativas para ambas concentraciones de sacarosa en el medio ($F= 6.6978$; $p= 0.000087$) (Anexo III, Tabla 3).



Gráfica 2. Tasa de asimilación de CO₂ en brotes *in vitro* de 7 meses obtenidos con los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

Las plantas juveniles de 7 meses de edad mostraron un metabolismo CAM bien definido con el mayor valor de asimilación en la fase I a las 24 h (29.3 ppm) y a las 4 h (7.1 ppm). Se presentaron diferencias significativas entre horas ($F= 16.1285$; $p=0.000097$), siendo la media noche la que se diferenció significativamente del resto (Anexo III, Tabla 4). Durante el día los valores fueron negativos (-1.3 a -6.2 ppm) indicando que los estomas permanecieron cerrados y no hubo asimilación. Se observaron diferencias significativas entre los brotes y el control ($F= 3.2591$; $p=0.00006$), específicamente con los tratamientos KIN 1 en MS 50% ($p= 0.0367$) aunque estos mostraron una tendencia más marcada hacia CAM, KIN 1 en MS 100% ($p= 0.0136$) y KIN 2 en MS 100% ($p= 0.0152$).

La tasa de asimilación registrada para los brotes enraizados de 12 meses en medio MS 50% y MS 100% procedentes de los tratamientos hormonales 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹ se muestran en la Gráfica 3.

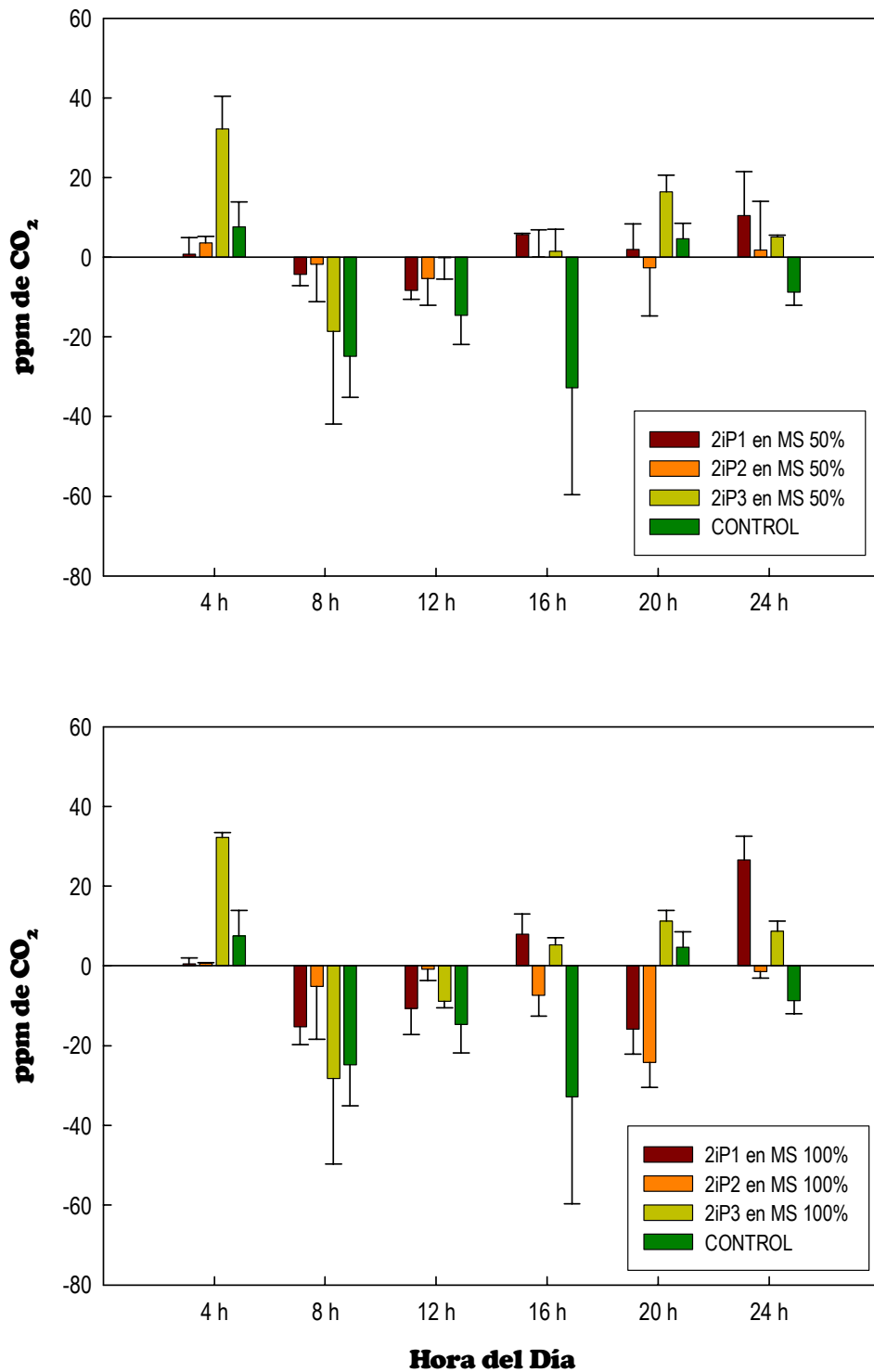
En este caso, se observaron más variantes de metabolismo CAM descritas por Cushman (2001), Geydan y Melgarejo (2005). Los brotes provenientes del tratamiento 2iP 1 en ambas concentraciones de MS mostraron una tendencia hacia el metabolismo "CAM obligado", con los valores de asimilación más altos a las 24 h (10.44 ppm en MS 50% y 26.5 ppm en MS 100%). En cambio, los brotes procedentes del tratamiento 2iP 2 mantenidos en ambas concentraciones de MS mostraron un metabolismo CAM de tipo "idling o inútil", una variante del CAM en la que los estomas permanecen cerrados todo el tiempo impidiendo la toma de CO₂ atmosférico. Sin embargo, en 2iP 2 MS 50% se registraron valores muy bajos de asimilación a las 24 h (1.85 ppm) y a las 4h (3.54 ppm), así como en 2iP 2 MS 100% en los que se registró una ligera asimilación únicamente a las 4h (0.586 ppm); esto indica que posiblemente estos brotes desarrollarán más adelante un metabolismo CAM más estricto. Por otra parte, en los brotes del tratamiento 2iP 3 en ambas concentraciones de MS se observó un comportamiento metabólico del tipo "CAM obligado", de tal forma que fueron los únicos tratamientos con valores de asimilación más altos de CO₂ durante la noche en la fase I (1.56-32.22 ppm en 2iP 3 MS 50% y 5.33-32.23 ppm en 2iP 3 MS 100%) y negativos durante el día a las 8 h (-18.66 ppm en 2iP 3 MS 50% y -28.17 ppm en 2iP 3 MS 100%).

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($F= 6.0252$; $p= 0.000083$), entre horas del día ($F= 23.262$; $p= 0.0000$) (Anexo III, Tabla 5) y la interacción entre ambas ($F= 7.4661$; $p=0.0000$).

Es posible que no exista una influencia directa de la concentración de sacarosa en el medio para que los brotes desarrollen gradualmente la funcionalidad de su metabolismo fotosintético y que más bien se trate de una influencia del tratamiento hormonal aplicado durante la inducción de los brotes.

Por su parte, el control muestra un metabolismo “CAM obligado” con diferencias significativas entre horas ($F= 4.8440$; $p= 0.0118$) que específicamente fueron entre el valor más bajo (-32.8 ppm) registrado a las 16 h y ambos valores positivos de asimilación registrados durante las 4 h (7.5 ppm) ($p= 0.019$) y las 20 h (4.6 ppm) ($p= 0.0304$). Los tratamientos que se diferenciaron significativamente del control fueron 2iP 1 ($p= 0.0034$), 2iP 2 ($p= 0.0047$) y 2iP 3 ($p= 0.00012$) en MS 50%, así como de 2iP 1 ($p= 0.0075$) y 2iP 3 ($p= 0.00013$) en MS 100% a pesar de que en este caso los brotes mostraron la misma variante del metabolismo CAM.

Al igual que los resultados obtenidos por Rosas (2002), los valores de asimilación de CO₂ fueron relativamente bajos. La presencia de valores negativos se explica con lo descrito por Matekaire (2001), quien señala que el CO₂ necesario para la fotosíntesis debe alcanzar un nivel suficiente dentro de los espacios intercelulares para superar el punto de compensación, por lo tanto, se requiere cierto grado de conductividad en los estomas. En cambio, las pequeñas cantidades de CO₂ emitidas por la respiración se acumulan en el mesófilo y pueden difundirse al exterior al formarse gradientes entre el tejido fotosintético y el exterior. Esta difusión no ocurre necesariamente por los estomas, sino que es posible que sea por la epidermis y la cutícula las cuales tienen cierto grado de permeabilidad a los gases (CO₂, agua y O₂ principalmente). En este sentido, considerando que las cutículas de los brotes regenerados *in vitro* son muy delgadas, es muy probable que la difusión del CO₂ sea a través de la epidermis.



Gráfica 3. Tasa de asimilación de CO₂ en brotes *in vitro* de 12 meses obtenidos con los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

Por su parte, Malda *et al.* (1999b) encontraron que la asimilación de CO₂ en brotes de *Coryphantha minima* obtenidos *in vitro* con el tratamiento KIN 10 mg L⁻¹/ANA 1 mg L⁻¹ de 6 meses de edad fue mayor (1.20 μmol m⁻² s⁻¹) que la asimilación obtenida en plantas obtenidas de la germinación *ex vitro* (0.79 μmol m⁻² s⁻¹). Esto es difícil de distinguir en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que las mediciones se realizaron en 6 periodos del día mientras que Malda *et al.* realizaron sus mediciones únicamente en dos periodos. Sin embargo, también percibieron que la asimilación de CO₂ en los brotes regenerados *in vitro* ocurría tanto en el día como en la noche, lo que indica una alteración del patrón normal del metabolismo CAM, concluyendo que éstos presentaron un comportamiento alternante entre C₃ y CAM al igual que los resultados obtenidos para los brotes regenerados con los tratamientos KIN 2 y 3 mg L⁻¹ en ambas concentraciones de MS y KIN 1 en MS 100% del presente trabajo. Lo que indica que posiblemente exista cierta influencia de la KIN en la alteración del metabolismo CAM. Finalmente, también observaron que la asimilación de CO₂ fue mas alta en los brotes enraizados en MS 100% que en los que permanecieron en MS 50% como consecuencia posiblemente de una mayor actividad estomática inducida por la concentración de sacarosa en el medio. En este aspecto, como no existieron diferencias significativas entre concentraciones de sacarosa en el medio en la asimilación de CO₂ de los brotes de *E. grusonii*, es muy probable que no exista una influencia definitiva de la fuente de carbono externa en la actividad fotosintética de los mismos.

A diferencia de la evaluación de CO₂ en este trabajo, Anicua y Rivas (2000) consideraron la tasa de respiración como mejor parámetro para evaluar el comportamiento fotosintético en brotes *in vitro* de *Mammillaria carmenae* y *M. bocasana* de 180 días de edad. Encontraron una mayor tasa de respiración en aquellos brotes generados con 5 mg L⁻¹ de KIN y 10 mg L⁻¹ de BAP, además de que la respiración se observó tanto en el periodo de luz como de oscuridad, lo que les permite suponer que existe también una alteración de metabolismo CAM a C₃. Infieren que las altas concentraciones de hormona manejadas pudieron influir en la concentración de CO₂ difundido. Estos resultados no coinciden con los obtenidos aquí, ya que lo que se evaluó en este caso fue la asimilación de CO₂ y la respiración sólo se consideró como un proceso secundario. Sin embargo, la conclusión a la que llegan los autores en

cuanto al tipo de metabolismo fotosintético de los brotes coincide con lo observado en los tratamientos ya mencionados de KIN.

A pesar de que en el trabajo de Anicua y Rivas también se evaluó la especie *E. grusonii* es importante recalcar que la medición se llevó a cabo en tejido desorganizado o callo, en donde encontraron la mayor tasa de respiración en los tratamientos hormonales KIN 0.5 y 10 mg L⁻¹ y BAP 1 y 10 mg L⁻¹ durante ambos periodos del día (luz-oscuridad), por lo que suponen que también se trata de un metabolismo de tipo C₃. Como un particular punto de vista, considero que el tejido no diferenciado proporciona información ambigua en cuanto a los parámetros evaluados para definir cierto tipo de metabolismo fotosintético ya que se trata de tejido que no cumple con las funciones típicas de una planta completa con órganos perfectamente diferenciados.

Por su parte, Garrido (1998) observó que la asimilación de CO₂ en brotes enraizados de *Rhipsalidopsis rosea* obtenidos con el tratamiento KIN 5 mg L⁻¹/ANA 0.1 mg L⁻¹ fue significativamente menor que la asimilación registrada en el control (planta *in vivo* de edad no definida). En brotes de *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* ocurrió lo mismo, siendo la concentración de CO₂ asimilado significativamente mayor en las plantas control. Las mediciones fueron realizadas dos veces durante el periodo de oscuridad por lo que es difícil comparar estos resultados con los obtenidos para *E. grusonii*, además de que la edad es un parámetro muy importante que no está siendo considerado en este caso.

Una observación importante dentro de las tasas de asimilación obtenidas para los brotes de *E. grusonii* es la tendencia hacia algún tipo de metabolismo fotosintético dependiendo del tratamiento hormonal previo, ya que aquellos obtenidos con KIN en general reflejaron una tendencia más marcada hacia un metabolismo CAM-C₃, mientras que los brotes obtenidos con 2iP llevaron a cabo un comportamiento de tipo CAM más estricto. Esto nos permite suponer que existe una influencia específica del tipo de fitohormona, ya que a pesar de que ambas son citocininas, una es sintética (KIN) y la otra es natural (2iP) (Gaspar *et al.*, 1996). Sin embargo, la edad de los brotes también es un factor importante a considerar. En este caso, los más maduros de un año son los que ya presentan el metabolismo mejor definido típico de la familia Cactaceae, en cambio, la alternancia entre CAM-C₃ fue más evidente en los brotes de siete meses. Loza *et al.* (2002) también encontraron que plántulas obtenidas de la

germinación *ex vitro* de *Stenocereus queretaroensis* de hasta 392 días de edad se comportaron como C₃ y sugieren que el CAM se puede presentar facultativamente o en edades posteriores. En cambio, Altesor *et al.* (1992) señalan que el CAM en plántulas de cactáceas se activa entre los 70 y 140 días después de la germinación y Rosas (2002) reportó que plántulas de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* de 98 días de edad mantenidas en condiciones *in vitro* presentaron una alternancia entre metabolismo C₃ y CAM. Por lo tanto, es muy probable que la temporalidad en la que se activa el metabolismo CAM sea diferente para cada especie y que su plasticidad dependa mucho de los factores medioambientales presentes.

B. Concentración de ácido málico

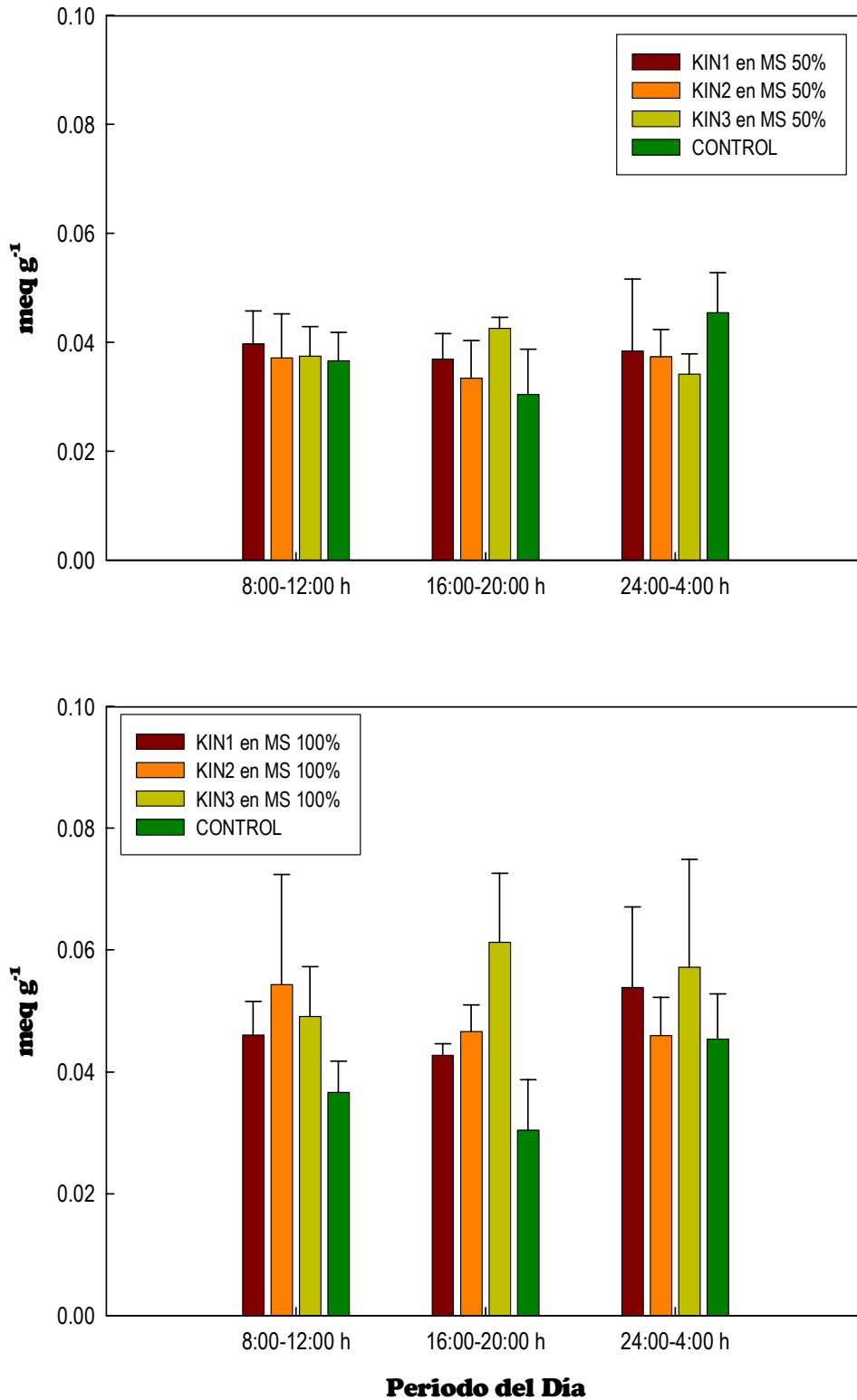
La concentración de ácido málico en los brotes regenerados de 7 meses, procedentes de los tratamientos de KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹, se muestra en la Gráfica 4.

En los brotes enraizados del tratamiento KIN 1 en MS 50% se observa una concentración de ácido málico casi constante con valores que van de 0.03 a 0.04 meq g⁻¹. De acuerdo a la descripción de Cushman (2001), Geydan y Melgarejo (2005), este comportamiento corresponde al “CAM cíclico” ya que en esta variante las fluctuaciones de ácido málico son muy pequeñas durante el transcurso de las 24 h, lo cual no corresponde estrictamente a los resultados obtenidos en la tasa de asimilación de CO₂, en la que se refleja una tendencia hacia “CAM obligado” con la mayor asimilación de CO₂ a las 4 h (16.18 ppm) y una más baja absorción a las 12 h (2.8 ppm). Esto significa que probablemente el CO₂ atmosférico tomado a las 4 h esté siendo almacenado en las vacuolas a través de la PEPC, el cual ya no es utilizado durante el periodo de luz ya que el CO₂ tomado a las 12 h es conducido directamente al ciclo de Calvin a través de Rubisco. Ocurre un comportamiento similar en los brotes del tratamiento KIN 2 y KIN 3 en MS 50% donde la fluctuación es casi nula con valores nuevamente entre 0.03 y 0.04 meq g⁻¹, sólo que en estos casos sí existe una correspondencia con lo obtenido en las tasas de asimilación de CO₂ con respecto al comportamiento metabólico de tipo “CAM cíclico”.

En cuanto a los brotes enraizados de los tres tratamientos de KIN en MS 100%, las fluctuaciones de ácido son más marcadas que en los brotes de MS 50%, aunque las variaciones no son significativas entre los periodos del día. Sólo en los brotes de los

tratamientos KIN 2 y KIN 3 existe una correlación con los resultados obtenidos en las tasas de asimilación de CO₂, el comportamiento metabólico tiende a ser C₃ y la mayor asimilación diurna de CO₂ es correspondiente con la mayor concentración de ácido cuantificado durante el día (0.054 meq g⁻¹ de 8 a 12 h en KIN 2 y 0.061 meq g⁻¹ de 16 a 20 h en KIN 3). En el caso de los brotes enraizados de KIN 1 la mayor concentración de ácido se registró en el periodo nocturno (0.054 meq g⁻¹ de 24 a 4 h) mientras que la mayor tasa de asimilación de CO₂ se registró durante el día (12 a 16 h), por lo tanto aquí no existe una correspondencia tan estrecha, lo que significa que posiblemente se lleve a cabo un reciclamiento de CO₂ interno durante la noche en el que la PEPC capte aquellas moléculas de CO₂ liberadas por la respiración.

Contrario a lo observado entre tratamientos hormonales, en ambas concentraciones de sacarosa en MS existieron diferencias significativas (F= 6.6028; $p= 0.000095$) específicamente entre los brotes de KIN 3 en MS 100% y los brotes de KIN 1 ($p= 0.0088$), KIN 2 ($p= 0.00104$) y KIN 3 ($p= 0.00405$) en MS 50%, así como entre los brotes de KIN 2 en MS 50% y KIN 2 en MS 100% ($p= 0.0281$). Mientras que en MS 50% los registros oscilaron entre 0.03 y 0.04 meq g⁻¹, en MS 100% los valores fluctuaron entre 0.04 y 0.06 meq g⁻¹.



Gráfica 4. Concentración de ácido málico en brotes *in vitro* de 7 meses obtenidos con los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

Los resultados obtenidos para las plantas de 7 meses del control reflejaron una tendencia hacia metabolismo “CAM obligado” con diferencias significativas sólo entre periodos del día ($F = 6.7631$; $p = 0.00806$), particularmente entre las 16-20 h y las 24-4 h ($p = 0.0063$). La mayor concentración de ácido almacenado (0.045 meq g^{-1}) se registró en el periodo de 24 a 4 h, correspondiendo totalmente con lo obtenido en la tasa de asimilación de CO_2 . Comparando con los brotes *in vitro* de KIN se observó que las concentraciones de ácido son significativamente menores que las registradas en brotes de KIN 2 en MS 100% ($p = 0.0034$) y KIN 3 en MS 100% ($p = 0.0016$). La diferencia de concentraciones con respecto al resto de los tratamientos no fue significativa.

La concentración de ácido málico en brotes regenerados de 12 meses procedentes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L^{-1} se observa en la Gráfica 5.

La concentración de ácido cuantificada en los brotes enraizados provenientes de los tratamientos 2iP 1, tanto en MS 50% como en MS 100% se encuentra estrechamente relacionada a la tasa de asimilación de CO_2 registradas en ambos tratamientos, siendo su metabolismo predominantemente de tipo “CAM obligado”. La mayor cantidad de ácido se almacenó durante el periodo nocturno (24 a 4 h), en 2iP 1 y MS 50% fue de 0.036 meq g^{-1} y en 2iP 1 MS 100% de 0.06 meq g^{-1} , lo que corresponde con la mayor tasa de asimilación de CO_2 en MS 50% (10.44 ppm a las 24h) y en MS 100% (26.51 ppm a la misma hora). Un hecho interesante es que la concentración de ácido en el tejido prácticamente se duplica al duplicar también la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

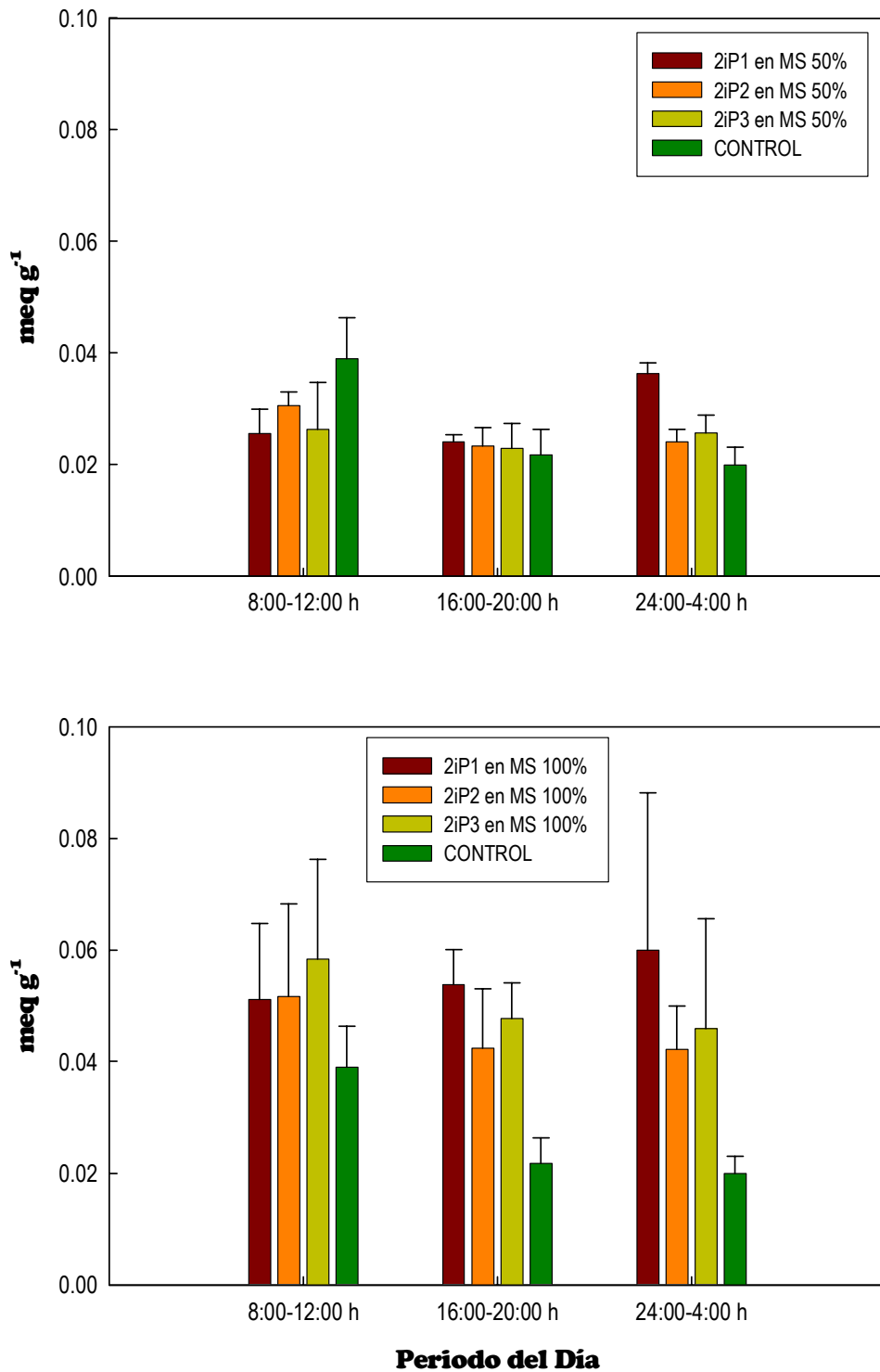
Por otra parte, los brotes procedentes de 2iP 2 en MS 50% y 100% mostraron una ligera fluctuación de ácido durante el periodo diurno, lo que contrasta con la asimilación de CO_2 ya que en ambas concentraciones de MS se registró una tasa muy baja e incluso negativa en los brotes de MS 100%. El hecho de que sean “CAM inútil” significa que los estomas permanecen cerrados todo el tiempo, por lo tanto la fluctuación de ácido en el tejido se deba más que nada a la refijación o reciclamiento de CO_2 que se encuentra en los espacios intercelulares.

Finalmente, en los brotes de los tratamientos 2iP 3 en ambas concentraciones de MS también se observó un comportamiento de tipo “CAM obligado” ya que la mayor concentración de ácido se registró durante las primeras horas del día (8 a 12 h) y fue

disminuyendo en los periodos posteriores, correspondiendo con lo obtenido en las tasas de asimilación de CO₂.

Las diferencias de concentración entre los periodos del día no son significativas, pero sí lo son entre tratamientos ($F= 20.2961$; $p= 0.0000$). Según Garrido (1998) durante la removilización diurna del malato procedente de las vacuolas, éste es descarboxilado para formar CO₂ por un lado y esqueletos de carbono por otro. El CO₂ es fijado enzimáticamente a la RuBP por la Rubisco para ser reducido a carbohidratos en el ciclo de Calvin-Benson, mientras que los esqueletos de carbono forman más moléculas de CO₂ que es reasimilado por la PEPC y forma de nuevo malato que es almacenado en las vacuolas. Esta puede ser la razón principal por lo que las fluctuaciones de ácido málico no varían significativamente.

Al igual que en los tratamientos KIN, se observa una mayor concentración de ácido en los brotes enraizados en medio MS 100% que en los de MS 50%, ya que en los últimos, los valores oscilaron entre 0.02 y 0.04 meq g⁻¹, mientras que en los primeros los valores van de 0.04 a 0.06 meq g⁻¹, registrándose diferencias significativas entre ambas concentraciones de sacarosa (Anexo III, Tabla 6). Según Fuentes *et al.* (2005), la presencia de sacarosa en el medio nutritivo de plántulas de coco cultivadas *in vitro* como fuente artificial de carbono provoca que el tejido almacene el exceso de carbono en forma de almidón, el cual, al momento de transferir las plántulas a invernadero funciona como fuente de energía para desarrollar tejido y órganos nuevos más resistentes a las nuevas condiciones ambientales. Por lo tanto, en el caso de los resultados obtenidos para *E. grusonii*, una posible explicación del permanente almacenamiento de ácido málico en el tejido, con mayores concentraciones en brotes enraizados en MS 100% (Figura 10B), es que las plántulas utilizarán esa energía extra durante la fase de transferencia *ex vitro* para formar tejido más resistente al cambio de las condiciones ambientales.



Gráfica 5. Concentración de ácido málico en brotes *in vitro* de 12 meses obtenidos con los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

La concentración de ácido málico obtenida en el control de 12 meses presentó diferencias significativas entre horas ($F= 23.485$; $p= 0.0000$) y tuvo una tendencia hacia el metabolismo “CAM obligado” con una ligera alternancia hacia C_3 ya que la concentración de ácido almacenado en el periodo de 8 a 12 h fue significativamente mayor que la concentración almacenada de 16 a 20 h ($p= 0.0003$) y de 24 a 4 h ($p=0.0002$). Este resultado concuerda con lo obtenido en la tasa de asimilación de CO_2 .

En este caso, los brotes 2iP 1 ($p= 0.0001$), 2iP 2 ($p= 0.0002$) y 2iP 3 ($p= 0.0001$) en medio MS 100% presentaron una concentración significativamente mayor que las plántulas control, lo que coincide con lo obtenido por Malda *et al.* (1999b), quien encontró picos nocturnos de acidez durante el periodo nocturno en brotes de *Coryphantha minima*, esta acidez nocturna fue mayor en dichos brotes que en plantas mantenidas en condiciones *ex vitro*.

C. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El porcentaje de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los brotes de 7 meses procedentes de los tratamientos hormonales KIN 1, 2 y 3 $mg L^{-1}$ se observa en la Gráfica 6.

El mayor porcentaje de clorofilas *a+b* se registró en los brotes provenientes del tratamiento KIN 1 en MS 50% (2.861%) y en MS 100% (2.41%), así como en el tratamiento KIN 2 en MS 100% (2.5%).

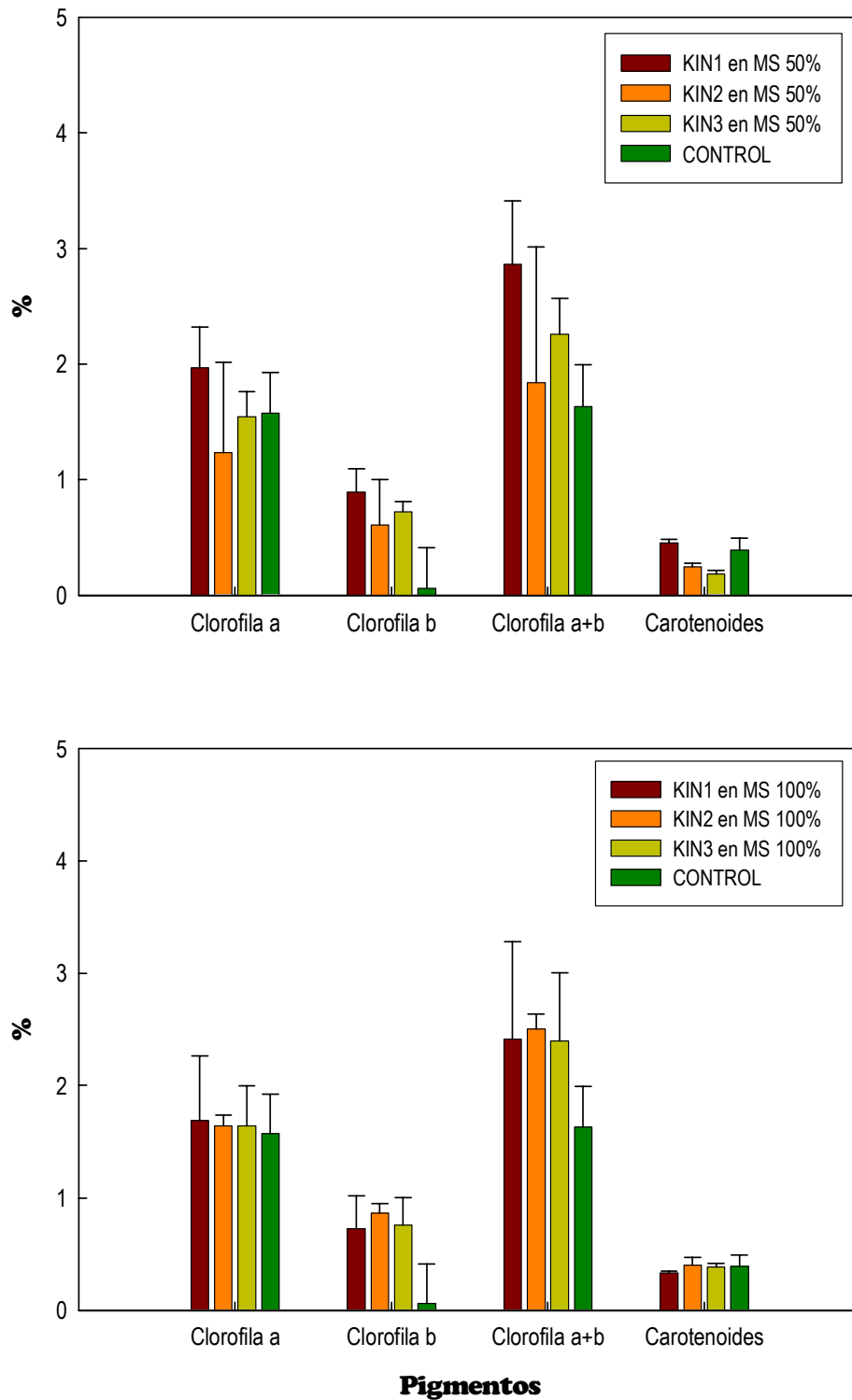
En todos los brotes de KIN enraizados en MS 100%, el porcentaje de clorofila *a* y clorofila *b* por separado fue similar, las diferencias no fueron significativas. Contrario a lo observado en los brotes de MS 50%, donde los porcentajes de ambos tipos de clorofila se diferenciaron significativamente entre tratamientos hormonales ($F= 32.6916$; $p= 0.0000$), siendo KIN 1 el que presentó los mayores porcentajes (1.97% de *Ca* y 0.893% de *Cb*) y KIN 2 el que mostró los más bajos (1.23% de *Ca* y 0.61% de *Cb*). En cuanto al porcentaje de carotenoides, los brotes enraizados en MS 100% no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos hormonales, con valores similares (0.33% en KIN 1, 0.4% en KIN 2 y 0.38% en KIN 3).

De la misma forma, en los brotes del medio MS 50% la diferencia de porcentajes entre tratamientos fue significativa, siendo KIN 1 el tratamiento con el mayor porcentaje (0.45%) y KIN 3 el que presentó el más bajo (0.18%). La diferencia de porcentajes

entre ambas concentraciones de sacarosa en el medio fue más evidente en el tratamiento KIN 2 con un valor más alto en MS 100% (2.5% de Ca+b) que en MS 50% (1.84% de Ca+b), así como en KIN 2 y KIN 3 con el porcentaje de carotenoides más alto en MS 100% (0.4% en KIN 2 y 0.38% en KIN 3) que en MS 50% (0.24% en KIN 2 y 0.18% en KIN 3).

Con respecto al control, los brotes procedentes de los tratamientos KIN 3 en MS 50% y KIN 1, 2 y 3 en MS 100% mostraron un porcentaje de clorofila *a* aproximado (entre 1.5 y 1.6%) sin diferencias significativas. Mientras que los brotes de los tratamientos KIN 1 en MS 50% presentaron un porcentaje de Ca significativamente mayor que el control ($p= 0.0028$) y KIN 2 en MS 50% fue significativamente menor que el control ($p= 0.0149$) en el mismo tipo de pigmento. El porcentaje de clorofila *b* de las plantas control fue significativamente menor que en los brotes de los tres tratamientos hormonales y ambas concentraciones de sacarosa en el medio. Así mismo, el porcentaje de las clorofilas *a+b* fue mayor en los brotes que en las plantas del control ($F= 15.1545$; $p= 0.0000$).

En general se registraron diferencias significativas entre tratamientos ($F= 32.6916$; $p= 0.0000$), entre tipo de pigmentos ($F= 440.1693$; $p= 0.0000$) (Anexo III, Tabla 7) y en la interacción de ambos ($F= 4.9395$; $p= 0.00007$). El tratamiento KIN 2 en MS 100% sólo fue significativamente mayor que los tratamientos KIN 1 y KIN 3 en MS 100% y KIN 3 en MS 50% (Anexo III, Tabla 8). Los porcentajes obtenidos en el control fueron significativamente diferentes entre tipos de pigmentos ($F= 12.8581$; $p= 0.00199$). El porcentaje de clorofila *a* fue mucho mayor que el de clorofila *b* ($p= 0.02197$) y el de carotenoides ($p= 0.0378$), a su vez, el porcentaje de clorofilas *a+b* fue significativamente mayor que el de carotenoides ($p= 0.0064$). El control se diferenció de los brotes de los tratamientos KIN 1 ($p= 0.0028$) y KIN 2 ($p= 0.0149$) en MS 50% y KIN 2 ($p= 0.00069$) en MS 100%.



Gráfica 6. Porcentaje de pigmentos fotosintéticos en brotes *in vitro* de 7 meses obtenidos con los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

El porcentaje de pigmentos en los brotes provenientes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹ se muestran en la Gráfica 7. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (F= 13.0569; *p*= 0.0000), entre tipo de pigmentos (F= 117.1441; *p*= 0.0000) (Anexo III, Tabla 9) y en la interacción entre ambos (F= 2.0486; *p*= 0.0358).

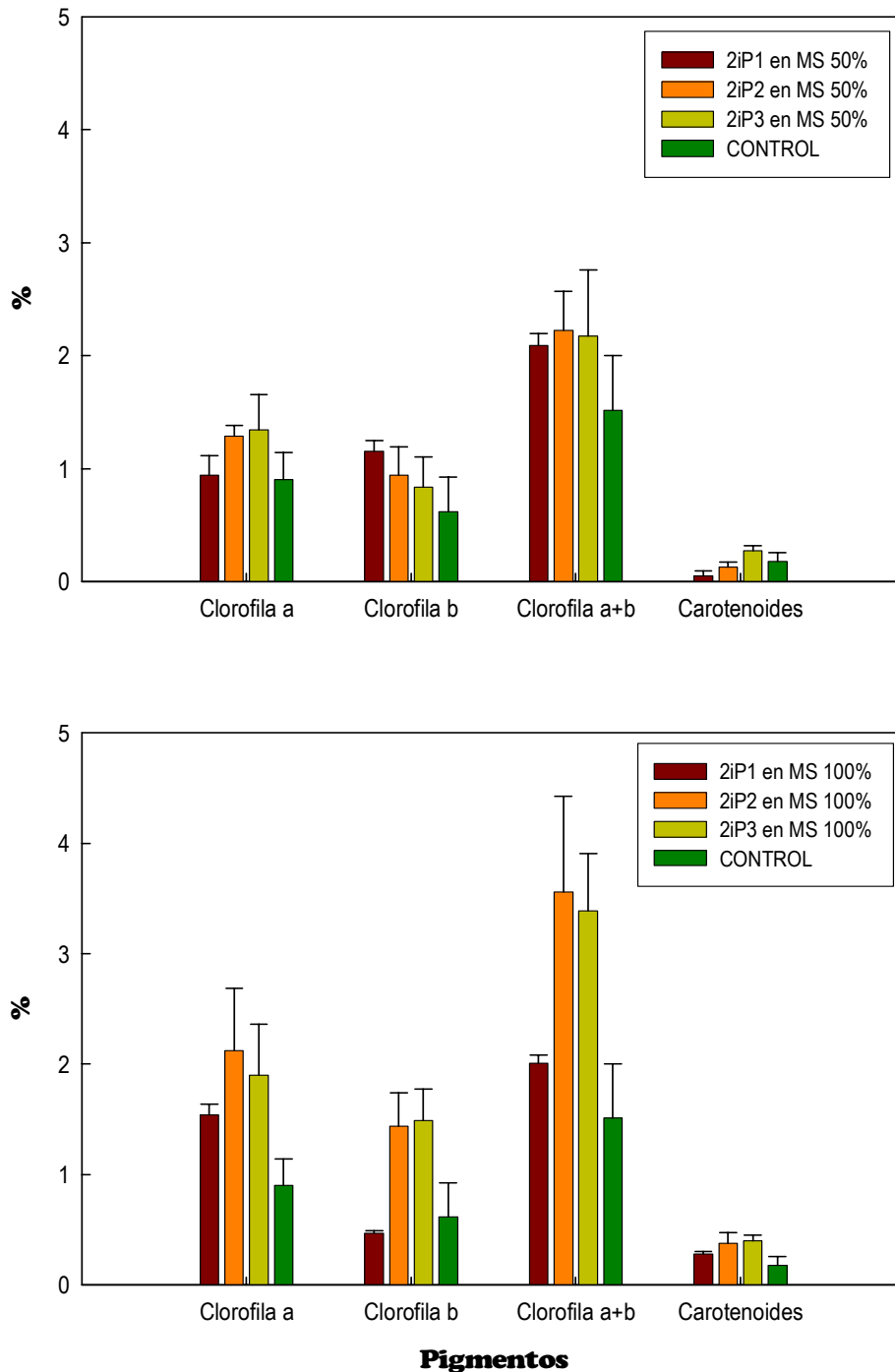
Los brotes del tratamiento 2iP 1 en ambas concentraciones de sacarosa presentaron un porcentaje de clorofilas *a+b* muy semejante (2.09% en MS 50% y 2.01% en MS 100%), sin embargo, la proporción de clorofilas fue diferente en cada caso, ya que, mientras en 2iP 1 en MS 50% el porcentaje de *Ca* (0.94%) fue menor que el de *Cb* (1.15%), en 2iP 1 MS 100%, el porcentaje de *Ca* (1.54%) fue significativamente mayor al porcentaje de *Cb* (0.47%).

Por otro lado, en los brotes de los tratamientos 2iP 2 y 2iP 3 en ambas concentraciones de sacarosa se registraron los más altos porcentajes de clorofilas *a+b*, siendo significativamente mayores los de MS 100% (Anexo III, Tabla 10). No obstante, la diferencia entre ambos tratamientos hormonales no fue significativa pues en MS 50% se observó un 2.2% de *Ca+b* en brotes procedentes de 2iP 2 y un 2.17% en brotes de 2iP 3, mientras que en MS 100% los porcentajes registrados fueron 3.5% en 2iP 2 y 3.4% en 2iP 3.

Los porcentajes de *Ca* y *Cb* en ambos tratamientos hormonales, tanto en MS 50% como en MS 100% mostraron una mayor proporción de *Ca* que de *Cb*. El porcentaje de carotenoides observado en los brotes enraizados en MS 50% fue significativamente menor que el de los brotes del medio MS 100%. El tratamiento 2iP 1 tuvo el menor porcentaje (0.047% en MS 50% y 0.28% en MS 100%) con respecto a los tratamientos 2iP 2 y 2iP 3.

Comparando, en los brotes enraizados de los tres tratamientos de 2iP en ambas concentraciones de sacarosa se observó un porcentaje de clorofilas *a+b* significativamente mayor que en las plantas del control, principalmente los brotes de los tratamientos 2iP 2 (*p*= 0.00013) y 2iP 3 (*p*= 0.00013), con los cuales la diferencia fue más marcada. En el caso del tratamiento 2iP 1 en MS 50%, el porcentaje de *Ca* (0.94%) no difirió significativamente del porcentaje de *Ca* del control (0.9%). En cambio, el tratamiento 2iP 1 en MS 100% mostró un porcentaje de *Cb* (0.47%) menor que el del control (0.62%). Además, la cantidad de carotenoides registrados en el control (0.17%)

fue mayor que en los brotes de los tratamientos 2iP 1 MS 50% (0.047%) y 2iP 2 MS 50% (0.12%).



Gráfica 7. Porcentaje de pigmentos fotosintéticos en brotes *in vitro* de 12 meses obtenidos con los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹.

El porcentaje de pigmentos registrado para las plantas del control presentó diferencias significativas entre pigmentos ($F= 19.1271$; $p= 0.000004$), ya que el porcentaje de carotenoides fue significativamente menor que el porcentaje de clorofila *a* ($p= 0.0038$) y las clorofilas *a+b* ($p= 0.0002$).

Anicua y Rivas (2000) encontraron una mayor concentración de pigmentos en plantas *in vivo* de *Mammillaria bocasana* y *M. carmenae* que en brotes regenerados *in vitro*, contrario a lo obtenido en este trabajo para *E. grusonii* ya que en general, el porcentaje de pigmentos en las plantas control fue menor que el obtenido en los brotes regenerados y enraizados *in vitro*. De acuerdo a Garrido (1998) la baja intensidad lumínica provoca una mayor síntesis de clorofila alrededor del fotosistema II (PSII) para hacer más eficiente la absorción de luz, por lo tanto, en los brotes que se encuentran en condiciones *in vitro* el incremento del contenido de clorofila está en función de la disposición de luz.

Por otro lado, Gaspar *et al.* (1996) reporta que las citocininas promueven la síntesis de clorofila, lo cual es reafirmado en Taiz y Zeiger (2006) al aplicar este tipo de hormonas a hojas etioladas en ausencia de luz, encontrando que éstas forman cloroplastos activos y sintetizan clorofila y enzimas fotosintéticas en una mayor tasa que hojas normales expuestas a la luz. Esto sugiere que el uso de KIN y 2iP como inductores para la producción de brotes de *E. grusonii* tiene un efecto a largo plazo en la producción de clorofilas aún durante la etapa de aclimatización *in vitro* donde la exposición a los reguladores de crecimiento externos ya es nula.

Para finalizar, en la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos para cada evaluación fisiológica en los brotes regenerados y enraizados *in vitro* de *Echinocactus grusonii*. Además, se muestra el tipo de metabolismo fotosintético propuesto para cada tratamiento evaluado.

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en cada evaluación fisiológica de los brotes regenerados y enraizados *in vitro* de *E. grusonii*. En la última columna se indica el tipo de metabolismo fotosintético propuesto para cada tratamiento evaluado de acuerdo a lo obtenido principalmente por la tasa de asimilación de CO₂.

TRATAMIENTO HORMONAL PREVIO mgL ⁻¹	MEDIO DE ENRAIZAMIENTO (ACLIMATIZACIÓN <i>in vitro</i>)	Tasa de asimilación de CO ₂ (ppm)			Concentración de ácido málico (meq g ⁻¹)			% de pigmentos fotosintéticos			Tipo de Metabolismo
		Mañana	Tarde	Noche	Mañana	Tarde	Noche	Clo a	Clo b	Crt	
KIN 1	MS 50% (7 meses)	0.114±6.75	-8.513±1.86	6.323±4.94	0.039±0.006	0.037±0.004	0.038±0.013	1.969±0.35	0.893±0.20	0.451±0.03	CAM obligado
KIN 2		6.151±7.19	1.167±3.12	4.201±3.43	0.037±0.008	0.033±0.006	0.037±0.005	1.231±0.78	0.608±0.39	0.247±0.03	
KIN 3		8.167±10.98	3.656±3.28	-1.208±1.25	0.037±0.005	0.042±0.002	0.034±0.003	1.543±0.22	0.718±0.09	0.184±0.03	
KIN 1	MS 100% (7 meses)	1.459±1.99	-2.411±8.31	-3.989±1.51	0.046±0.005	0.043±0.001	0.054±0.013	1.689±0.57	0.725±0.29	0.331±0.02	CAM cíclico
KIN 2		4.163±6.61	-8.609±10.83	2.188±3.32	0.054±0.018	0.046±0.004	0.046±0.006	1.640±0.09	0.863±0.09	0.401±0.07	
KIN 3		11.545±2.09	-5.104±4.69	2.850±5.59	0.049±0.008	0.061±0.011	0.057±0.018	1.639±0.36	0.759±0.24	0.384±0.03	
CONTROL	Plántulas (germinación de semillas)	-1.485±1.88	-3.721±2.21	18.202±8.91	0.036±0.005	0.030±0.008	0.045±0.007	1.573±0.35	0.058±0.35	0.393±0.10	CAM obligado
2iP 1	MS 50% (12 meses)	-6.329±2.50	3.762±3.42	5.587±7.62	0.025±0.004	0.024±0.001	0.036±0.001	0.941±0.17	1.150±0.09	0.047±0.05	CAM obligado
2iP 2		-3.611±8.001	-1.266±9.42	2.695±6.95	0.030±0.002	0.023±0.003	0.024±0.002	1.284±0.09	0.941±0.25	0.125±0.05	CAM inútil
2iP 3		-9.414±14.27	8.988±4.77	18.674±4.29	0.026±0.008	0.023±0.004	0.026±0.003	1.341±0.31	0.833±0.27	0.275±0.04	CAM obligado
2iP 1	MS 100% (12 meses)	-12.941±5.52	-3.960±5.70	13.502±3.73	0.051±0.014	0.054±0.006	0.059±0.028	1.540±0.09	0.469±0.02	0.283±0.02	CAM obligado
2iP 2		-2.976±8.04	-15.775±5.75	-0.443±0.88	0.052±0.017	0.042±0.011	0.042±0.007	2.121±0.56	1.440±0.30	0.379±0.09	CAM inútil
2iP 3		-18.49±11.60	8.303±2.19	20.451±1.88	0.058±0.018	0.048±0.006	0.046±0.019	1.901±0.46	1.489±0.28	0.403±0.05	CAM obligado
CONTROL	Plántulas (germinación de semillas)	-19.747±8.74	-14.061±15.34	-0.625±4.78	0.039±0.007	0.022±0.004	0.019±0.003	0.899±0.24	0.616±0.31	0.175±0.08	CAM obligado

Mañana = 8 h - 12 h; Tarde = 16 h - 20 h; Noche = 24 h - 4 h

Clo a = clorofila a; Clo b = clorofila b; Crt = carotenoides

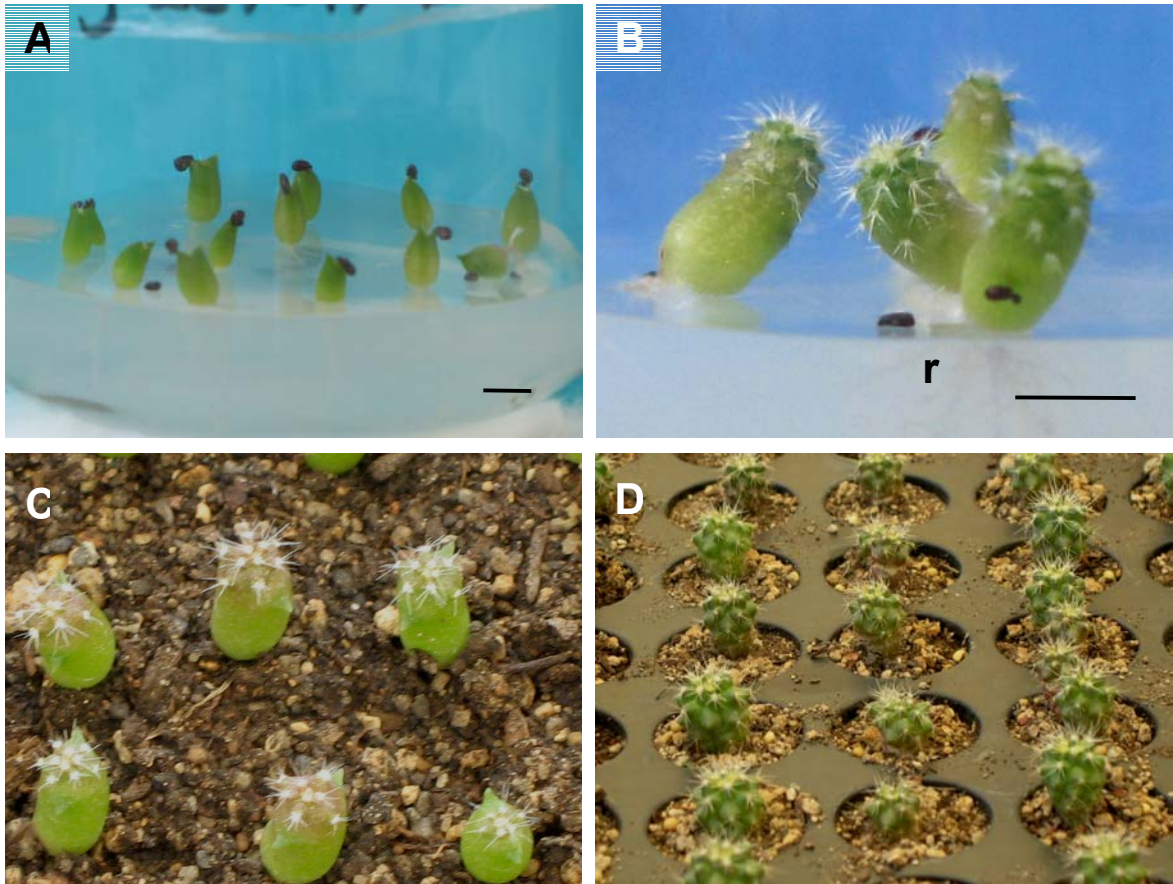


Figura 9. (A) Etapa inicial de la germinación *in vitro* de semillas de *Echinocactus grusonii*. Barra 0.5 cm (B) Desarrollo de las plántulas, raíz evidente (r) y epicótilo con aréolas y espinas. Barra 1.5 cm (C y D) Transferencia a condiciones *ex vitro* de las plántulas.

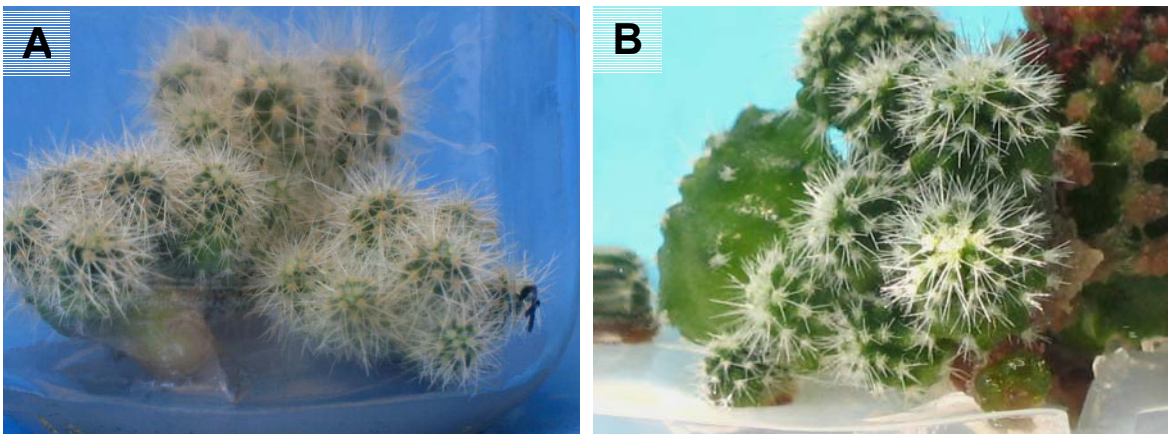


Figura 10. Aspecto de los brotes de *E. grusonii* regenerados por activación areolar de los diferentes tratamientos de 2iP (A) y de KIN (B) (Fotografía (A) cortesía de Marisol González Rodríguez).

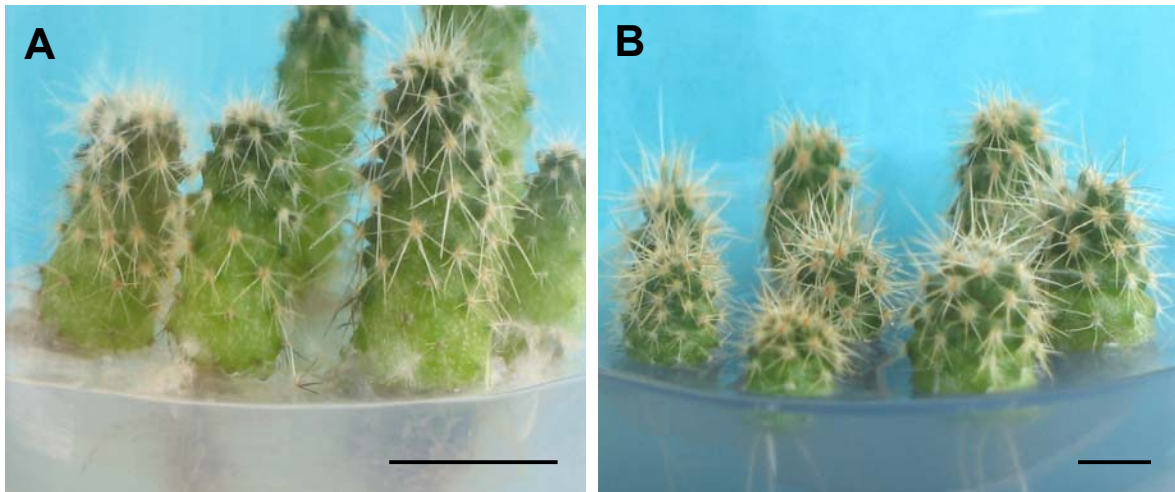


Figura 11. Aspecto general de los brotes procedentes de los distintos tratamientos ensayados que fueron individualizados y enraizados *in vitro*, durante la etapa de aclimatización en medio MS 50% (A) Barra 2.5 cm y MS 100% (B) Barra 1 cm.

VII. CONCLUSIONES

- La germinación *in vitro* permitió la obtención de plántulas en un período de tiempo más corto que la germinación *ex vitro*.
- La previa escarificación de las semillas de *E. grusonii* para la germinación *in vitro* aseguran un proceso de germinación exitoso y el desarrollo normal de las plántulas al quedar separadas de las testas de forma natural.

Tasa de asimilación de CO₂

- La presencia de datos negativos en el registro de asimilación de CO₂ se debe probablemente a la difusión del gas a través de la epidermis del tejido por las delgadas cutículas.
- No existió una influencia directa de la concentración de sacarosa en el medio de enraizamiento, sin embargo, los tratamientos hormonales previos si influyeron en la plasticidad del metabolismo CAM o CAM-C₃ de los brotes.

Concentración de ácido málico

- Contrario a lo observado en la tasa de asimilación de CO₂, en este parámetro se observó una mayor influencia de la concentración de sacarosa en el medio de enraizamiento que del tratamiento hormonal previo.
- Las concentraciones de ácido en el tejido fueron significativamente mayores en los brotes enraizados en MS 100% que con MS 50%.
- El exceso de carbono almacenado en forma de ácido málico puede representar energía que será utilizada durante la transferencia de los brotes a condiciones *ex vitro* para la formación de tejido nuevo y más resistente al cambio de ambiente.
- Las ligeras fluctuaciones de ácido entre periodos del día dependen en gran parte de la actividad PEPC/Rubisco que se este llevando a cabo en el tejido fotosintético al momento de captar el CO₂ ambiental o interno.

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

- En general, el porcentaje de pigmentos fue significativamente mayor en los brotes regenerados *in vitro* que en el control, principalmente las clorofilas *a* y *b*.
- Las citocininas aplicadas previamente en la inducción de los brotes tienen un efecto a largo plazo sobre la alta producción de clorofilas *a* y *b*, pues durante la aclimatización *in vitro*, la exposición del tejido a estos reguladores ya es nula.
- La baja incidencia de luz en las cámaras de incubación también influyó en los altos porcentajes de clorofilas.

Conclusión general

- En *Echinocactus grusonii* existe un efecto combinado durante la aclimatización *in vitro* de la concentración de sacarosa en el medio de enraizamiento y el tratamiento hormonal previo que actúa de diferente forma en cada uno de los parámetros evaluados. Esto confirma que las condiciones medioambientales a las que se encuentran expuestos los brotes regenerados *in vitro* definen la plasticidad de la expresión del metabolismo CAM o C₃ y el nivel de síntesis de los pigmentos fotosintéticos.

Es importante resaltar que Rodríguez (2006), al utilizar KIN durante la etapa de inducción de brotes en una concentración de 3 mg L⁻¹ obtuvo 244 brotes en total, de los cuáles el 15% presentaron anomalías morfológicas. Sin embargo utilizando las tres concentraciones de 2iP obtuvo un mayor número de brotes y con una mejor respuesta morfogénica, siendo 221 brotes con 1 mg L⁻¹, 271 brotes con 2 mg L⁻¹ y 280 brotes con 3 mg L⁻¹ de los cuales, del 96 a 99% presentaron una morfología normal. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, fueron los brotes de 2iP los que reflejaron un metabolismo fotosintético más aproximado al metabolismo CAM típico de la familia Cactaceae, lo que complementado con lo aportado por Rodríguez, el tratamiento más recomendable para realizar una exitosa propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* es el de 2iP en cualquiera de las tres concentraciones antes mencionadas. Ya que, además fueron los brotes que mostraron el mayor porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* (de 94 a 100%) después de su previa aclimatización *in vitro* en MS 50%.

Anexo I. Descripción botánica de *Echinocactus grusonii* Hildmann

De acuerdo a Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada (1991) y a Scheinvar (2004), *Echinocactus grusonii* es una planta solitaria de tallo grande, globoso, las más longevas son cilíndricas de 20 a 130 cm de altura, a veces producen brotes en la base, frecuentemente de 40 a 80 cm de diámetro, de color verde claro; ápice con lana amarilla. De 21 a 37 costillas, más bien delgadas y altas. Aréolas grandes, alargadas, distantes entre sí cerca de 1 cm, a veces más o menos confluentes, las cercanas al ápice con lana amarillenta. Espinas anuladas de color amarillo oro cuando jóvenes, después más pálidas, y las viejas con algo de tinte castaño. Espinas radiales de 8 a 10, subuladas, de 3 cm de longitud. Espinas centrales generalmente 4, hasta de 5 cm de longitud. Flores de 4 a 6 cm de longitud y 5 cm de diámetro, que no se abren ampliamente; pericarpelo esferoidal llevando escamas acuminadas que desarrollan en sus axilas abundante lana; tubo receptacular de 3 cm de diámetro, cubierto con escamas lanceoladas y largamente acuminadas; segmentos exteriores del perianto largamente acuminados, de color castaño en el envés y amarillo en el haz; segmentos interiores del perianto de color amarillo cadmio, con brillo sedoso, erectos, angostamente lanceolados, acuminados, más cortos que los exteriores; numerosos estambres, conniventes, formando un grueso cilindro en el centro, amarillos; estilo amarillo; lóbulos del estigma 12. Fruto oblongo hasta esférico, de 12 a 20 mm de longitud, de pared delgada, cubierta con escamas y lana blanca o desnudo hacia abajo. Semillas de 1.5 mm de longitud; testa brillante, de color castaño. Localidad tipo: El Infiernillo, en la Barranca del Río Moctezuma, Querétaro. Es una planta ornamental por el color amarillo de las espinas; se ha exportado en tan grandes cantidades que actualmente está casi extinta en su hábitat.

Anexo II. Formulación de los medios de cultivo MS y MS 50% (Murashige y Skoog, 1962)

	MS g L ⁻¹	MS 50% g L ⁻¹
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1.65	0.825
KNO ₃	1.90	0.95
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.37	0.185
KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.44	0.22
Micronutrientes		
KI	0.00083	0.000415
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
MnSO ₄ H ₂ O	0.01689	0.00845
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.0086	0.0043
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
Solución Fierro-EDTA		
Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.0139
Vitaminas		
Ácido nicotínico	0.0005	0.00025
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.0005	0.00025
Tiamina-HCl (B ₁)	0.0001	0.00005
Aminoácidos		
Inositol	0.10	0.05
Glicina	0.002	0.001
Sacarosa	30	15

Anexo III. Tablas de probabilidad de análisis estadístico de las evaluaciones fisiológicas.

Tabla 3. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre horas en la tasa de asimilación de CO₂ de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹

HORA	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
4 h						
8 h	0.9955					
12 h	0.1389	0.0429				
16 h	0.0446	0.1433	0.0001			
20 h	0.5551	0.8522	0.0017	0.7596		
24 h	0.9730	0.9999	0.0227	0.2315	0.9406	

Tabla 4. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre horas en la tasa de asimilación de CO₂ de plantas juveniles de 7 meses de edad (Control)

HORA	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
4 h						
8 h	0.3064					
12 h	0.3231	1.0000				
16 h	0.3366	0.9999	1.0000			
20 h	0.0525	0.8412	0.8227	0.8077		
24 h	0.0073	0.0006	0.0007	0.0007	0.0003	

Tabla 5. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre horas en la tasa de asimilación de CO₂ de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹

HORA	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
4 h						
8 h	0.0001					
12 h	0.0001	0.1462				
16 h	0.0080	0.0001	0.0420			
20 h	0.0001	0.0038	0.7721	0.5603		
24 h	0.8475	0.0001	0.0001	0.1743	0.0003	

Tabla 6. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre tratamientos en la concentración de ácido málico de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹

TRATAMIENTOS	2iP 1 MS 50%	2iP 2 MS 50%	2iP 3 MS 50%	2iP 1 MS 100%	2iP 2 MS 100%	2iP 3 MS 100%
2iP 1 MS 50%						
2iP 2 MS 50%	0.9970					
2iP 3 MS 50%	0.9862	0.9998				
2iP 1 MS 100%	0.0003	0.0001	0.0001			
2iP 2 MS 100%	0.0442	0.0002	0.0001	0.2309		
2iP 3 MS 100%	0.0027	0.0001	0.0001	0.9166	0.7949	

Tabla 7. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre porcentaje de pigmentos de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹

PIGMENTO	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a+b	Carotenoides
Clorofila a				
Clorofila b	0.00016			
Clorofila a+b	0.00016	0.00016		
Carotenoides	0.00016	0.00017	0.00016	

Tabla 8. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre tratamientos en el porcentaje de pigmentos de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos KIN 1, 2 y 3 mg L⁻¹

TRATAMIENTOS	KIN 1 MS 50%	KIN 2 MS 50%	KIN 3 MS 50%	KIN 1 MS 100%	KIN 2 MS 100%	KIN 3 MS 100%
KIN 1 MS 50%						
KIN 2 MS 50%	0.0001					
KIN 3 MS 50%	0.0488	0.0001				
KIN 1 MS 100%	0.0004	0.0002	0.4015			
KIN 2 MS 100%	0.9967	0.0001	0.0387	0.0012		
KIN 3 MS 100%	0.0078	0.0001	0.9751	0.8373	0.0261	

Tabla 9. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre porcentaje de pigmentos de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3 mg L⁻¹

PIGMENTO	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a+b	Carotenoides
Clorofila a				
Clorofila b	0.0050			
Clorofila a+b	0.0002	0.0002		
Carotenoides	0.0002	0.0002	0.0002	

Tabla 10. Análisis de comparaciones múltiples (Tukey, $p < 0.05$) entre tratamientos en el porcentaje de pigmentos de brotes enraizados en MS 50% y MS 100% provenientes de los tratamientos 2iP 1, 2 y 3. mg L⁻¹

TRATAMIENTOS	2iP 1 MS 50%	2iP 2 MS 50%	2iP 3 MS 50%	2iP 1 MS 100%	2iP 2 MS 100%	2iP 3 MS 100%
2iP 1 MS 50%						
2iP 2 MS 50%	0.9874					
2iP 3 MS 50%	0.9802	0.9999				
2iP 1 MS 100%	0.9998	0.9987	0.9972			
2iP 2 MS 100%	0.0004	0.0002	0.0003	0.0007		
2iP 3 MS 100%	0.0013	0.0007	0.0009	0.0025	0.9931	

Literatura Citada

- Altesor A, E Ezcurra y C Silva (1992).** Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. *Acta Oecol.* 13(6):777-785.
- Anderson EF (2001).** The Cactus Family (pp. 73, 83, 227-229). Timber Press, Portland, Oregon.
- Anicua FJ y RV Rivas (2000).** Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Arias TAA, MT Valverde y J Reyes (2001).** Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla (pp. 10, 11). Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, UNAM, México.
- Arias S, U Guzmán, MC Mandujano, M Soto 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. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 50 (4): 100-124.
- Bárcenas RT (2006).** Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas (CONABIO)* 68: 11-15.
- Becerra R (2000).** Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas (CONABIO)* 32: 2-5.
- Benítez H y P Dávila (2002).** Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas (CONABIO)* 40: 8-11.

Bravo-Hollis H y L Scheinvar (1995). El interesante mundo de las cactáceas (pp. 177-195) CONACYT, Fondo de Cultura Económica. México.

Bravo-Hollis H y H Sánchez-Mejorada (1991). Las cactáceas de México. Vol. II (pp. 85, 108) Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Buddendorf-Joosten JMC y EJ Woltering (1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. En: Lumsden PJ, Nicholas JR y Davies WJ (eds.) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture (pp. 165-190). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Collin HA y S Edwards (1998). Plant Cell Culture (pp. 121, 122). Springer, New York, EUA.

CITES. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (1995). Apéndices I, II y III. Washington, D. C. Departamento del servicio interno de pesca y vida silvestre de los Estados Unidos.

Cushman JC (2001). Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology* 127: 1439-1448.

Cushman JC y HJ Bohnert (1997). Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiology* 113: 667-676.

De La Rosa-Ibarra M y H García (1994). Estimulación de la germinación de cinco especies de Cactáceas consideradas en peligro de extinción. *Phyton* 56: 147-150.

Evans NE (1990). Micropropagation. En: Pollard JW y JM Walker (eds.) Methods in Molecular Biology Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture (pp. 93). Humana Press, New Jersey, EUA.

Fay MF (1994). In what situations in *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodiversity and Conservation 3: 176-183.

Fay MF y J Gratton (1992). Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. Bradleya 10: 33-43.

Fitz Maurice WA y B Fitz Maurice (2002). *Echinocactus grusonii*. En: 2006 IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org

Frías DP (1989). Desarrollo metodológico para la propagación vegetativa de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae), mediante cultivo de tejidos. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Fuentes G, C Talavera, Y Desjardins y JM Santamaría (2005). High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. Biologia Plantarum 49 (1): 7-15.

Garrido GMI (1998). Evaluación del metabolismo ácido de crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatación a suelo. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Garrido M y J Montiel (1999). Metabolismo Ácido de las Crasuláceas en *Chamacereus silvestrii* (Cactaceae) cultivada *in vitro* y durante su aclimatización al suelo. En: Libro de Resúmenes del 2º Congreso Mexicano y 1º Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, Oaxaca, México.

- Gaspar T, C Kevers, C Penel, H Greppin, DM Reid y T Thorpe (1996).** Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32: 272-289.
- Geydan TD y LM Melgarejo (2005).** Metabolismo Ácido de las Crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana* 10(2): 3-15.
- Guzmán U, S Arias y P Dávila (2003).** Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Hartmann HT, DE Kester, FT Davies y RL Geneve (1997).** Plant propagation: principles and practices (pp. 216, 276, 393, 394). Sexta Edición. Prentice Hall, New Jersey, EUA.
- Hazarika BN (2003).** Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85(12): 1704-1712.
- Hernández HM y HA Godínez (1994).** Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52.
- Hopkins WG (2004).** Introduction to Plant Physiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA.
- Kadlecek P, I Tichá, D Haisel, V Capkova y C Schäfer (2001).** Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- Kevers C, T Franck, RJ Strasser, J Dommès y T Gaspar (2004).** Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.

Lambers H, F Stuart y TL Pons (1998). Plant Physiological Ecology. Springer, New York, EUA.

Lizalde-Viramontes H, E Pérez-Molphe-Balch, ME Pérez-Reyes y C Dávila-Figueroa (2004). Propagación por técnicas de Cultivo de Tejidos de Cactáceas de los géneros *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*. En: Libro de Resúmenes del IV Congreso Mexicano y III Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, Guadalajara. México.

Loza S, T Terrazas, L López y C Trejo (2002). Características morfo-anatómicas y del metabolismo fotosintético de plántulas de *Stenocereus queretaroensis*. En: Libro de resúmenes del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre cactáceas y otras plantas suculentas, Tamaulipas. México.

Malda G, H Suzán y R Backhaus (1999a). *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71-87.

Malda G, RA Backhaus y C Martin (1999b). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 1-9.

Mandujano MC, J Golubov y J Reyes (2002). Lo que usted siempre quiso saber de las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. En: *Biodiversitas (CONABIO)* 40: 4-7.

Matekaire T (2001). Physiological differentiation of two varieties of sugar cane (*Sacharum spp.*) C-1051-73 and My-5514 under the influence of biotic and abiotic factors. Tesis de Maestría (Fisiología Vegetal). Universidad de la Habana. Cuba.

Murashige T y F Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.

Ortega-Baes P y H Godínez-Álvarez (2006). Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15: 817-827.

Pérez-Molphe-Balch E, ME Pérez-Reyes, E Villalobos-Amador, E Meza-Rangel, LR Morones-Ruiz y HJ Lizalde-Viramontes (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 131-135.

Phillips GC y JF Hubstenberger (1995). Micropropagation by proliferation of Axillary Buds (pp. 45-48, 53). En: Gamborg OL y GC Phillips (eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer, Berlin.

Phillips GC, JF Hubstenberger y EE Hansen (1995). Adventitious Shoot Proliferation (pp. 56, 64). En: Gamborg OL y GC Phillips (eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer, Berlin.

Pospíšilová J, I Tichá, P Kadlecěk, D Haisel y S Plizáková (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4): 481-497.

Premkumar A, JA Mercado y MA Quesada (2001). Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158:835-840.

Pulido AA (2006). Viajando al Santuario de Cactáceas de Charles Glass. En: *Succus. Boletín de difusión de la Sociedad Mexicana de Cactología*. 2 (1): 7.

Razdan MK (2003). Introduction to plant tissue culture (pp. 233, 243, 244). Science, Enfield, New Hampshire.

Reyes SJ, A Gutierrez de la Rosa y BJ Sevilla (2006). Producción de cactáceas y suculentas mexicanas. En: Succus. Boletín de difusión de la Sociedad Mexicana de Cactología 2 (2): 1-7.

Roberts AV, EF Smith y J Mottley (1990). The preparation of Micropropagated Plantlets for Transfer to soil Without Acclimatization (pp. 227-236). En: Pollard JF y Walker JM (eds.). Methods in Molecular Biology. Vol. 6. Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press, New Jersey, EUA.

Rodés R y M Collazo (2006). Manual de Prácticas de Fotosíntesis. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Rodríguez GM (2006). Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Lic. En Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Rojas-Aréchiga M y C Vázquez-Yanes (2000). Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments 41: 85-104.

Rosas LU (2002). Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM. México.

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). Phytom: 213-220.

Rubluo A (1990). Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de cactáceas en peligro de extinción. Biotam 1(4): 13-19.

Santos-Díaz M, R Méndez-Ontiveros, A Arredondo-Gómez y ML Santos-Díaz (2003). *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 39: 480-484.

Seelye JF, GK Burge y ER Morgan (2003). Acclimatizing tissue culture plants: reducing the shock. En: Combined Proceedings International Plant Propagators' Society. Vol. 53. Nueva Zelanda. 85-90.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación; Tomo 488:10. México.

Scheinvar L (2004). Flora Cactológica del Estado de Querétaro: Diversidad y Riqueza. Fondo de Cultura Económica. México.

Taiz L y E Zeiger (2006). Plant Physiology. 4a Ed. Sinauer, Massachussets, EUA.

Tapia D (2006). Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Lic. en Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Yao-Hong Z, G De-Ping, Z Zhu-Jun y Q Qiong-Qiu (2005). Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81: 105-108.

Ziv M (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants (pp. 45-69). En: Debergh PC y Zimmerman RH (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.