



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Thelocactus rinconensis*
(POSELGER) BRITTON Y ROSE (CACTACEAE)
ESPECIE ENDÉMICA AMENAZADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BERENICE DÍAZ RODRÍGUEZ

TUTORA: ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



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:

"Propagación in vitro de Thelocactus rinconensis (Poselger) Britton y Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada"

realizado por **Díaz Rodríguez Berenice**, con número de cuenta **099078045** 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. Alicia Enriqueta Brechú Franco

Tutor(a)
Propietario Dra. Ana Laura López Escamilla

Suplente Biól. Laura Patricia Olguín Santos

Suplente Dra. Margarita Collazo Ortega

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 10 de octubre del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA 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 CONACYT-CONAFOR-2003-C03-9951 “Propagación *in Vitro* de cactáceas amenazadas y/o en peligro de extinción del estado de Coahuila” por la beca proporcionada para participar como asistente en el proyecto y realizar el presente trabajo.
- ❖ A la Dra. Ana Laura López Escamilla por la dirección de este proyecto.
- ❖ 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*.
- ❖ Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por facilitar las instalaciones y equipo necesarios para la realización de este proyecto.
- ❖ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Sonia Vázquez Santana y M. En C. Karina Jiménez Duran, profesoras del Taller “Biología del Desarrollo y Función de las Estructuras Reproductoras en Cactáceas” por sus comentarios y sugerencias.
- ❖ A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco, Dra. Margarita Collazo Ortega y Biol. Laura Patricia Olguín Santos, por sus sugerencias y correcciones al trabajo escrito.
- ❖ A la M. En C. Ma. Eugenia Muñiz Díaz de León, técnico académico del Taller de Biología de Plantas I y II, por facilitar el uso de las instalaciones y equipo necesario para parte de la metodología en este trabajo.
- ❖ A la Dra. Clara Ezquivel Huesca y al M. En C. José Ricardo Wong del Laboratorio de Desarrollo en Plantas por sus sugerencias y aportaciones durante la realización de este trabajo.

Personales

- ❖ A mi Papá por no permitir que me rindiera a mitad del camino, por todo el amor y comprensión, por estar ahí viéndome escribir y escuchando mis avances, eres mi mejor asesor!!!. A mi Mamá por todo el amor y apapacho necesarios para tomar fuerzas y seguir adelante.
- ❖ A mi hermana linda y hermosa por impulsarme a tomar la gran decisión de estudiar esta linda carrera, y por supuesto por toda su asesoría a lo largo de la misma. Ahora te agradezco por compartir conmigo tus dos grandes regalos, que me hacen tan feliz (Valeria y Diego).
- ❖ A Rodrigo por la decisión tan acertada de tomar mi mano y caminar a mi lado en todo lo que hemos hecho juntos y en lo que venga (te amo).
- ❖ A mis dos queridas Asesoras Ana y Paty por no dejarme a la deriva y regañarme, e impulsarme a terminar mi trabajo, saben que más que asesoras, son como las mamás regañonas que necesitaba para tomar las riendas.
- ❖ A Maguecita por todo el apoyo académico y emocional que me dió en todo momento y sin necesidad de hacerlo.
- ❖ A Almitina por ser mi compañera de trabajo (casi asesora) y mi amiga incondicional, por reírte de todas mis tonterías, por apoyarme siempre que lo he necesitado, y pues no es una tesis doctoral como la tuya pero no quedó mal, no?
- ❖ A mis dos amigas inseparables, Ile y Mariana, por escucharme siempre, por estar ahí para mi, a pesar de que yo no pueda estar siempre para ustedes (saben que las amo), por los cafés eternos que tanto disfruto.
- ❖ A Memo y Eugenio por ser mis amigos, por hacerme reír tanto, por ser como son, tan auténticos...simplemente ustedes!
- ❖ A Benja, Ferita, Pili, Romy, Daniel, Laila, Diego, Tania y para los que no recuerdo en este momento, por tan buenos momentos juntos, por el baile, por las comidas, por el cigarrito...por la diversión!!!

Para mis Padres,
gracias por creer siempre en mi.
LOS AMO.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
• Diversidad de la familia Cactaceae	5
• Problemática en la conservación de la familia Cactaceae	5
• Estrategias de conservación	6
➤ Instituciones para la conservación de la Biodiversidad	6
➤ <i>In situ</i>	8
➤ <i>Ex situ</i>	8
• Cultivo de tejidos vegetales	10
➤ Reguladores de crecimiento	11
▪ Auxinas	11
▪ Citocininas	11
➤ Respuestas morfogénicas	12
➤ Micropropagación	13
➤ Problemas frecuentes en la micropropagación	16
➤ La micropropagación como estrategia de conservación	17
• Micropropagación en Cactáceas	17
• <i>Thelocactus rinconensis</i>	20
➤ Generalidades	20
➤ Problemática para su conservación	21
➤ Micropropagación en el género <i>Thelocactus</i> .	21
3. Justificación	22
4. Objetivos	22
• General	22
• Específicos	22
5. Materiales y Métodos	23
• Material biológico	23
• Desinfección superficial de semillas	23
• Siembra de semillas	23
• Elongación de plántulas (medio líquido)	24
• Obtención y siembra de explantes en medio MS con reguladores de crecimiento	24
• Enraizamiento y aclimatización	25

6. Resultados y Discusión	27
• Desinfección superficial de las semillas	27
• Germinación	27
• Elongación de plántulas (medio líquido)	29
• Respuestas morfogénicas	30
➤ Ensayo 1	30
▪ Callo	31
▪ Formación de brotes por activación areolar	33
✓ Brotes en explantes apicales	35
✓ Brotes en explantes laterales	36
✓ Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD)	38
➤ Ensayo 2	41
▪ Callo	41
▪ Formación de brotes por activación areolar	44
✓ Brotes en explantes apicales	45
✓ Brotes en explantes laterales	47
✓ Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD)	48
• Enraizamiento y Aclimatización	50
7. Conclusiones	53
8. Bibliografía	54
9. Anexos	61

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-[γ,γ -dimetilalilamino] purina
AIA	Ácido Indol-3-acético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
BA	Bencilaminopurina
BMD	Brotos morfológicamente diferentes.
CA	Carbón activado (1g L^{-1})
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CO ₂	Dióxido de carbomo
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad
K	Kinetina (6-furfurilaminopurina)
MS	Medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962)
MS 50%	Medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa
MS 50% + CA	Medio MS al 50% de sus componentes (macronutrientes, micronutrientes y sacarosa) con carbón activado 1g L^{-1}
MS líquido + CA	Medio MS líquido con carbón activado 1g L^{-1}
NOM-059-ECOL-2001	Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
TDZ	1-fenil-3-(1-2-3-tidiazol-5-YL) urea
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

RESUMEN

Se establecieron las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose, cactácea endémica del norte de México ubicada en la categoría de amenazada por la NOM-059-ECOL-2001. Se definió la técnica de desinfección de semillas y la mejor concentración citocinina/auxina para la formación de brotes, así como el establecimiento *ex vitro* de los mismos. A partir de plántulas de 0.5 a 2 cm de altura obtenidas a través de semillas germinadas asépticamente, se disectaron explantes apicales y laterales que se sembraron en Medio MS adicionado con dos citocininas bencilaminopurina y 6-[γ,γ -dimetilalilamino] purina (BA y 2iP) en diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 2, y 6 mg L⁻¹), solas o en combinación con una auxina ácido Naftalenacético (ANA 0 y 0.1 mg L⁻¹). Se observó que los explantes apicales tanto en BA/ANA como 2iP/ANA no generaron brotes en la mayoría de los tratamientos; en cambio los explantes laterales presentaron mayor capacidad morfogenética generando por lo menos un brote en cada explante. En una segunda repetición, incrementando la muestra, y en las mejores combinaciones ensayadas anteriormente, se obtuvo formación de brotes por activación areolar generando en promedio 4 brotes por explante apical tanto en 2iP/ANA como en BA/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ y en BA/ANA 1/0 mg L⁻¹ y en los explantes laterales entre 1 y 2 brotes promedio por explante en 2iP/ANA y BA/ANA 1/0.1 mg L⁻¹. Fue posible obtener, en los mejores tratamientos ensayados, entre 46 y 80 brotes, sumando un total de 343. En los dos tipos de explante se observó la formación de callo e hiperhidratación, siendo mayor en los explantes laterales con 85% y 64% respectivamente, que en los explantes apicales. El enraizamiento ocurrió espontáneamente entre los 3 y 6 meses, después de dos subcultivos en Medio MS con 1 mg L⁻¹ de carbón activado. Finalmente, 92% de los brotes enraizados sobrevivieron (318 brotes) al ser transferidos a suelo.

Palabras clave: Cactaceae, *Thelocactus rinconensis*, micropropagación, organogénesis, citocinina.

1. INTRODUCCIÓN

Las Cactáceas son una familia de plantas que habitan generalmente en zonas áridas y semiáridas, aunque también se les puede hallar en zonas subtropicales y en tropicales húmedas, donde habitan como epífitas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995); suelen tener tallos gruesos y carnosos, espinas, aréolas (yemas modificadas), flores vistosas y efímeras de brillantes colores, y algunas especies presentan frutos jugosos. Su forma globosa y robusta les permite almacenar el agua al mismo tiempo que disminuye la superficie de la planta expuesta al sol (Hernández y Godínez, 1994; Guzmán *et al.*, 2003).

La familia Cactaceae es originaria de América y comprende aproximadamente 2000 especies, distribuidas desde Peace River, en el norte de Canadá, hasta la Patagonia en Argentina (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). En México existen 913 taxones entre especies (669) y subespecies (244), agrupadas en 63 géneros, de las cuales 25 géneros, 518 especies y 206 subespecies son endémicas (Guzmán *et al.*, 2003).

El uso de las cactáceas en México es muy variado y se remonta a épocas anteriores a la Conquista; muchas especies eran usadas como fuente de alimento, forraje, materiales para la construcción y medicamentos (Becerra, 2000).

México se considera el país con la mayor diversidad de la familia (Becerra, 2000). Actualmente el uso más común que se les da a las cactáceas es como plantas ornamentales, lo que ha causado que sea uno de los taxa de plantas más amenazados en nuestro país, debido al saqueo indiscriminado al que han sido sometidas, provocando una sobreexplotación de las poblaciones silvestres (Becerra, 2002; Mandujano *et al.*, 2002); las poblaciones naturales de muchas especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, principalmente por la conversión de terreno para usos agrícolas y/o pecuarios (Hernández y Godínez, 1994). Esto ha obligado a que las cactáceas sean incluidas en listados internacionales como la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) o la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), en la que la familia completa está incluida en el Apéndice II y muchos de sus representantes están comprendidos en el Apéndice I (Hernández y Godínez, 1994); así como en normas nacionales como la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2002), que incluye 239 especies y 16 subespecies que se encuentran en alguna categoría de riesgo: 27 en peligro de extinción, 81 amenazadas y 157

sujetas a protección especial (Arias *et al.*, 2005). La finalidad de estos listados es que los países, con base en el grado de amenaza en que se encuentren las especies, propongan alguna estrategia de conservación.

Se han propagado varias especies de cactáceas con fines de conservación, utilizando métodos convencionales, a partir de semillas o sembrando los propágulos directamente en un sustrato; sin embargo muchas de ellas tienen tasas muy bajas de germinación (Velázquez y Soltero, 2001), aunado a que las plántulas son más susceptibles a la depredación y algunas requieren de una planta nodriza en las primeras etapas de desarrollo en condiciones naturales, por lo que es difícil que alcancen la edad adulta (Castro-Gallo *et al.*, 2002). Por otro lado, muchas de las especies no forman hijuelos, limitando así su propagación vegetativa.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales resultan una alternativa que puede contribuir a la conservación de esta familia, ya que es posible obtener grandes cantidades de plantas a partir de fragmentos de éstas (llamados explantes), los cuales se colocan en medios de cultivo asépticos adicionados de reguladores de crecimiento y que son mantenidos en condiciones ambientales controladas (luz, fotoperiodo e intensidad luminosa) (Dodds y Roberts, 1982; Hurtado y Merino, 1987; Jiménez, 1998; Velázquez y Soltero, 2001). Estas técnicas pueden convertirse en una herramienta importante para la producción masiva de cactáceas, evitando de esta manera, un mayor daño por sobreexplotación o por destrucción del hábitat (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

Thelocactus rinconensis es una cactácea endémica de México que se distribuye en los estados de Nuevo León y Coahuila, y está ubicada en la categoría de Amenazada por la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002). No existe información específica sobre la problemática de ésta especie, sin embargo se incluye en listados locales sobre conservación de especies de los estados de Coahuila y Nuevo León, además de que su demanda en otros países, como Alemania e Italia, parece ser alta (Hinton y Hinton, 1995; Vovides *et al.*, 1997; Mosco y Zanovello, 2002; Hernández *et al.*, 2004; Villareal-Quintanilla y Encina-Domínguez, 2005). Por lo anterior, en este trabajo se estudió la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos con la finalidad de propagar *in vitro* a *Thelocactus rinconensis*, especie endémica amenazada.

2. ANTECEDENTES

- **Diversidad de la familia Cactaceae**

La familia Cactaceae es endémica de América; abarca prácticamente todo el continente, desde Canadá hasta Argentina (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Becerra, 2000; Mandujano *et al.*, 2002). Esta familia se encuentra pobremente representada en el registro fósil, sin embargo, estudios realizados por especialistas consideran que el posible centro de origen de la familia es la zona tropical de Sudamérica y Centroamérica (Barthlott y Hunt, 1993). Aunque se pueden encontrar representantes de esta familia casi en cualquier tipo de ambiente, la mayoría se concentra en zonas áridas y semiáridas. En México una gran variedad de cactáceas ha conquistado las zonas del norte y centro del país, convirtiéndose en las plantas más representativas del paisaje mexicano (Becerra, 2000), por lo que se considera a México como el más importante centro de diversificación de la familia (Mandujano *et al.*, 2002), aparte de que presenta un número elevado de endemismos. Arias (1993) calcula que el grado de endemismo de especies es de 84%, mientras que Hernández y Godínez (1994) estiman que es de 78%. A pesar de que las cifras no son iguales, ambos trabajos coinciden en que el porcentaje de endemismos es muy alto en el país.

- **Problemática en la conservación de la familia Cactaceae.**

El uso de las cactáceas en México es muy variado y se remonta a épocas anteriores a la llegada de los españoles. Existen reportes de que en épocas prehispánicas los antiguos pobladores ya utilizaban a estas plantas como alimento, medicina o como materia prima para la construcción y elaboración de armas de caza y pesca, así como de diversas herramientas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Durante la conquista comenzó el saqueo de especies, ya que eran plantas muy hermosas y totalmente nuevas para ellos. Actualmente las especies de esta familia sufren presiones indirectas debido a cambios de uso de suelo para agricultura o ganadería, crecimiento de asentamientos humanos, el desarrollo industrial, la construcción de caminos y carreteras, la extracción de materiales de construcción, la construcción de presas y sobre todo la colecta ilegal de ejemplares para el comercio nacional e internacional (Hernández y Godínez, 1994; Becerra, 2000; Mandujano *et al.*, 2002). Por esta razón, actualmente muchas cactáceas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Glass, 1998).

Aunado a estos problemas, las cactáceas son de lento crecimiento y tienen ciclos de vida muy largos, sus semillas son depredadas por animales (muchos de ellos introducidos por el hombre, como el ganado caprino y bovino) y los ecosistemas naturales donde se distribuyen y crecen se encuentran en un proceso de degradación (Becerra, 2000; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Mandujano *et al.*, 2002).

Es por esto que se han implementado varias estrategias para la conservación y protección de las cactáceas y que han sido integradas a listados internacionales y nacionales que sirven como base para saber que especies es más urgente proteger por el grado de amenaza en el que se encuentran.

- **Estrategias de conservación.**

- Instituciones para la conservación de la Biodiversidad.

Se han elaborado listados en los que se agrupan las especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN, es un listado internacional en la que se provee el estatus de conservación de taxas que han sido globalmente evaluados, con la finalidad de determinar el riesgo relativo de extinción de especies, subespecies y variedades para que las autoridades de cada país involucradas en la toma de decisiones adopten las medidas de conservación necesarias (Página en red: The 2004 IUCN Red List of Threatened Species). Las cactáceas forman parte de este listado, incluyéndose en seis de sus nueve categorías: 1, en extinción; 23, en peligro crítico; 11, en peligro; 24, en vulnerable; 5, en casi amenazado; y 1 en datos insuficientes (Arias *et al.*, 2005).

La CITES, por su parte, regula el comercio de especies y está basado en un sistema de permisos y certificados que se otorgan cuando se cumplen ciertas condiciones. La preocupación principal de la convención es el impacto que el comercio internacional tiene sobre las poblaciones. Lo principal es asegurar que la comercialización de la especie no represente un riesgo o amenaza para la misma (Álvarez *et al.*, 2003a). Para ello, las especies están agrupadas en tres Apéndices: las especies incluidas en el Apéndice I se encuentran en peligro de extinción, por lo tanto su comercio se encuentra prácticamente prohibido y sólo pueden ser comercializadas en circunstancias excepcionales; las especies contenidas en el Apéndice II a pesar de que no se encuentran en peligro de extinción, su comercio debe regularse para evitar un uso que sea incompatible con su supervivencia; y en

el Apéndice III se encuentran las especies que son vulnerables al menos en un país miembro de la convención, el cual solicita la ayuda de los demás países miembros para controlar su comercio (Benítez y Dávila, 2002). Para que realmente exista una regulación del comercio de especies silvestres, se requiere de autoridades en cada país para vigilar su cumplimiento: la administrativa y la científica. En México quien tiene esas responsabilidades son la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad) como autoridad científica y la SEMARNAT como autoridad administrativa. Su deber es regular el comercio de las especies incluidas en la CITES con base en información comercial y científica, para asegurar así, el aprovechamiento sustentable y la conservación de dichas especies (Álvarez *et al.*, 2003b). La familia Cactaceae se encuentra incluida en el Apéndice II y en el Apéndice I algunas especies de los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Mammillaria*, *Obregonia*, *Pelecypora* y *Turbinicarpus*, entre otros (Hernández y Godínez, 1994).

En lo que se refiere a listados nacionales, la Ley General de Vida Silvestre (LGVS), la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) son los instrumentos legales que establecen las categorías de riesgo para especies nativas de México, y buscan la conservación y el establecimiento sustentable de la flora y fauna nacionales (Álvarez *et al.*, 2003b). En este último listado se encuentran 265 taxa, agrupados en tres de sus cuatro categorías: en peligro de extinción 27 especies, cuyas áreas de distribución o poblaciones se han reducido considerablemente; amenazadas 81 especies, que podrían llegar a desaparecer en corto o mediano plazo y finalmente, sujetas a protección especial 157 especies, que podrían estar amenazadas por factores que actúan negativamente en su viabilidad (SEMARNAT, 2002; Arias *et al.*, 2005).

Otros ejemplos de listados nacionales son los regionales en los cuales se categoriza también a las especies según su grado de amenaza en cada zona, con base en sus poblaciones. Tal es el caso del elaborado por Vovides en 1981, actualizado en 1988 y más recientemente en 1997 en donde incluye especies de plantas mexicanas silvestres y considera tres categorías: raras, amenazadas y en peligro de extinción. Además incluye la entidad federativa donde se encuentra la planta así como el tipo de vegetación que habita. En este listado se incluye a 155 especies de cactáceas, siendo la familia con mayor presencia en estos listados (Vovides

et al., 1997). Otros listado son los de Hernández *et al.* (2004) sobre las cactáceas del desierto Chihuahuense, el de Hinton y Hinton (1995) sobre la flora de Nuevo León y Coahuila y el de Villareal-Quintanilla y Encina-Domínguez (2005) sobre las plantas vasculares de Coahuila y algunas áreas adyacentes.

Los listados sirven para que las autoridades competentes de cada país propongan estrategias de conservación de las especies que se encuentren en algún grado de riesgo. La conservación es una disciplina dedicada a la preservación, rescate, mantenimiento, estudio y utilización de la biodiversidad y se puede realizar de dos maneras: *in situ* y *ex situ*, las cuales son complementarias, permitiendo garantizar la biodiversidad genética a mediano y largo plazo (Pezoa, 2001).

➤ *In situ*

Se define como la conservación, mantenimiento y recuperación de poblaciones viables en sistemas dinámicos y evolutivos del hábitat natural o en el caso de especies cultivadas, en el entorno donde se hayan desarrollado sus características (Pezoa, 2001). Para esto se debe considerar la genética y dinámica de las poblaciones, así como sus aspectos ecológicos, reproductivos y fisiológicos. La idea es pensar en términos de conservación y no de utilización de las especies (Falk, 1990).

Para la conservación de las cactáceas se han planteado varias alternativas. Tal es el caso de las Áreas Naturales Protegidas que comprenden los parques Nacionales y las Reservas de la Biósfera, éstas últimas son áreas representativas de uno o mas ecosistemas no alterados por la acción del ser humano o que requieran ser preservados o restaurados, en las cuales habitan especies representativas de la biodiversidad nacional, incluyendo a las consideradas endémicas, amenazadas o en peligro de extinción; ejemplos de Reservas de la Biósfera, en las cuales se encuentra un gran número de especies de cactáceas, son las de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), la de la Sierra Gorda (Querétaro), la de Cuatrociénegas (Coahuila) y la de la Barranca de Meztitlán (Hidalgo) (Página en red: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2005).

➤ *Ex situ*

Se define como la conservación de muestras genéticamente representativas de especies o cultivos que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de su hábitat natural, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas (Pezoa, 2001).

Es por esto que se recurre a la creación de jardines botánicos, bancos de germoplasma o a bancos de semillas para mantener a las especies *ex vitro*. Los jardines botánicos tienen la misión de rescatar y propagar las plantas en peligro de extinción, así como trabajar con las reservas biológicas para generar políticas de restauración ecológica y propagación de especies (Vovides *et al.*, 1997). Muchos jardines botánicos, centros de investigación y asociaciones civiles se han encargado de la conservación de las cactáceas. Tal es el caso del Cactario Regional y Jardín Botánico “Hernando Sánchez-Mejorada” en Querétaro, el Jardín Botánico de la Universidad de Guadalajara y el Jardín Botánico de la UNAM entre otros, en este último, según datos del Instituto Nacional de Ecología (INE), se encuentran ejemplares de 454 especies de la familia Cactaceae (Becerra, 2000). Estos jardines están encargados también de crear bancos de germoplasma y de semillas para la preservación de las especies.

Los bancos de germoplasma son colecciones de material vegetal vivo, ya sea la planta como tal o sus semillas, que requieren la interacción de varias estrategias. Sus funciones son localizar recolectar y conservar plantas consideradas de interés prioritario para nuestro país, y de esta forma contribuir con el conocimiento científico orientado a la optimización de la conservación (Fay, 1994).

El mantenimiento de bancos de germoplasma es necesario para los programas de mejoramiento genético. Existen dos tipos de conservación: el crecimiento mínimo y la crioconservación. En el primero lo que se hace es bajar el metabolismo a niveles mínimos, modificando factores como temperatura, concentración de nutrientes, reguladores de crecimiento y concentración osmótica. Sin embargo esta técnica requiere la realización de subcultivos frecuentes, lo que puede provocar contaminación del material vegetal o variación genética. En la crioconservación lo que se hace es mantener el material vegetal a muy bajas temperaturas (5 a 8 °C), deteniendo los procesos biológicos y eliminando las causas de variabilidad, por lo que se conserva por tiempo indefinido, en un espacio mínimo y a un menor costo. Para la crioconservación pueden utilizarse callo (masa de células indiferenciadas), suspensiones celulares, embriones, óvulos, anteras, polen, ápices y meristemas. La ventaja de utilizar tejidos como ápices y meristemas es que es más fácil que regeneren y sin riesgos de variación genética (Jiménez, 1998).

Los bancos de semillas son colecciones de semillas deshidratadas y conservadas en un ambiente a muy baja humedad y temperatura, asegurando su sobrevivencia por mucho tiempo. Es un método eficaz para preservar la diversidad genética, el cual se puede utilizar para investigación científica, para recuperar especies amenazadas o regenerar ecosistemas empobrecidos. Las ventajas de los bancos de semillas son la facilidad de mantenimiento de las semillas, la utilización de un espacio reducido para la conservación, la amplia variabilidad genética que contiene una muestra almacenada en un pequeño recipiente, la disponibilidad para uso inmediato de material proveniente de las más diversas localidades, y todo ello sin perjuicio alguno para las poblaciones naturales (Falk, 1990). Sin embargo es necesario hacer pruebas de viabilidad de las semillas, porque es posible que, dependiendo de la especie, después de un tiempo de almacenaje dejen de ser viables. La propagación por semilla resulta difícil por el tiempo que tarda en germinar y por el establecimiento de las plántulas (Fay, 1994).

Otra alternativa propuesta para la conservación de especies vegetales amenazadas, es la micropropagación de plantas por cultivo de tejidos vegetales y que ha sido utilizada con éxito en cactáceas.

- **Cultivo de tejidos vegetales.**

El cultivo de tejidos consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas (luz, humedad y temperatura) y químicas (nutrientes) apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Dodds y Roberts, 1982; Jiménez, 1998; Razdan, 2003).

El cultivo de tejidos se remonta a 1902 cuando Haberlandt con el fin de verificar la teoría celular de Scheleiden y Schwann (1838 y 1839) realizó el cultivo *in vitro* de células aisladas en un medio de cultivo que contenía sacarosa, asparagina y peptona, pero no observó división celular. Haberlandt concluyó que los cultivos posteriores deberían dirigirse al estudio de las condiciones bajo las cuales las células aisladas se dividen; decía que si las células vegetales son totipotentes, sería posible modificar su ambiente y nutrición después de aislarlas para observar mejor las secuencias del desarrollo de la planta de las que provenían estas células (Hurtado y Merino, 1987; Jiménez, 1998; González *et*

al., 2000). Esta es la base teórica en la que se sustenta la propagación *in vitro*, por lo que de cualquier parte de la planta teóricamente se pueden generar nuevas plantas (Dodds y Roberts, 1982).

Para poder propagar una planta *in vitro* es necesario que ésta sea potencialmente capaz de regenerarse, lo cual está determinado por el genotipo, las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de la planta. Las plantas jóvenes tienen mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas (Phillips *et al.*, 1994). Para obtener dicha respuesta se han aplicado reguladores de crecimiento, los más usados son las auxinas y las citocininas (Razdan, 2003).

➤ Reguladores de crecimiento.

▪ Auxinas

Éstas participan en varios procesos en las plantas como son la división celular y la organización de meristemos, elevando la desorganización de tejidos (callos) o diferenciando órganos (generalmente raíces), al igual que promueve la diferenciación del tejido vascular. En tejidos organizados, las auxinas son un elemento clave para mantener la dominancia apical, inhiben la abscisión, promueven la formación de raíces, retrasan la senescencia de las hojas y la maduración del fruto (Gaspar *et al.*, 1996). En el cultivo de tejidos vegetales las auxinas han sido utilizadas para estimular la actividad del cambium, ya que Snow en 1935 (citado por Razdan, 2003) demostró que el ácido indolacético (AIA) puede inducir esta respuesta. Más tarde Gautheret en 1959 (citado por González *et al.*, 2000; Razdan, 2003) encontró que la adición de auxinas favoreció la proliferación del cambium, permitiéndole realizar subcultivos. Actualmente las auxinas se utilizan con mucha frecuencia en la micropropagación, ya sea solas o en combinación con las citocininas, porque se ha observado que inducen la formación de raíces en los brotes resultantes de esta (Gaspar *et al.*, 1996; Orellana, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Aíra *et al.*, 2006).

▪ Citocininas

Promueven naturalmente el crecimiento de las yemas laterales y la expansión de las hojas, así como también retardan su senescencia, promueve la síntesis de clorofila y el desarrollo de cloroplastos (Gaspar *et al.*, 1996). En el cultivo de tejidos tienen dos funciones principales: la estimulación de la división celular (a menudo junto con las auxinas) y la

activación de las yemas laterales. También inducen la formación de yemas adventicias (Orellana, 1998; Malda *et al.*, 1999; Razdan, 2003).

La división celular es regulada por la acción de las auxinas y las citocininas, cada una de las cuales influye en diferentes fases del ciclo celular. Las auxinas afectan la replicación del DNA, mientras que las citocininas parecen ejercer algún control sobre los eventos encaminados a la mitosis y la citocinesis (Gaspar *et al.*, 1996). Así, altas concentraciones de auxinas provocan formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas inducen la formación de brotes, y concentraciones intermedias de ambas hormonas provocan la formación tanto de brotes como de raíces (Starling y Dodds, 1983). Es por esto que es importante tener cuidado en el balance y control de ambos reguladores de crecimiento, ya que dependiendo de las concentraciones que se utilicen será la respuesta morfogénica que se obtendrá (Gaspar *et al.*, 1996; Orellana, 1998; Razdan, 2003).

➤ Respuestas morfogénicas.

Las respuestas morfogénicas más comunes en el cultivo de tejidos vegetales son la organogénesis, la embriogénesis somática y la formación de callo.

La **organogénesis** es un evento morfogénico que se caracteriza por el desarrollo de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión celular entre el brote y el tejido materno. Es necesario un posterior enraizamiento de los brotes formados (Jiménez, 1998). Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o pasar por una fase de callo (organogénesis indirecta) (Starling y Dodds, 1983). Por lo tanto, para lograr la producción de una planta completa es necesaria una secuencia de medios ya que aquellos que favorecen la formación de brotes inhiben el desarrollo de raíces, y viceversa (Gaspar *et al.*, 1996). La organogénesis puede ocurrir a partir de yemas axilares o de la proliferación de yemas adventicias. El desarrollo de yemas axilares permite mantener intacto el genotipo de las plantas producidas con relación a la planta que les dió origen. Debido a que se forman a partir de meristemos, las plantas producidas se encuentran libres de microorganismos (Phillips *et al.*, 1994). La reactivación de las yemas axilares se basa en el rompimiento de la dominancia apical (control del crecimiento ejercido sobre las yemas laterales por la yema apical). La dominancia apical está dada por un incremento en la concentración de auxinas, provocando la supresión de las yemas laterales. Para la

proliferación de yemas axilares se utilizan las citocininas, que rompen la dominancia apical del brote (Gaspar *et al.*, 1996). La Bencilaminopurina (BA) es en general la citocinina más efectiva y la más empleada en la activación de yemas axilares, aunque también se han utilizado Kinetina, Zeatina y 6- γ , γ -dimetilalilamino purina (2iP) (Orellana, 1998).

La proliferación de yemas adventicias se basa en la teoría de que cualquier parte de la planta puede dar origen a otra, ya que es la formación *de novo* de yemas a partir de meristemas preexistentes, o tejido no meristemático, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citocininas. La desventaja es que una yema adventicia es fuente de variación genética debido a su propio origen unicelular, lo cual implica una desdiferenciación y una rediferenciación celular. Es en este proceso donde pueden ocurrir variaciones a nivel genético; sin embargo, se producen un mayor número de plantas por unidad de tiempo (Jiménez, 1998).

La **embriogénesis somática** es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Gómez, 1998b). Los embriones somáticos son estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Jiménez, 1998). La formación de embriones somáticos a partir de células, tejidos y órganos ocurre de manera directa o indirecta, al igual que la organogénesis, en gran parte por la acción inductora de auxinas y esporádicamente citocininas. Los embriones se pueden formar directamente a partir de una célula o un grupo de células, sin pasar por una fase de callo, o puede existir una desdiferenciación de los tejidos provocado por mitosis aceleradas, que conlleva a la formación de un callo (Gómez, 1998b). La embriogénesis somática posiblemente es el mejor ejemplo de expresión totipotencial en un gran número de plantas (Thorpe, 2000, citado por Phillips, 2004).

➤ Micropropagación

La micropropagación, definida como la propagación asexual o vegetativa *in vitro* de plantas, es una técnica del cultivo de tejidos vegetales que permite obtener una gran cantidad de plantas en un periodo corto de tiempo, además de que existe uniformidad en las plantas producidas facilitando su comercialización. Generalmente la formación de brotes a partir de meristemas existentes (apicales o axilares) es el sistema más sencillo de propagación *in vitro* (Jiménez, 1998; González *et al.*, 2000).

La micropropagación se divide en cinco fases que se describen a continuación.

Fase 0. Selección del material: consiste en la selección de la planta madre de la que se obtendrán los explantes. Es importante identificar las características morfológicas que se desean de la planta, porque es lo que se tomará en cuenta para micropropagarla o no. Debe ser material sano y libre de patógenos. Se recomienda que la planta madre se someta a un periodo de nutrición, luz y temperatura controlados o que provenga de un banco de germoplasma de alta calidad genética y fitosanitaria para que el explante sea más regenerativo (Dodds y Roberts, 1982; García y Noa, 1998).

Fase I. Establecimiento del explante: En esta fase lo importante es el tipo de explante y la selección adecuada de los reguladores de crecimiento, la diferenciación celular de las plantas está regulado por las auxinas y las citocininas, por lo tanto es importante su balance en la micropropagación: una alta concentración de citocininas y baja de auxinas forma brotes; concentraciones contrarias promueven la formación de raíces. Sin embargo no es necesario que el medio contenga estos dos tipos de reguladores, puede contener sólo uno de ellos que generalmente son las citocininas. La composición química y física del medio de cultivo también es importante, ya que es determinante para el éxito de los brotes que se obtengan. Generalmente los medios contienen concentraciones altas de nitrógeno, fósforo y potasio, niveles bajos de calcio y pH bajo, así como también se requiere de un agente gelificante que permita la absorción necesaria de nutrientes para el tipo de planta y explante (Hurtado y Merino, 1987; Orellana, 1998).

Fase II. Multiplicación: el objetivo de esta fase es la mayor producción de brotes o embriones somáticos a partir del explante. Estas respuestas se pueden originar de la activación de yemas apicales, axilares o adventicias, o partir de cualquier otra parte de la planta. Es en esta fase donde se corroborará el éxito de las dos fases anteriores, ya que una buena elección del material biológico y una adecuada concentración de reguladores de crecimiento traerá como consecuencia alta producción de brotes o de embriones somáticos, ya sea por vía directa o indirecta (Hurtado y Merino, 1987; González *et al.*, 2000). Sin embargo, la multiplicación de brotes no ocurre durante un número indefinido de cultivos y con un coeficiente de propagación estable a través del tiempo, con el número de subcultivos y la edad *in vitro* cambia la respuesta del explante. Generalmente ocurre que aumenta el número de brotes y la formación de yemas adventicias conforme aumentan los subcultivos;

el problema es que se incrementa también la frecuencia de aparición de variantes somaclonales. Es por esto que los sistemas de propagación *in vitro* a escala comercial renuevan los explantes cada cierto número de multiplicaciones, para evitar, de esta forma, los riesgos de variación genética (Orellana, 1998).

Fase III. Enraizamiento: en esta fase se promueve que cada uno de los brotes producidos en la fase anterior forme y desarrolle raíces y así iniciar la absorción de nutrientes al ser transplantados a un sustrato enriquecido. Existen dos estados en esta fase: la iniciación y la elongación. Para que ocurran se pueden utilizar reguladores de crecimiento, específicamente auxinas. Las auxinas más utilizadas son ANA, AIB y 2,4-D. Sin embargo, en algunos casos, no es necesario agregar una fuente externa de auxinas, debido a que los brotes jóvenes son una rica fuente de éstas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000; Castro-Gallo *et al.*, 2002). También se pueden cambiar las concentraciones de los componentes del medio y las condiciones físicas, como bajar la concentración de sales y aumentar la de sacarosa, utilizar medios líquidos, mayor intensidad de luz y temperaturas bajas (Orellana, 1998).

Fase IV. Aclimatización: la adaptación de las plantas de un medio *in vitro* al ambiente natural es un proceso difícil debido a que las plantas *in vitro* se encuentran bajo condiciones de alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en nutrientes, provocando un cambio en la morfología y fisiología de las plantas (Agramonte *et al.*, 1998). Las plantas *in vitro* tienen una cutícula delgada, pocas ceras epicuticulares, baja densidad estomática y mal funcionamiento de los estomas, cloroplastos con arreglo irregular de los sistemas internos de membrana, por lo tanto fotosíntesis alterada. Debido a esto, es necesario que la transferencia a suelo sea un proceso gradual, en el cual se vayan modificando las condiciones ambientales poco a poco, y la planta no sufra un estrés rápido y simultáneo. Para el reforzamiento de la planta *in vitro* se recomienda disminuir la humedad relativa, utilizando tapas permeables, incrementar la intensidad de la luz y la concentración de CO₂ con ventilación forzada, antes de hacer la transferencia al invernadero (Hurtado y Merino, 1987; Pospíšilová *et al.*, 1999).

➤ Problemas frecuentes en la micropropagación.

El éxito de la micropropagación depende en gran medida de contrarrestar al mínimo los efectos de tres problemas que afectan la respuesta morfogénica principalmente: la contaminación, la oxidación y la hiperhidratación de los explantes.

La contaminación microbiana es un problema común en el cultivo de tejidos vegetales, y puede originarse por el diseño del laboratorio donde se trabaja, por la edad del explante, o por la higiene ambiental o la habilidad y preparación técnica de quien la realiza. Los contaminantes más comunes en la micropropagación son hongos filamentosos, bacterias y levaduras que, aunque muchos no son patógenos de las plantas en condiciones naturales, *in vitro* si causan daños severos a los tejidos, provocando pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación. Las medidas para contrarrestar este problema han sido el incremento en las condiciones de asepsia, tratamiento de las plantas donantes, o subcultivos en medios de cultivo antimicrobianos sintéticos o naturales. Se recomienda encontrar la fuente precisa de contaminación y posteriormente una identificación taxonómica del organismo patógeno para que se le pueda atacar directamente (Alvarado, 1998, García y Noa, 1998).

La oxidación es un proceso químico que provoca un ennegrecimiento y deterioro de los tejidos por la acción de las enzimas oxidasas que contengan cobre, las cuales se liberan cuando las células sufren daño mecánico. La oxidación puede limitarse a una sola zona y no dañar a las demás células, como en la zona de corte del explante, o puede causar hasta la muerte del mismo. Es más severa en plantas que presentan muchos taninos y otros hidroxifenoles (Gaspar *et al.*, 2002). Hay varias formas de evitar la oxidación, como la eliminación de los compuestos fenólicos, modificación del potencial Redox, inactivación de la enzima fenolasa o la reducción de su actividad y disponibilidad del sustrato. Para eliminar los compuestos fenólicos se deben poner los explantes en agua corriente por 24 horas, o iniciar el cultivo en un medio líquido para que los compuestos fenólicos se difundan fácilmente. También se puede evitar añadiendo al medio carbón activado. Para reducir el potencial Redox se pueden usar agentes reductores, como ácido ascórbico, ácido cítrico o L-cisteína, inmediatamente después de la disección. La inactivación de la enzima fenolasa se logra agregando agentes quelantes (dimetilditiocarbonato) por su capacidad de atrapar iones (González *et al.*, 2000).

Finalmente la hiperhidratación es un desorden fisiológico en el tejido caracterizado por ser translúcido, con células turgentes, hipolignificado, y los tejidos frágiles. A nivel anatómico hay más agua en los espacios intercelulares; las traqueidas no están lignificadas, sin cutícula continua, ausencia de depósitos de ceras epicuticulares, pocos estomas que parecen no tener un mecanismo de cierre. Estas características anatómicas traen como consecuencia cambios a nivel bioquímico que eventualmente provocarán la muerte del tejido. La hiperhidratación es un fenómeno muy frecuente en la micropropagación debido a la alta humedad relativa que existe dentro del frasco que contiene el explante, al exceso de carbohidratos y minerales, a los altos niveles de reguladores de crecimiento (especialmente citocininas) y a la baja intensidad de luz. La manera en la que se ha reducido es incrementando los niveles de agar, mejorando el intercambio gaseoso, bajando la concentración de reguladores de crecimiento y de sales y minerales en el medio de cultivo y aumentando la intensidad luminosa (González *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Kevers *et al.*, 2004).

➤ La micropropagación como estrategia de conservación

A pesar de los problemas que se plantearon anteriormente, la micropropagación sigue siendo una excelente técnica para obtener una gran cantidad de plantas libres de patógenos con pequeñas cantidades de material inicial, en un menor espacio y tiempo. Son muchas las especies que se han propagado por esta técnica abarcando un gran número de familias de plantas con fines comerciales o con fines de conservación (Dodds y Roberts, 1982; Hurtado y Merino, 1987; Jiménez 1998).

Como ejemplos tenemos a la familia *Orchidaceae*, grupo de plantas severamente amenazadas de extinción por su belleza, en las que su propagación ha sido revolucionada por el uso de técnicas *in vitro*, sin necesidad de establecer la relación simbiótica con el hongo micorrízico para lograr la germinación exitosa de la semilla. Otros grupos de plantas que se encuentran en alguna categoría de riesgo son las pertenecientes a las familias *Asclepiadaceae*, *Crassulaceae*, *Euphorbiaceae* y *Cactaceae* en las que su micropropagación ha sido también exitosa (Fay, 1994).

- **Micropropagación en Cactáceas**

La micropropagación de las cactáceas se puede llevar a cabo gracias a que, al igual que otras angiospermas, tienen yemas axilares, que en el caso específico de las cactáceas se

desarrollan en las aréolas, y se pueden producir a partir de éstas prácticamente cualquier órgano, desde espinas hasta flores y frutos (Mauseth, 1979; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Rubluo, 1997).

Por medio de esta técnica se han propagado más de 35 especies de cactáceas, distribuidas en 20 géneros (Santos-Díaz *et al.*, 2003a), lo que representa aproximadamente el 1.8% del total de especies de la familia.

El primer reporte en cactáceas en el que obtuvieron brotes a partir de cultivo de callos fue elaborado por Kölar *et al.*, en 1976 (citado por Mauseth, 1979) con *Mammillaria woodsii*, y también obtuvieron buenos resultados en la etapa de enraizamiento. A partir de ese momento, se han llevado a cabo un número considerable de trabajos en los que se han propagado muchas especies de cactáceas, que generalmente se encuentran bajo algún riesgo; también para su comercialización tanto como plantas ornamentales como alimenticias. Mauseth (1979) fue el primero que reportó la propagación de cactáceas *in vitro* sin la fase de callo en *Hatiora salicornioides*.

Las especies de cactáceas que más se han propagado son las del género *Mammillaria* debido a la gran diversidad del género, a sus formas pequeñas, al color de sus flores, ya que son relativamente fáciles de cultivar y mantener (Rubluo, 1997).

Otras cactáceas se han micropropagado con gran éxito, debido principalmente a la adición de hormonas al medio de cultivo, la mayoría de los reportes indican que los reguladores de crecimiento más utilizados son las citocininas en concentraciones de 0.5 a 8 mg L⁻¹ y las auxinas en concentraciones de 0.05 a 0.5 mg L⁻¹ (Cuadro 1). Las citocininas más utilizadas han sido BA, K y 2iP, que promueven la formación de brotes axilares y adventicios. Pero la mayoría de los trabajos reportan que en donde se forma el mayor número de brotes es en aquellos tratamientos que contienen BA. En algunos casos la formación de brotes se ha logrado de manera indirecta, esto es a partir de un callo, lo cual implica una desdiferenciación y una rediferenciación celular. Ejemplos de esto son *Notocactus magnificus*, *Mammillaria elongata* y *Pelecyphora aselliformis*. En el Cuadro 1 se muestran algunos trabajos de la propagación *in vitro* de cactáceas.

Cuadro 1. Micropropagación de algunas especies de la familia Cactaceae.

Especie	Medio	Reguladores de crecimiento (mgL ⁻¹)	Respuesta morfogénica	Brotos por explante	Referencia
<i>Obregonia denegrii</i>	MS	BA (0.5) ANA (0.1)	Callo, ES, brotes axilares y adventicios	Ne	Malda <i>et al.</i> , 1999
<i>Coryphanta minima</i>	MS	BA (0.5) ANA (0.1)	brotos	Ne	
<i>Epithetalantha micromeris</i>	MS	K (8) 2iP (4) ANA (0.2)	brotos	14.5-17.5	Velázquez y Soltero, 2001
<i>Escobaria minima</i>	MS	ANA (0.54) TDZ(0.23)	brotos	3.6	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria elongata</i>	MS	ANA (0.2, 0.1) BA (5, 0.1)	brotos	10.3	Papafotiou <i>et al.</i> , 2001
<i>Mammillaria pectinifera</i>	MS	TDZ (2.27) ANA (0.5)	brotos	3.5	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria oteroi</i>	MS	BA (2)	brotos	5.3	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Thelocactus hexaedophorus</i>	MS	2iP (6)	brotos	13.6	
<i>Pachycereus pringlei</i>	MS	BA (1)	brotos	3.8	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<i>Stenocereus tuberi</i>	MS	BA (1)	brotos	4.3	
<i>Pelecypora aselliformis</i>	MS	BA (2) + 1%CA	brotos	4.9	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003a
<i>Turbincarpus laui</i>	MS	BA (0.5)	brotos	5	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003b
<i>Turbincarpus valdezianus</i>	MS	BA (0.5)	brotos	7.8	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005
<i>Notocactus magnificus</i>	MS	BA (1)	callo	6	Aíra <i>et al.</i> , 2006

Abreviaturas: ES: embriones somáticos; 2iP: 6-[γ,γ -dimetilalilamino] purina; ANA: Ácido Naftalenacético; BA: 6-Bencilaminopurina; CA: carbón activado; K: Kinetina; MS: medio Murashige y Skoog, 1962; TDZ: 1-fenil-3-(1-2-3-tidiazol-5-YL) urea; Ne: No especificado

- ***Thelocactus rinconensis***

- Generalidades.

Thelocactus rinconensis (Poselger) Britton y Rose (Anexo 1) pertenece a la familia *Cactaceae*, subfamilia *Cactoideae*, tribu *Cacteae*, género *Thelocactus*, el cual consta de 12 especies. *T. rinconensis* es endémica de México, específicamente de los estados de Coahuila y Nuevo León (Guzmán *et al.*, 2003) (Figura 1). Se encuentra en matorrales xerófilos en colinas de piedra caliza (página en red: Mosco, 2004). Generalmente es de hábito solitario, su forma es globosa o deprimida y su característica principal, al igual que las demás especies del género, es la presencia de tubérculos, que la distinguen de las especies del género *Ferocactus*, al cual son muy parecidas. Cuenta con cuatro subespecies: ssp. *hintoni*, ssp. *rinconensis*, ssp. *nidulans* y ssp. *freudenbergeri*. Debido a su forma globosa y al arreglo de las espinas (curvas) se le conoce comúnmente como biznaga, cactus nido de pájaro o pezón de la rinconada. Sus flores son muy hermosas de colores blanco, rosa o amarillo, dependiendo de la subespecie, y aparecen en la punta del tubérculo

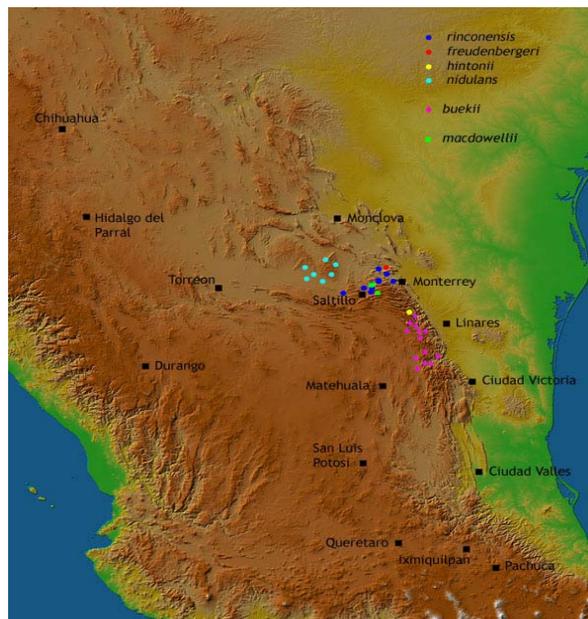


Figura 1. *Thelocactus rinconensis* en estado silvestre (superior) y distribución de sus subespecies (inferior) (Página en red: The genus *Thelocactus*).

durante el verano de manera intermitente (Mosco y Zanovello, 2002; páginas en red: Web shots; Cacti guide; World Wilde Life Fund).

➤ Problemática para su conservación.

No se cuenta actualmente con alguna referencia que describa la problemática particular de *T. rinconensis*, sin embargo, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana está ubicada en la categoría de **amenazada** (A) en el listado publicado en 1994 (Glass, 1998) y permanece en la misma categoría en el más reciente publicado en la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002). Por otra parte, la CITES incluye a esta especie en el Apéndice II (Glass, 1998). Al parecer la demanda de especies de todo el género es alta en Europa, especialmente en Italia y en Alemania, debido a la belleza de la planta y sobre todo de sus flores. El precio de una planta de entre 7 y 8 cm de diámetro es de 2.5 a 3.5 euros, lo que equivale a 36 o 50 pesos mexicanos (Páginas en red: Ciao! Die shopping community; Desert tropicals; Digilander; Infojardín; Ortega cactus; Top tropicals; Vendita on line di piante). De acuerdo con Glass (1998) es una especie relativamente fácil de cultivar a partir de semilla, pero su propagación por injerto generalmente no es muy práctica debido al gran tamaño de la planta. Por lo anterior, es necesaria la aplicación de técnicas novedosas que promuevan el rápido crecimiento, tales como el cultivo de tejidos vegetales.

➤ Micropropagación en el género *Thelocactus*.

De acuerdo a la información bibliográfica a la fecha no existe ningún trabajo publicado sobre propagación *in vitro* de *T. rinconensis*; los únicos reportes conocidos con otra especie del mismo género fue el realizado por Castro-Gallo *et al.* (2002) con *T. hexaedophorus*, donde el mejor resultado se obtuvo al aplicar la citocinina 2iP (6 mgL^{-1}), logrando obtener hasta 13.6 brotes por explante, generándose el mayor número de brotes en los tratamiento donde se utilizó 2iP comparado con los adicionados de BA (4.4 brotes); y el realizado con *T. bicolor* (Zamora, 2007), en el cual se obtuvo que el mejor tratamiento para la propagación de esta especie fue ANA (0.5 mgL^{-1}). La metodología propuesta para *T. rinconensis* se basó en este último trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al grado de amenaza y su comercio ilegal, es importante establecer técnicas alternativas para su propagación tal como el cultivo de tejidos vegetales, por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

4. OBJETIVOS

- **General**

Establecer las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis*.

- **Específicos**

- a) Germinar semillas de *T. rinconensis* en condiciones asépticas para el establecimiento de plántulas *in vitro*.
- b) Determinar el tipo de explante que permita la mayor formación de brotes.
- c) Evaluar y definir la mejor concentración citocinina/auxina para la formación de brotes.
- d) Promover la formación de raíces en los brotes espontáneamente.
- e) Lograr su establecimiento *ex vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

• Material Biológico

Se utilizaron semillas obtenidas de frutos de *Thelocactus rinconesis* colectados el 19 de julio de 2004 en la localidad Minas de yeso “El Kelso”, carretera Saltillo-Monterrey, Km 30-31, Municipio de Ramos Arizpe, Coahuila y colectadas el 30 de mayo de 2005 hacia la Estación Marte, a 33.78 km de la carretera 40 Saltillo-Torreón.

• Desinfección superficial de semillas.

Las semillas se escarificaron en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) por 2.5 min, posteriormente se sometieron a un tren de desinfección que consistió en lavar las semillas en agua destilada (50 mL) más tres gotas de detergente líquido comercial (Dawn[®]) por 20 min, enseguida se desinfectaron 30 min en 50 mL de una solución bactericida de agua destilada más tres gotas de Mycodin[®] (plata coloidal estable al 0.35%); posteriormente en alcohol al 70% 2 min y, por último, en hipoclorito de sodio al 30% (v/v) (NaOCl, 6% de cloro activo) adicionado de 3 gotas de Tween 80[®] durante 30 min (modificado de Zamora, 2007). Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua. En condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron 3 veces durante 1 min cada una con agua destilada esterilizada.

• Siembra de semillas.

La siembra se realizó en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa (MS 50%) colocando 30 mL de medio por frasco (Anexo 2). Se colocaron 5 semillas por frasco. La incubación se realizó en una cámara de ambiente controlado a $25 \pm 2^\circ C$ con un fotoperiodo 16/8 h y una intensidad luminosa de $25-30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. Se consideró semilla germinada aquella que mostrara la radícula (Moreno, 1984). La germinación se evaluó diariamente para estimar el porcentaje acumulado.

Para definir la técnica y lograr un establecimiento *in vitro* exitoso, los primeros ensayos de germinación se realizaron con muestras de 5 a 20 semillas, una vez establecida la técnica de desinfección se utilizó un máximo de 100 semillas por ensayo conformando un total de 8 ensayos. Se sembraron un total de 343 semillas en diferentes tiempos. Se comparó la viabilidad de las semillas en relación a la fecha de colecta y tiempo de almacenamiento.

- **Elongación de plántulas (medio líquido).**

La elongación de las plántulas se promovió colocándolas en medio MS líquido con 1 gL⁻¹ carbón activado (MS líquido + CA) en puentes de papel filtro. Se hicieron círculos de papel filtro con un diámetro ligeramente mayor al de la base del frasco. Se hicieron cuatro perforaciones en el papel con una aguja de disección, colocando una plántula por perforación, se introdujeron las raíces por el orificio y se dejó el resto de la plántula sobre el papel que sirvió como soporte para la misma, de tal forma que la única parte de la plántula que estaba en contacto con el medio fue la raíz. Se colocaron 30 mL de medio por frasco. Se transfirieron un total de 28 plántulas. La incubación fue bajo las mismas condiciones que las utilizadas para la siembra de las semillas.

- **Obtención y siembra de explantes en medio MS con reguladores de crecimiento.**

Las plántulas con longitud de 0.5 a 2 cm provenientes de medio MS 50% y MS líquido + CA fueron disectadas con dos cortes transversales, el primero para eliminar la raíz y el segundo para obtener el explante apical, y un corte longitudinal para obtener dos explantes laterales por plántula (Figura 2). Como medio de inducción de brotes se utilizó MS adicionado con citocininas y auxinas en diferentes concentraciones y combinaciones: BA (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) combinado con ANA (0 y 0.1 mgL⁻¹) haciendo un total de 8 tratamientos, y 2iP (0, 0.5, 1, 2 y 6 mgL⁻¹) combinado con ANA (0 y 0.1 mgL⁻¹) dando un total de 10 tratamientos. Se colocaron 3 plántulas por tratamiento, conformando en total 108 explantes laterales y 54 apicales (Ensayo 1).

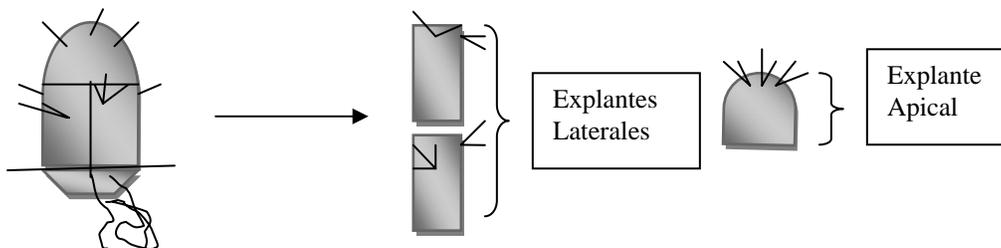


Figura 2. Disección de plántulas de *T. rinconesis* para la obtención de explantes apical y laterales.

Para poder determinar en qué parte de los explantes lateral y apical se formaron los brotes, estos se regionalizaron definiendo para el explante lateral cuatro regiones: (A) apical (región del explante lateral que estaba unida al ápice de la plántula); (V) ventral (región

donde se realizó el corte longitudinal y que se colocó en contacto con el medio); (B) basal (donde se realizó el corte de raíz); y (D) dorsal (donde se encuentran las aréolas) y el explante apical en dos regiones: (A) ápice y (B) base (Figura 3) (Licona, comunicación personal).

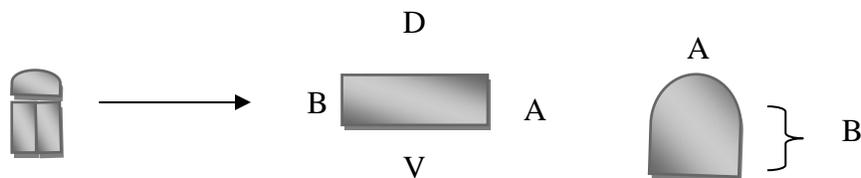


Figura 3. Regionalización de los explantes laterales y apicales para establecer la posición de los brotes.

Se realizó un segundo barrido hormonal (Ensayo 2) con los tratamientos en los que se formó el mayor número de brotes. Los tipos de explantes fueron los mismos que para el primer barrido y se sembraron en medio MS adicionado con los fitoreguladores distribuyendo 20 plántulas por tratamiento.

En ambos barridos hormonales las respuestas morfogénicas evaluadas fueron la formación de callo y/o brotes, así como la vía de regeneración de los brotes (directa o indirecta); el porcentaje de explantes con respuesta; el porcentaje de explantes con brotes; el número de brotes por explante y el número de brotes por tratamiento. Para determinar el mejor tratamiento, los resultados se analizaron utilizando el análisis de varianza ANOVA y se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

Los explantes permanecieron en el medio de inducción aproximadamente dos meses y después fueron transferidos a un medio MS 50% + 1 gL⁻¹ carbón activado (MS 50% + CA), para que los brotes formados se elongaran y comenzaran a diferenciarse del explante, como para que los brotes ya formados comenzaran a separarse de la base unida al explante, para facilitar su individualización y promover la formación de raíces.

- **Enraizamiento y Aclimatización.**

Después de dos meses en medio MS 50% + CA, los brotes alcanzaron una altura aproximada de un centímetro se individualizaron y se subcultivaron en medio MS 50% + CA fresco, para promover el enraizamiento. Se realizaron al menos dos subcultivos cada dos o tres meses por 12 meses. Los brotes con raíces fueron enjuagados con agua corriente para quitar los residuos de medio cuidando de no dañar las raíces; se esperó 1 hora para que secaran las raíces, y en aquellos brotes que tenían una raíz menor a 1 cm, se agregó un

enraizador comercial (RADIX[®]) y fueron transferidos a una mezcla esterilizada de piedra pómez/ tierra de hoja en proporción de 1:1, y se mantuvieron por tres meses bajo las mismas condiciones controladas de luz y temperatura. Posteriormente fueron llevados al invernadero en donde se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de los brotes enraizados.

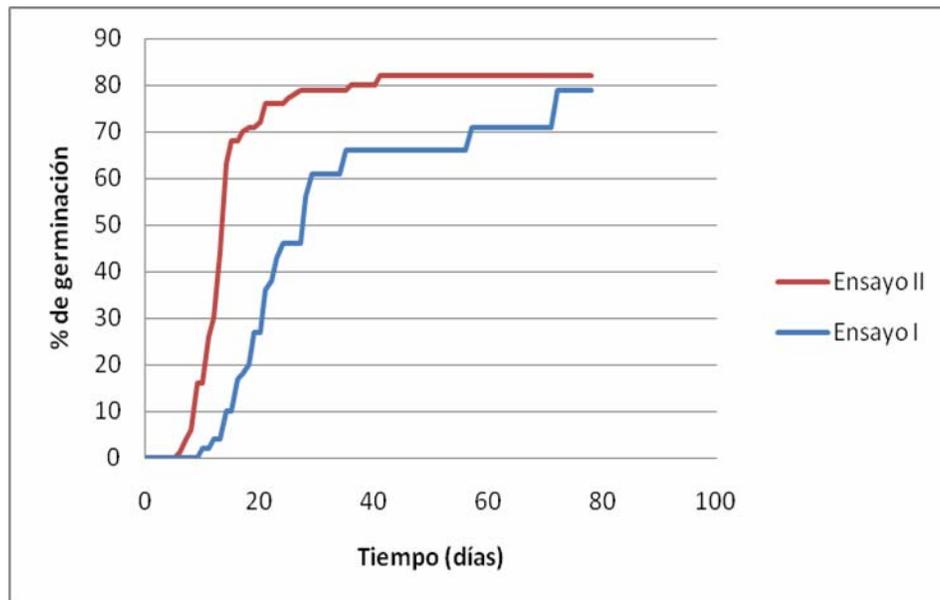
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

- **Desinfección superficial de las semillas.**

El tren de desinfección establecido para las semillas de *T. rinconensis* fue exitoso ya que se registró 0% de contaminación. Se realizó una modificación a la metodología utilizada en *T. bicolor* (Zamora, 2007), que consistió en reducir el tiempo de escarificación de las semillas de 4 minutos a 2.5 minutos debido a que la cubierta seminal de *T. rinconensis* no es tan dura como la de *T. bicolor*.

- **Germinación.**

La germinación *in vitro* de las semillas colectadas en el 2004 se inició al décimo día de la siembra alcanzando el máximo porcentaje (79%) a los 76 días (Gráfica 1).



Gráfica 1.-Porcentaje de germinación acumulada *in vitro* de semillas de *T. rinconensis* en medio MS 50% (Macros, micros y sacarosa), pH 5.7, agar 8 gL⁻¹

Las semillas colectadas en el 2005 comenzaron a germinar el sexto día logrando el máximo entre los 14 y 21 días. Después de 76 días de cultivo se obtuvo el 82% (Gráfica 1). La diferencia entre los dos ensayos puede ser atribuida al tiempo que llevaban almacenadas las semillas, ya que en el primer ensayo tuvieron más días de almacenamiento (313 días) que en el segundo (162 días) y por lo tanto la viabilidad de las semillas disminuyó tres puntos porcentuales (3 semillas menos).

Aunque no se haya obtenido el 100% de germinación en ambos lotes, se puede considerar que la viabilidad de las semillas fue alta, ya que en otras especies de cactáceas como *Notocactus magnificus*, *Turbincarpus laui* y *Pelecyphora aselliformis* el porcentaje de germinación fue del 26, 29 y 55% respectivamente, atribuyéndose a la agresividad de las soluciones empleadas en el tren de desinfección, ya que al reducir las concentraciones de las soluciones el material se contaminaba; otra posibilidad es que las semillas estuvieran en latencia o fueran estériles (Santos-Díaz *et al.*, 2003a; Santos-Díaz *et al.*, 2003b; Aíra *et al.*, 2006). Con base en esto se considera que tanto el tren de desinfección como la viabilidad de las semillas fueron exitosas en el caso de *T. rinconensis*.

La germinación de las semillas comenzó con la emergencia de la radícula de color blanco (entre el sexto y décimo día), después de uno o dos días emergieron el hipocótilo de color verde claro, algunos con tonalidades rojizas y los cotiledones, los cuales fueron muy pequeños comparados con el tamaño del hipocótilo (Figura 4).

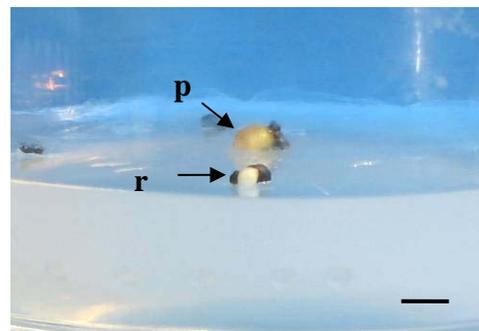


Figura 4 .Plántula (p) y radícula (r) emergiendo de *T. rinconensis*, a los 15 días de incubación. Barra = 0.25 cm

Posteriormente, entre los días 10 y 14, el hipocótilo fue aumentando de tamaño, se hizo presente el epicótilo. Se formaron las primeras aréolas que se volvían evidentes gracias a la presencia de las espinas y los tricomas después de 20 días de cultivo y que se hicieron más evidentes después de cinco meses (Figura 5).

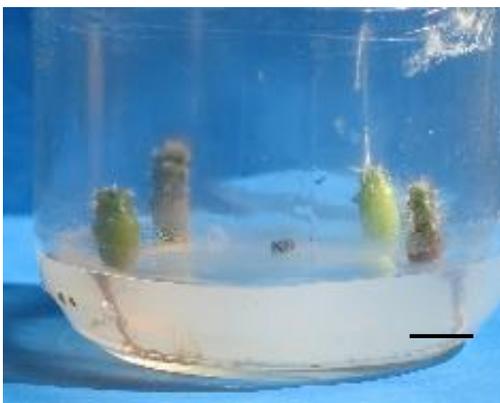


Figura 5. Plántulas de *T. rinconensis* después de 5 meses de haber sido sembradas. Barra = 0.5 cm

Conforme la plántula se desarrollaba, el espacio interareolar se volvía mayor. El color de las plántulas fue en general verde claro y en algunos casos el hipocótilo mostró tonalidades rojizas (Figura 6).

Durante el proceso de germinación y desarrollo de las plántulas no se presentó hiperhidratación u oxidación de las mismas, problemas comunes en la propagación *in vitro* (Kevers *et al.*, 2004).

Como fue reportado para *Mammillaria*



Figura 6. Plántulas de *T. rinconensis* después de 10 meses de haber sido sembradas. Espacio interareolar en plántula (a). Barra = 0.25 cm

- **Elongación de plántulas (medio líquido).**

Para promover la elongación de las plántulas germinadas en medio MS 50%, un lote de 28 plántulas se transfirió a medio MS líquido con 1 gL^{-1} de carbón activado (MS líquido + CA) en puentes de papel filtro, como lo reporta Tapia (2006) para brotes de *Cephalocereus senilis*. En estas condiciones las plántulas de *T. rinconensis* se elongaron considerablemente en 15 días, lo que permitió la separación entre sí de las areolas y facilitó la obtención y siembra de los explantes en el medio.

Al mes de haber sido transferidas las plántulas al medio líquido con los puentes de papel filtro, éstas midieron en promedio 1.29 cm a los dos meses. Las plántulas que



Figura 7. Comparación de la elongación de plántulas de la misma edad en medio MS líquido + CA (1 gL^{-1}) con puentes de papel filtro (izquierda) y medio MS 50% (derecha). Barra = 0.5 cm

coahuilensis donde ambos eventos se manifestaron en etapas muy tempranas del desarrollo de la planta, impidiendo la obtención de explantes (Flores-Rentería *et al.*, 2006).

permanecieron en el medio sólido midieron en promedio 0.5 cm a los dos meses, lo cual demostró que efectivamente el medio líquido con puentes de papel filtro es un sistema que promueve el aumento en tamaño por elongación de las plántulas y sobre todo del epicótilo (Figura 7).

Según Gómez (1998a) los cultivos en suspensión (medios líquidos) entre otras cosas, son muy eficaces para la inducción del crecimiento y diferenciación de tejidos. De acuerdo con Dabekaussen *et al.* (1991) (citado por Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997) la presencia de agar en los medios de cultivo de cactáceas tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las plántulas, debido posiblemente a que la presencia de éste dificulta el intercambio de agua y nutrientes. De acuerdo a Orellana (1998), una de las ventajas del medio líquido es que la absorción de nutrientes es más rápida. Además hay un incremento en el número de plantas que se obtienen, debido a una disminución entre los subcultivos, permitiendo una mayor producción de brotes.

Sin embargo, uno de los grandes problemas en el cultivo de cactáceas en medios líquidos es que, al ser plantas almacenadoras de agua, tienden a hiperhidratarse a tal grado que los tejidos pueden llegar a destruirse. Algunas de las plántulas cultivadas en el medio líquido presentaron hiperhidratación (17%) a los dos meses de haber sido cultivadas, teniendo un aspecto vítreo y translúcido, además del incremento en su tamaño, por lo que ya no pudieron ser utilizadas para la obtención de explantes. Sin embargo, al no presentar signos de necrosis, las aréolas se activaron permitiendo la formación de brotes (Figura 8). Por lo anterior se infiere que dejándolas menos tiempo (un mes o mes y medio) se obtendrían plántulas con un buen tamaño para obtener explantes sin que se hiperhidraten y aumenten demasiado su tamaño.

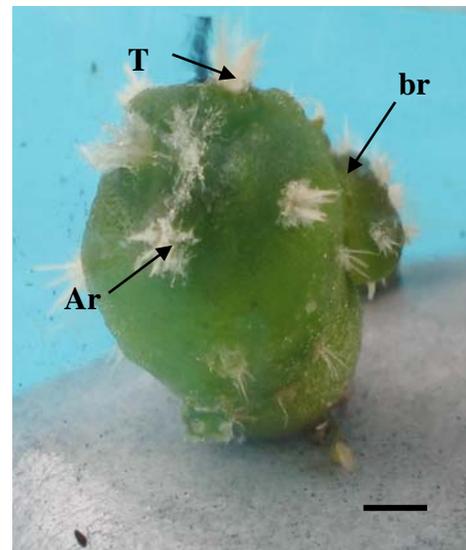


Figura 8. Plántula hiperhidratada en MS líquido + CA (1g L^{-1}) con puentes de papel filtro. Presenta activación de aréolas (Ar) tricomas (T) y un brote lateral (br). Barra = 0.25 cm.

- **Respuestas morfogénicas**

- Ensayo 1

En los tratamientos de BA/ANA y 2iP/ANA se observaron tres diferentes tipos de respuestas morfogénicas: callo, formación de brotes por activación areolar (organogénesis directa por activación de yemas axilares) y formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD).

▪ Callo

Se observó su formación en 13 de los 18 tratamientos ensayados. El callo se formó generalmente en las zonas de corte de ambos explantes, y con mayor frecuencia en aquellos provenientes de plántulas que estuvieron en medio MS líquido + CA. Tanto en explantes apicales como laterales, el desarrollo del callo comenzó con puntos aislados, pero conforme fue progresando el cultivo aumentó su tamaño hasta convertirse en una masa. Su apariencia fue hialina (algunas veces con tonos rosados), esponjoso desmenuzable y observado al microscopio estereoscópico parecía tener un crecimiento parecido a hifas (Figura 9).

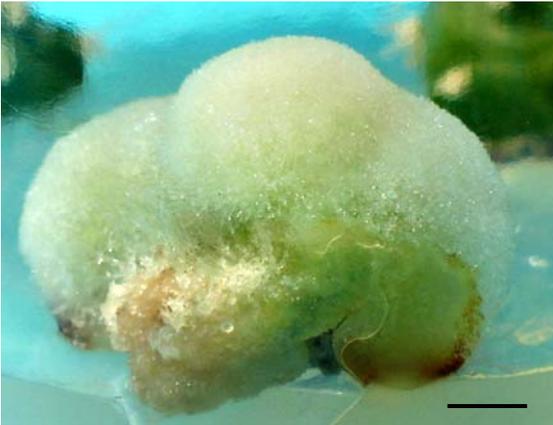
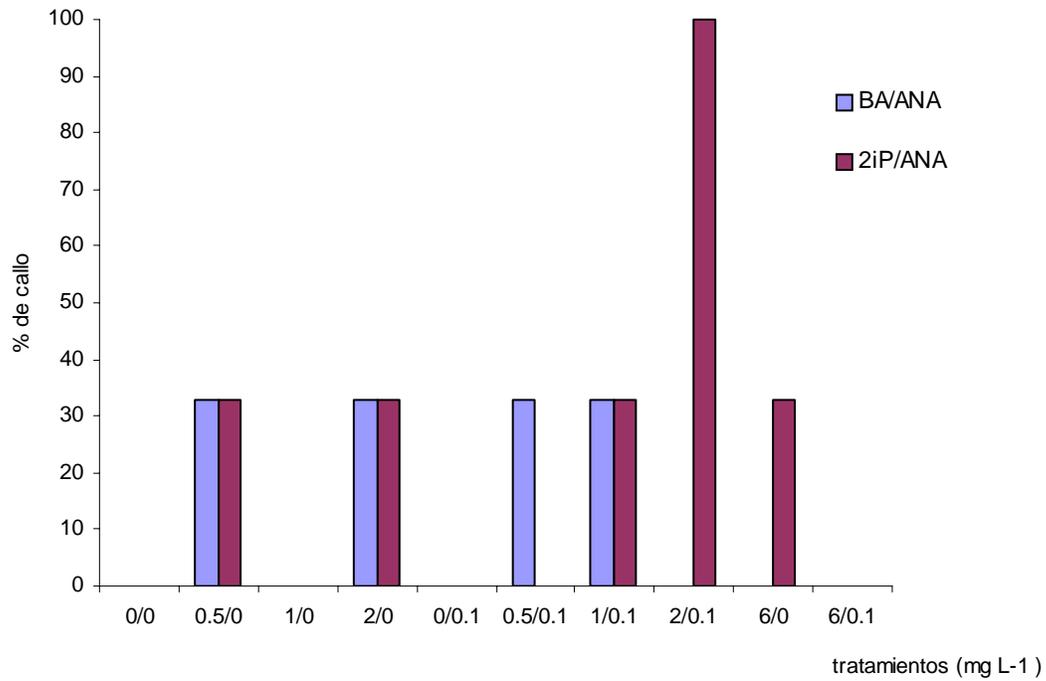


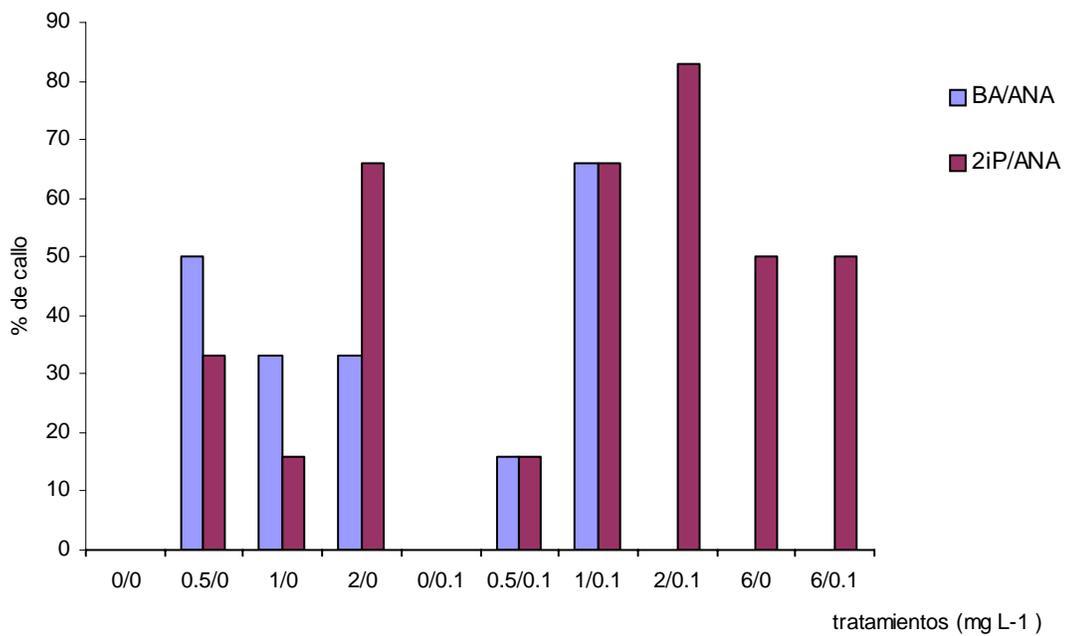
Figura 9. Callo esponjoso desmenuzable hialino en medio MS 2iP/ANA 0.5/0.1 mgL⁻¹. Barra = 0.25 cm.

En los explantes apicales el callo se presentó en 9 de los 18 tratamientos con BA/ANA y 2iP/ANA, donde las citocininas estuvieron presentes en todas las concentraciones utilizadas, mientras que las auxinas podían estar o no presentes. El porcentaje de explantes con callo fue del 33% y sólo en 2iP/ANA 2/0.1 del 100% (Gráfica 2).

Respecto a los explantes laterales se registró en 13 de los 18 tratamientos. El porcentaje de explantes con callo varió del 16% (2iP/ANA 0.5/0.1) al 83% (2iP/ANA 2/0.1). El grupo control, los tratamientos sólo con la auxina y BA/ANA 2/0.1 fueron los únicos que no formaron callo (Gráfica 3). Los explantes laterales formaron más callo que los apicales debido a que el área de corte es mayor que la del ápice.



Grafica 2. Porcentaje de explantes ápicales de *T. rinconensis* con callo en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 1).



Gráfica 3. Porcentaje de explantes laterales de *T. rinconensis* con callo en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 1).

▪ **Formación de brotes por activación areolar.**

Después de las primeras dos semanas de incubación se observó la activación de las aréolas reflejada por producción de abundantes tricomas, espinas o ambos en 15 de los 18 tratamientos, presentándose comúnmente en aquellos que sólo tenían la citocinina (BA o 2iP). Para los dos tipos de explantes y en ambas series de fitorreguladores el 98% presentaron un incremento en su volumen y en el caso de los explantes laterales a la par se observó una curvatura cóncava; las aréolas se hicieron más evidentes debido a que los tubérculos aumentaron su volumen y en el extremo apical de éstos se formaron protuberancias esféricas que después de 25 días dieron lugar a los brotes (organogénesis directa por activación de yemas axilares) (Figura 10).

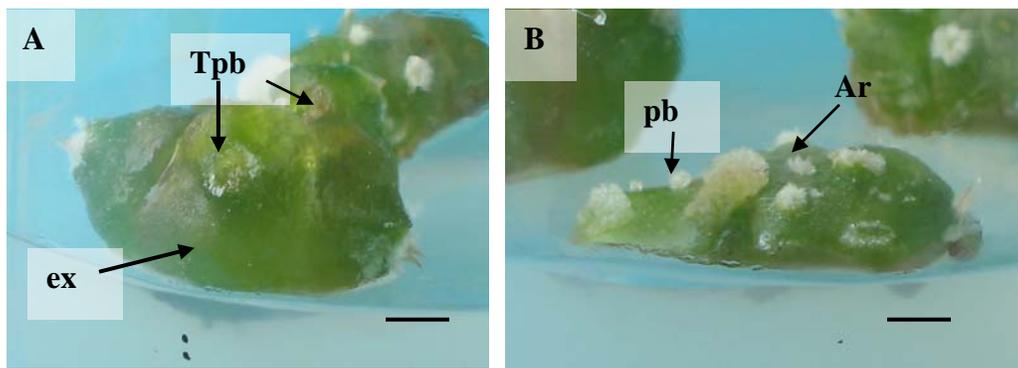
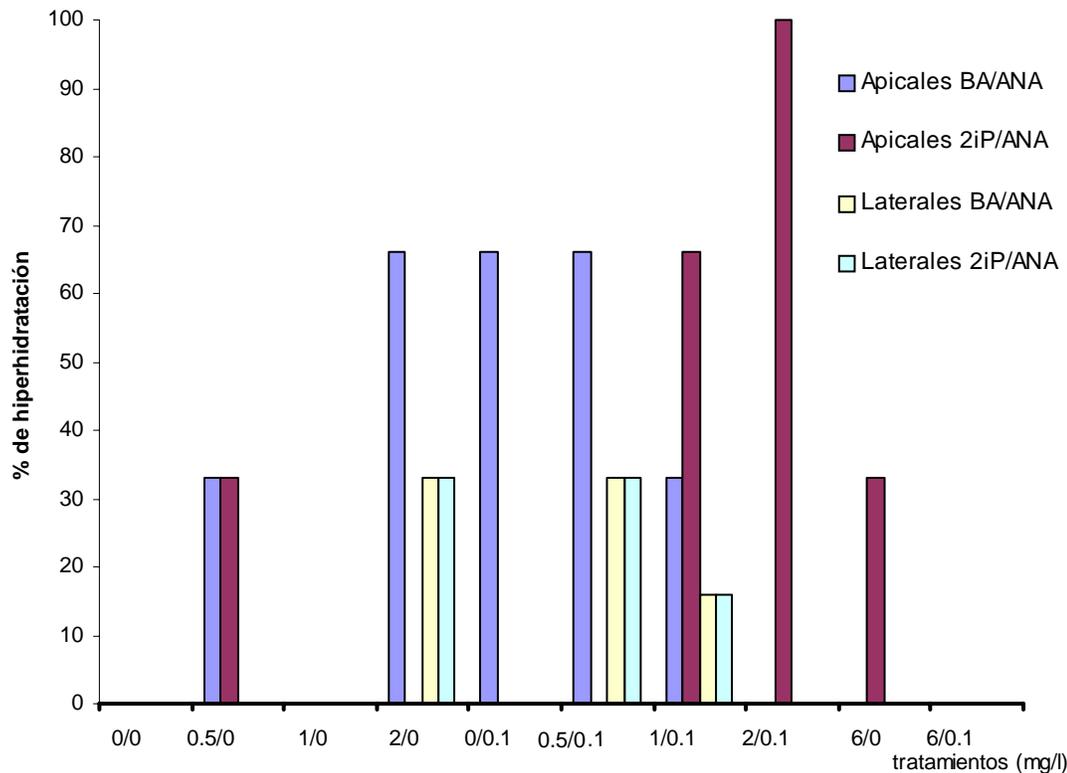


Figura 10. Ensanchamiento de explantes (ex) en medio MS + BA/ANA 1/0.1 mgL⁻¹ a los 18 días de cultivo. A) explante apical con tubérculos protuberantes (Tpb); B) pequeñas protuberancia (pb) y ensanchamiento de aréolas (Ar). Barra = 0.25 cm.

También se observó oxidación en la zona de corte de ambos explantes, con un cambio en la coloración de verde a café claro con tonalidades rojizas.

En algunos tratamientos, y sobre todo en los explantes apicales se presentó la hiperhidratación de los tejidos, tanto en el explante como en los brotes formados (los cuales no se consideraron en el conteo final de brotes), llegando a un 100% en BA 2/0.1 mgL⁻¹ (Figura 11). En los explantes laterales este fenómeno se presentó con porcentajes bajos (16 y 33%) (Gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de hiperhidratación en explantes apicales y laterales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 1).

La hiperhidratación se atribuye a la concentración y tipo de reguladores de crecimiento, a la

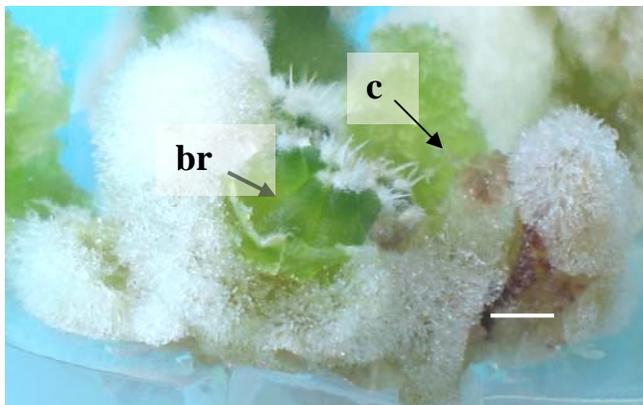


Figura 11. Callo (c) producto de brotes (br) hiperhidratados en medio MS BA/ANA 1/0.1 mgL⁻¹. Barra = 0.25 cm.

fuerza nitrogenada y a la presión osmótica del medio nutritivo (Kevers *et al.*, 2004). Este fenómeno se ha reportado en cactáceas como *Pelecypora aselliformis*, la cual tuvo un alto grado de hiperhidratación en todos los tratamientos que se utilizaron (Santos-Díaz *et al.*, 2003a).

✓ Brotes en explantes apicales

De los 18 tratamientos ensayados se formaron brotes en BA/ANA 1/0, 1/0.1, 2/0.1 con 0.33, 2.3 y 2.6 brotes promedio por explante y en 2iP/ANA 2/0.1 con 2.3 (Cuadro 2). El hecho de que se presentaran promedios de 2.3 y 2.6, indica que el explante apical es regenerativo a pesar de que el total de brotes obtenidos por tratamientos sea bajo (23).

Cuadro 2. Formación de brotes por activación areolar en explantes apicales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 1).

BA/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
0/0	0/3	0	0
0.5/0	0/3	0	0
1/0	1/3	1	0.33
2/0	0/3	0	0
0/0.1	0/3	0	0
0.5/0.1	0/3	0	0
1/0.1	1/3	7	2.3
2/0.1	1/3	8	2.6
Total	3/24	16	

2iP/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
0/0	0/3	0	0
0.5/0	0/3	0	0
1/0	0/3	0	0
2/0	0/3	0	0
0/0.1	0/3	0	0
0.5/0.1	0/3	0	0
1/0.1	0/3	0	0
2/0.1	1/3	7	2.3
6/0	0/3	0	0
6/0.1	0/3	0	0
Total	7/30	7	

Los brotes se formaron en la base y el ápice del explante, presentaron una coloración verde claro, de forma globosa, con tubérculos pequeños, en los cuales se observaron gran cantidad de tricomas de color blanco y espinas amarillo claro, y en algunos casos con posible lignificación en la punta que se manifestó con un color café oscuro (Figura 12).

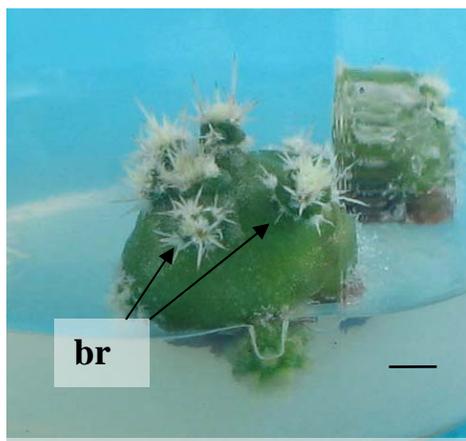


Figura 12. Brotes (br) surgiendo de las areólas en la región apical del explante.
Barra = 0.25 cm.

✓ Brotes en explantes laterales

La formación de brotes se presentó en todos los tratamientos ensayados para las dos combinaciones de citocinina/auxina, registrando un mayor número en BA/ANA 2/0, 1/0.1 y 2/0.1 con 2, 2.5 y 1.8 brotes por explante respectivamente y para 2iP/ANA 1/0, 1/0.1 y 6/0.1 con 2.6, 1.6 y 2.1 brotes promedio por explante. Se formaron un total de 156 brotes en los tratamientos ensayados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Formación de brotes por activación areolar en explantes laterales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (ensayo 1).

BA/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
0/0	2/6	3	0.5
0.5/0	5/6	8	1.33
1/0	3/6	9	1.5
2/0	3/6	12	2
0/0.1	1/6	4	0.66
0.5/0.1	3/6	9	1.5
1/0.1	6/6	15	2.5
2/0.1	5/6	11	1.8
Total	28/48	71	

2iP/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
0/0	2/6	3	0.5
0.5/0	1/6	3	0.5
1/0	4/6	16	2.6
2/0	4/6	9	1.5
0/0.1	1/6	4	0.66
0.5/0.1	3/6	6	1
1/0.1	3/6	10	1.66
2/0.1	6/6	12	2
6/0	5/6	9	1.5
6/0.1	5/6	13	2.16
Total	34/60	85	

En los explantes laterales los brotes surgieron de las areólas que se encontraban en la región D-A del explante; su apariencia fue globosa, bien definida de coloración verde con tubérculos muy bien diferenciados. Las areólas se observaron en los ápices de los tubérculos con una gran cantidad de tricomas y espinas de color amarillo (Figura 13).

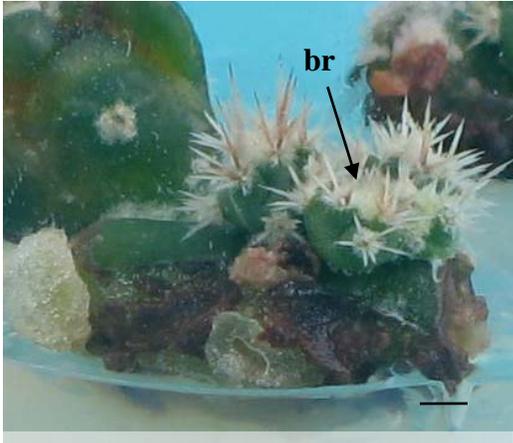


Figura 13. Desarrollo de brotes (br) en la región dorsal apical. Barra = 0.25 cm.

De acuerdo a Castro-Gallo *et al.* (2002), en *T. hexaedophorus* el mejor tratamiento fue 2iP 6 mgL⁻¹, obteniendo hasta 13.6 brotes por explante. Sin embargo, para este trabajo, aunque 2iP 6 mgL⁻¹ fue un buen tratamiento (1.5 brotes por explante lateral) no puede ser considerado como uno de los mejores, a diferencia de BA/ANA 2/0, 1/0.1 y 2/0.1, concentraciones que han funcionado en otras cactáceas como *Mammillaria oteroi*, *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus turberi*

y *Notocactus magnificus*, en las que dichas concentraciones de esta citocinina formaron 5.3, 3.8, 4.3 y 6 brotes promedio por explante, respectivamente (Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Aíra *et al.*, 2006).

✓ Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD)

Durante el desarrollo de los brotes por activación areolar se observó la formación de brotes que presentaron tubérculos ensanchados y separados entre sí, con aréolas de mayor diámetro y numerosos tricomas con una coloración café claro, similar a un tejido oxidado. Estos brotes distan de tener una apariencia similar a un brote bien conformado y se le designó como brote morfológicamente diferente (BMD) (Figura 14).

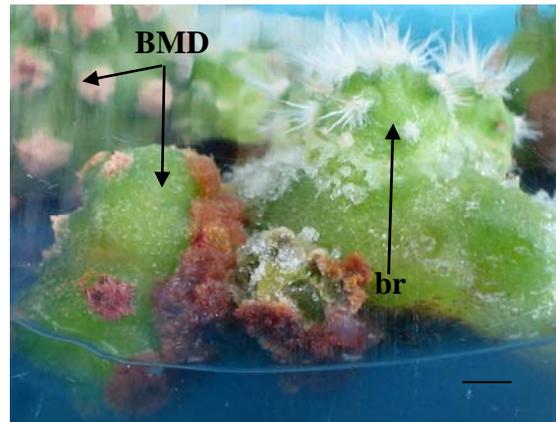


Figura 14. Formación de brotes normales en parte dorsal (br) y formación de BMD en parte ventral de explantes laterales en medio MS 50% + CA (proveniente de BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹) Barra = 0.25 cm.

Se formaron generalmente en posición ventral-basal y ventral-apical en ambos tipos de explantes, siempre en contacto directo con el medio. Por lo que una de las posibles razones por la que presentaron esta morfología pudo ser el acceso directo a los nutrientes y al agua del medio; esta entrada excesiva de agua se puede deber a que el tejido parenquimatoso esta en contacto directo con el medio de cultivo, sin que exista un órgano barrera como la raíz,

Cuadro 4. Numero de brotes morfológicamente diferentes (BMD) que se desarrollaron en los explantes apicales en los diferentes tratamientos de BA/ANA y 2iP/ANA.

BA/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes laterales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
0/0	-	-	-
0.5/0	4/6	4	0.66
1/0	2/6	6	1
2/0	-	-	-
0/0.1	-	-	-
0.5/0.1	1/6	4	0.66
1/0.1	1/6	2	0.33
2/0.1	5/6	7	1.16

2iP/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes apicales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
0/0	-	-	-
0.5/0	1/3	1	0.33
1/0	1/3	1	0.33
2/0	-	-	-
0/0.1	-	-	-
0.5/0.1	-	-	-
1/0.1	-	-	-
2/0.1	1/3	1	0.33
6/0	2/3	7	2.3
6/0.1	2/3	3	1

haciendo la toma de agua distinta. Se observaron tanto en explantes apicales como laterales, siendo más evidentes en 2iP/ANA que en BA/ANA, dando un promedio máximo de 1.16 (BA/ANA 2/0.1 mgL⁻¹) en explantes laterales y 2.3 (2iP/ANA 6/0 mgL⁻¹) en explantes apicales (Cuadro 4) y en explantes laterales (Cuadro 5).

Rodríguez (2006) describió una morfología similar en brotes de *Echinocactus grusonii*, a los que llamó “brotes anormales”, reportando que este tejido puede ser un tejido potencial

Cuadro 5. Número de brotes morfológicamente diferentes (BMD) que se desarrollaron en los explantes laterales en los diferentes tratamientos de BA/ANA y 2iP/ANA.

BA/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes apicales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
0/0	-	-	-
0.5/0	-	-	-
1/0	1/3	1	0.33
2/0	-	-	-
0/0.1	-	-	-
0.5/0.1	-	-	-
1/0.1	2/3	2	0.66
2/0.1	3/3	5	1.66

2iP/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes laterales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
0/0	-	-	-
0.5/0	-	-	-
1/0	1/6	2	0.33
2/0	1/6	3	0.5
0/0.1	-	-	-
0.5/0.1	1/6	1	0.16
1/0.1	1/6	1	0.16
2/0.1	2/6	2	0.33
6/0	3/6	6	1
6/0.1	3/6	4	0.66

para formar posteriormente un gran número de brotes, ya que observó que de estos brotes anormales, se activaban nuevamente las aréolas y se desarrollaban brotes de apariencia normal. En el caso de *T. rinconensis* no se observó que los BMD fueran un tejido regenerativo a brotes con apariencia normal. Sin embargo, existe un aspecto reportado por Rodríguez (2006) que sí se observó en el presente trabajo y es la diferencia evidente que existe en el tamaño de los brotes normales y los BMD siendo estos últimos más grandes.

➤ Ensayo 2

Considerando los mejores tratamientos del primer barrido se realizó un segundo ensayo con MS adicionado con BA/ANA (1/0, 1/0.1 y 2/0.1 mgL⁻¹) haciendo un total de 3 tratamientos, y MS con 2iP/ANA (1/0, 1/0.1, 2/0.1 y 6/0.1 mgL⁻¹) dando un total de 4 tratamientos. Se colocaron 140 explantes apicales y 280 explantes laterales (20 apicales y 40 laterales por tratamiento). Las respuestas morfogénicas obtenidas fueron las mismas que en el ensayo anterior.

▪ Callo

Se presentó la formación de callo en todos los tratamientos, con porcentajes entre 10 y 85%. El callo proliferó después de la formación de los brotes, por lo tanto ningún brote se originó de éste.

En los explantes apicales, el callo se presentó en todos los tratamientos ensayados, variando de 10% (2iP/ANA 6/0.1) a 40% (2iP/ANA 1/0.1). En los explantes laterales se observó también en todos los tratamientos de ambas series de fitorreguladores, con porcentajes mayores, siendo el mínimo 17% (BA/ANA 2/0.1) y el máximo 85% (BA/ANA 1/0.1 y 2iP/ANA 1/0.1) (Gráficas 5 y 6). La combinación de citocininas con auxinas juega un papel importante en la formación de callo, ya que en concentraciones de 1 mgL⁻¹ de BA ó 2iP y de 0.1 mgL⁻¹ de ANA, es donde se observó el mayor porcentaje de callo. Comparando esta información con lo reportado, también resulta contrastante, ya que son sólo las auxinas a las que se les atribuye la formación de esta masa de células indiferenciadas (callo) (Aíra *et al.*, 2006; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Giusti *et al.*, 2002). En *T. rinconensis* parece que la presencia de auxinas sí promueve el crecimiento de callo, siempre y cuando se encuentre en combinación con la citocinina. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en *Coryphanta elephantidens* (Singh, 1999), ya que, aunque la mayor tasa de crecimiento ocurrió en aquellos tratamientos que contenían auxinas (2, 4-D, AIA, AIB y ANA),

también se observó un crecimiento acelerado de callo en uno de los tratamientos que contenía kinetina (una citocinina) en combinación con AIB.

El callo tuvo las mismas características que en el Ensayo 1, hialino, esponjoso, desmenuzable y con células con crecimiento parecido a hifas (Figura 15).

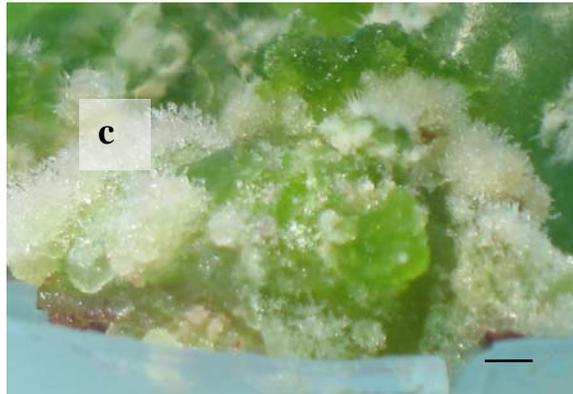
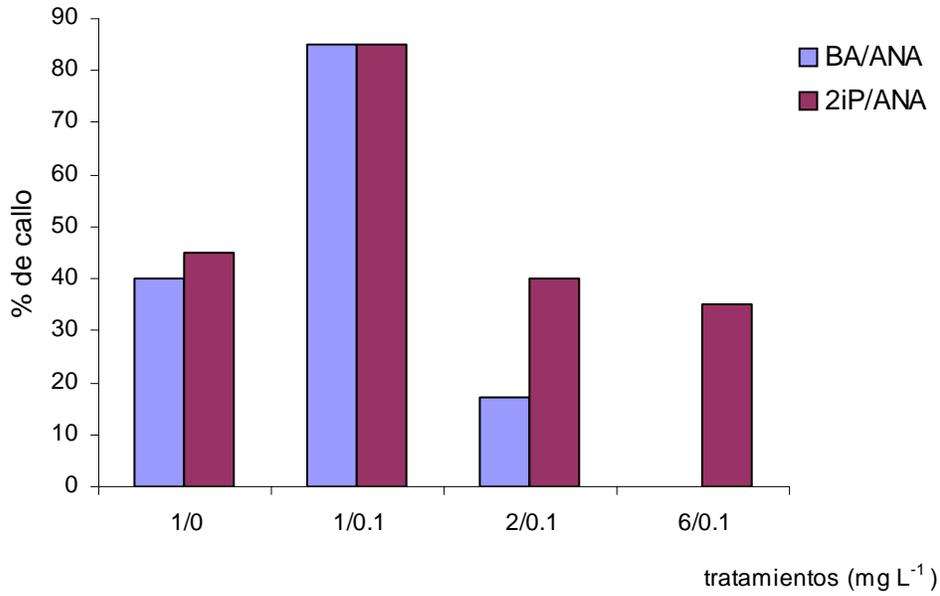
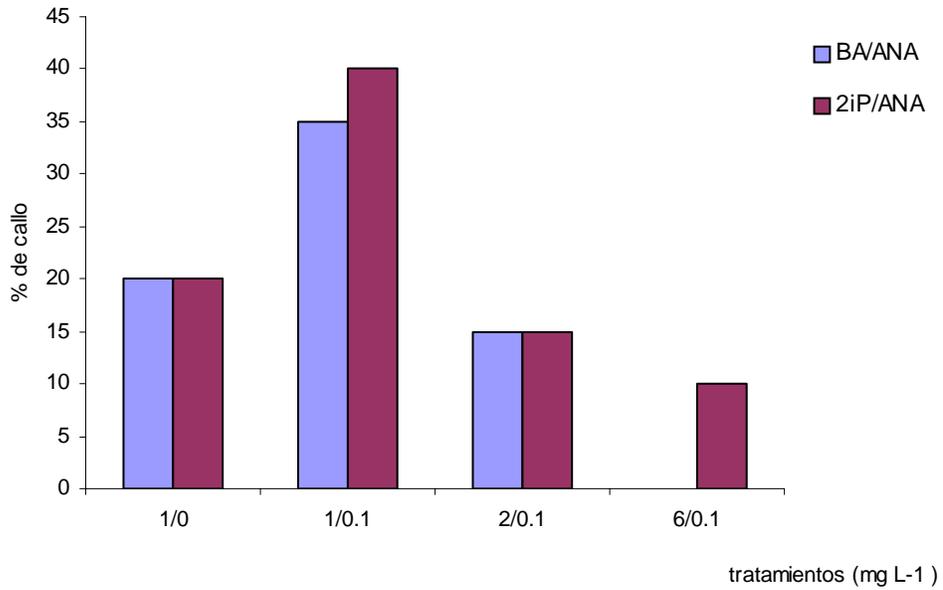


Figura 15. Explante lateral con callo (c) hialino y esponjoso ($2iP/ANA 1/0.1 \text{ mgL}^{-1}$).
Barra= 0.25 cm.

Gráfica 5. Porcentaje de explantes apicales de *T. rinconensis* con callo en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).



Gráfica 6. Porcentaje de explantes laterales de *T. rinconensis* con callo en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).

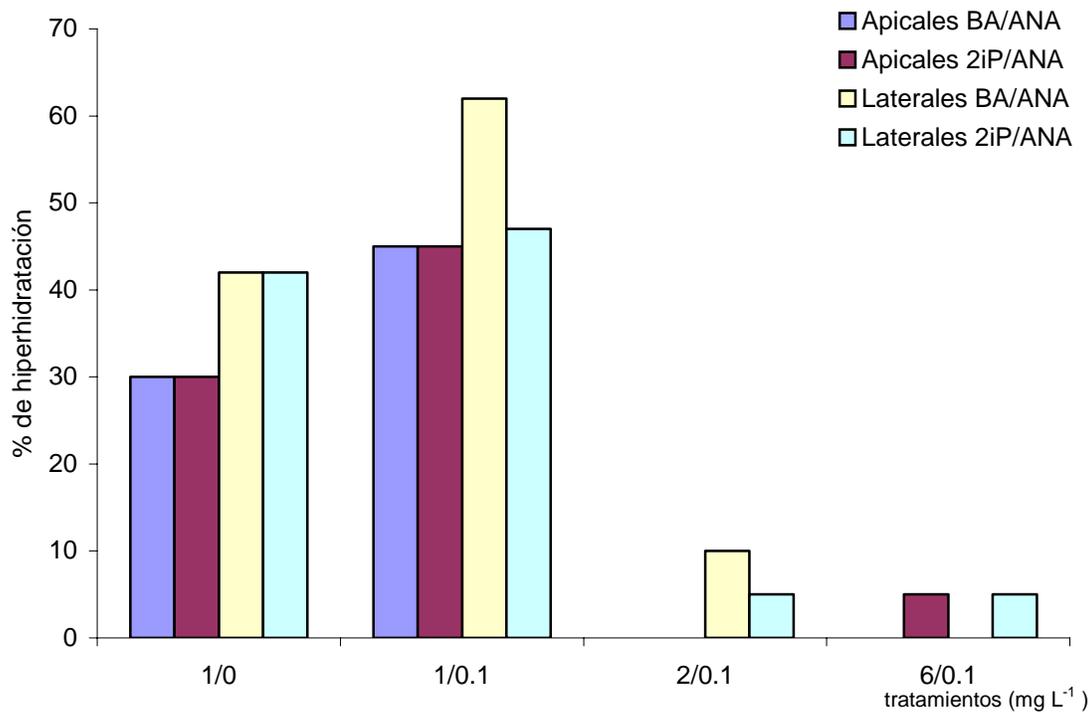


- Formación de brotes por activación areolar

Al igual que en el ensayo 1, en el ensayo 2 se presentaron los primeros signos de organogénesis directa por activación areolar en ambos tipos de explantes a las dos primeras semanas de incubación, y que se manifestó con un aumento de su volumen así como un cambio en la coloración del mismo a un verde más claro. La oxidación se observó en la zona de corte y sólo un explante lateral en BA/ANA 1/0 mgL⁻¹ se oxidó completamente a los diez días de haber sido cultivado. A los 15 días de cultivo, la mayoría de los explantes laterales y apicales presentaron activación de las aréolas caracterizada por la producción de numerosos tricomas y espinas; los tubérculos del explante se hicieron protuberantes. Los brotes, al igual que en el ensayo anterior, siempre se formaron a partir de las aréolas, comenzando con un aumento de volumen de éstas y prosiguió con la formación de pequeñas protuberancias esféricas con una gran cantidad de tricomas y espinas. En todos los tratamientos los brotes estuvieron presentes a los 30 días de cultivo en el medio de inducción.

Se realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer siendo la variable evaluada el número de brotes por explante. Se realizaron estas pruebas estadísticas como lo recomiendan Hurtado y Merino (1987) para evaluar las respuestas en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

La hiperhidratación también estuvo presente en el ensayo 2, excepto en dos tratamientos en explantes apicales. Y en los brotes formados, afectando negativamente el desarrollo de éstos. Los porcentajes más altos de este fenómeno fueron entre 30 y 62%, y fue mayor en los explantes laterales (Gráfica 7).



Gráfica 7. Porcentaje de hiperhidratación en explantes apicales y laterales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).

Esta alteración de la morfología y la fisiología de la planta por el exceso de humedad en el frasco de cultivo se ha reportado en varios trabajos de micropropagación de cactáceas. Por ejemplo, Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998), que propagaron *in vitro* 21 especies de cactáceas, describen este fenómeno y vuelven a mencionarlo para tres cactáceas columnares (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002). Debido a que las cactáceas naturalmente almacenan agua por la escasez de la misma en su hábitat, al ponerlas en un medio alto en humedad relativa se hiperhidratan.

✓ Brotes en explantes apicales

El 41 % de los explantes apicales formó brotes, siendo los mejores tratamientos BA/ANA 1/0 y 1/0.1 mgL⁻¹ con un promedio de 3.7 y 3.9 brotes por explante respectivamente, y en 2iP/ANA fue 1/0.1 mgL⁻¹ con un promedio de 4 brotes por explante (Cuadro 6).

Estadísticamente, los mejores tratamientos para los explantes apicales fueron: BA/ANA 1/0, 1/0.1 mgL⁻¹ y 2iP/ANA 1/0, 1/0.1 mgL⁻¹, siendo el mejor de los cuatro 2iP/ANA 1/0.1 mgL⁻¹ (F= 2.8612; P=0.05).

Cuadro 6. Formación de brotes por activación areolar en explantes apicales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).

BA/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
1/0	10/20	75	3.75
1/0.1	15/20	78	3.9
2/0.1	5/20	31	1.55
Total	30/60	184	

2iP/ANA (mgL⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
1/0	7/20	26	1.3
1/0.1	14/20	80	4
2/0.1	4/20	21	1.05
6/0.1	3/20	14	0.7
Total	28/80	141	

El efecto de la auxina en la inducción de explantes apicales no parece ser trascendental, ya que aún en su ausencia se observó la formación de brotes. Estos resultados difieren con los reportados para otras cactáceas que se han propagado *in vitro*, ya que en la mayoría de los trabajos se reporta que el mejor explante para la inducción de brotes son laterales o longitudinales, y los mejores tratamientos son aquellos que contienen la citocinina BA. Tal es el caso de *Obregonia denegrii*, *Coryphanta minima*, *Mammillaria elongata*, *Mammillaria oteroi* y *Pelecypora aselliformis*, entre otras, en las que concentraciones de 0.5, 1, 2 y 5 mgL⁻¹, forman en promedio entre 3.8 a 10.3 brotes por explante (Castro-Gallo *et al.*, 2002; Malda *et al.*, 1999; Papafotiou *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003a). Sin embargo en *T. hexaedophorus* (especie del mismo género), la mayor producción de brotes si se presento en un tratamiento con la citocinina 2iP, pero la concentración de la misma fue alta (6 mgL⁻¹) (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

Los brotes se formaron en las regiones del ápice y de la base de los explantes apicales y presentaron una forma esférica un poco aplanada, con una mayor producción de tricomas

en los procedentes de BA/ANA que en 2iP/ANA que presentaron mayor producción de espinas; las aréolas estaban muy juntas haciendo difícil en algunos casos su diferenciación.

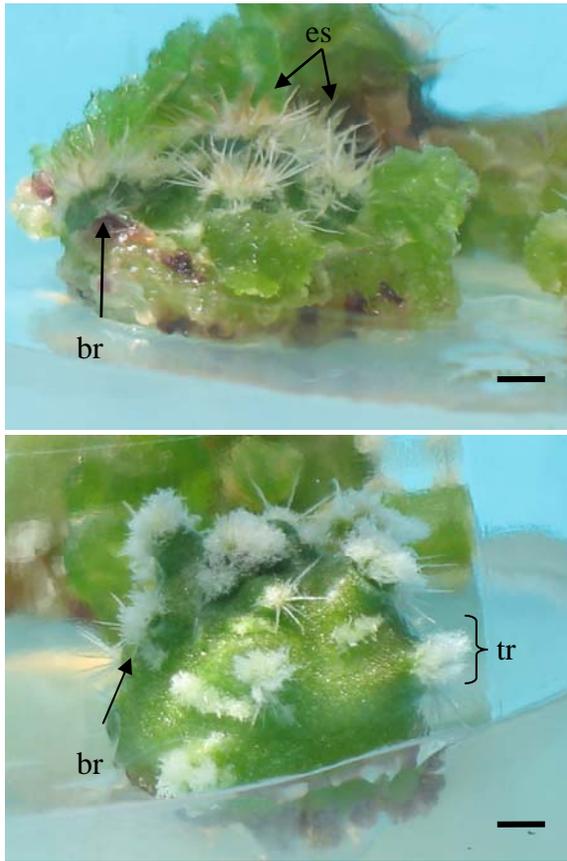


Figura 16. Numerosas espinas (es) en brotes (2iP 1/0.1 mgL⁻¹) (superior) y numerosos tricomas (tr) en brotes (br) (BA/ANA 1/0 mgL⁻¹) (inferior) de explantes apicales. Barra = 0.25 cm.

Se observó también que los brotes que se desarrollaron en el ápice del explante eran de mayor tamaño que aquellos que se desarrollaron en la base del explante.

Esta heterogeneidad de los brotes formados en explantes apicales se ha reportado también para *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002). Sin embargo en *T. rinconensis* conforme pasa el tiempo, los brotes fueron emparejando su tamaño a los dos meses de cultivo.

✓ Brotes en explantes laterales.

Se formaron brotes en todos los tratamientos, aunque sólo en el 30% de los explantes. Se caracterizaron porque en todos los tratamientos, al iniciar la organogénesis, se engrosaron y se curvaron de manera concáva. Se formaron 123 brotes por tratamiento en todos los tratamientos de BA y 136 brotes por tratamiento en los de 2iP. El mejor tratamiento para BA/ANA y 2iP/ANA fue 1/0.1 mgL⁻¹ con un promedio de 1.6 y 1.1 brotes por explante respectivamente (Cuadro 7). Sin embargo, los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba estadística ANOVA (F= 2.8612; P= 0.05), por lo que no se puede establecer el mejor tratamiento para este tipo de explante.

La mayoría de los brotes se formó en la región D-A y presentaron una forma esférica homogénea, con gran producción de tricomas y espinas sobre todo los formados en 2iP, en los que también se empezaban a diferenciar los tubérculos (Figura 17).



Figura 17. Desarrollo de brotes de *T. rinconensis* con 2iP/ANA 1/0.1 Barra =0.25 cm.

Cuadro 7. Formación de brotes por activación areolar en explantes laterales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).

BA/ANA (mgL ⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
1/0	14/40	32	0.8
1/0.1	17/40	64	1.6
2/0.1	10/40	27	0.67
Total	41/120	123	

2iP/ANA (mgL ⁻¹)	No. de explantes con brotes	No. de brotes/tratamiento	Promedio de brotes por explante
1/0	13/40	25	0.62
1/0.1	20/40	46	1.1
2/0.1	11/40	33	0.82
6/0.1	11/40	32	0.8
Total	55/160	136	

✓ Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD)

Se formaron brotes morfológicamente diferentes también en este segundo barrido, siendo mayor en los explantes apicales que en los laterales. Se desarrollaron en las zonas de corte de los explantes apicales y en la región ventral-apical de los explantes laterales. En los explantes apicales, los tratamientos en los que se formaron más fueron en: BA/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ y 2iP/ANA 1/0.1 mg L⁻¹. En los laterales en BA/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ y 2iP/ANA 1/0 mg L⁻¹. Con base en estos resultados, las citocininas en concentraciones de 1 mg L⁻¹

promovieron la formación de este tipo de brotes, ya que conforme se fue incrementando la concentración de éstas, la cantidad de los brotes disminuye en ambos tipos de explantes, como se puede apreciar en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD) en explantes apicales y laterales de *T. rinconensis* en BA/ANA y 2iP/ANA (Ensayo 2).

BA/ANA (mg L⁻¹)	No. de explantes apicales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
1/0	8/20	12	0.6
1/0.1	12/20	21	1.05
2/0.1	3/20	4	0.2

2iP/ANA (mg L⁻¹)	No. de explantes apicales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
1/0	1/20	1	0.5
2/0	10/20	19	0.95
2/0.1	0/20	0	0
6/0.1	1/20	1	0.05

BA/ANA (mg L ⁻¹)	No. de explantes laterales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
1/0	9/40	22	0.55
1/0.1	14/40	27	0.67
2/0.1	4/40	6	0.15

2iP/ANA (mg L ⁻¹)	No. de explantes laterales con BMD	No. de BMD/tratamiento	Promedio de BMD por explante
1/0	10/40	16	0.4
2/0	8/40	15	0.37
2/0.1	3/40	4	0.1
6/0.1	2/40	3	0.07

Los explantes apicales formaron más brotes (306) que los laterales (259), aunque la apariencia de los laterales es mejor (forma claramente esférica, con espinas largas y bien definidas, pocos tricomas) que la de los apicales. Desde el punto de vista estadístico, el explante en el que se desarrollaron más areolas fue el apical y el mejor tratamiento fue 2iP/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ para la proliferación de brotes, pero también produce un número elevado de brotes morfológicamente diferentes así como callo e hiperhidratación. Es por esto que no sólo es importante evaluar el número de brotes sino también su calidad.

- **Enraizamiento de brotes y aclimatización.**

Después de dos subcultivos (3 a 6 meses) en MS50% + CA, el 100% de los brotes individualizados formaron raíces y no fue necesaria la adición de auxinas en el medio de cultivo. Esto coincide con lo reportado para *Coryphanta elephantidens* en donde el enraizamiento ocurrió en medio libre de fitoreguladores (Singh, 1999).

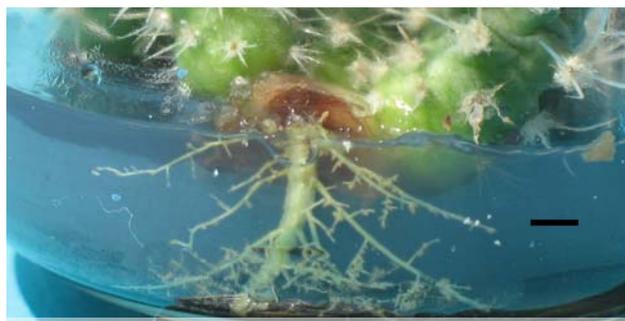


Figura 18. Formación de raíces en brotes de *T. rinconensis* en medio MS 50%+CA. Barra = 0.5 cm.

Los brotes se caracterizaron por formar una raíz principal relativamente gruesa y raíces secundarias fibrosas que alcanzaron más de 1 cm de longitud (Figura 18).

En otras cactáceas como *Mammillaria elongata*, *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis*, *Stenocereus stellatus* y *Thelocactus hexaedrophorus*, la formación de raíces requirió la presencia de las auxinas AIA (ácido indol-3-acético) o AIB (ácido indol-3-butírico) en concentraciones de 0.5 a 1 mg L⁻¹; al mismo tiempo se ha reportado que la incorporación de carbón activado (1 a 3 gL⁻¹) al medio estimula y reduce el tiempo (3 a 5 semanas) para el enraizamiento de los brotes con una eficiencia del 50 al 100% (Castro-Gallo *et al.*, 2002; Papafotiou *et al.*, 2001; Pérez-Molphe *et al.*, 1998).

Los brotes enraizados fueron transferidos a una mezcla esterilizada de piedra pómez y tierra de hoja 1:1, lavando previamente a las raíces para eliminar los restos de agar y evitar la proliferación de hongos. Para estimular la formación de nuevas raíces se les aplicó Radix[®] 1500; después los brotes se sembraron en charolas de plástico con domo transparente y fueron mantenidos aproximadamente un mes en una cámara de ambiente controlado (25 ± 2 °C, 16 h luz y 25-30 μmol m⁻² s⁻¹) para promover su gradual adaptación *ex vitro*.

Después de la primera semana fuera del frasco, las plantas de *T. rinconensis* mostraron una ligera deshidratación que se manifestó como una disminución en el vigor de los tallos. A la tercera semana su aspecto físico mejoró, reiniciaron su crecimiento y se observó la formación de nuevas aréolas.

Malda *et al.* (1999) reportaron que para *Obregonia denegrii* y *Coryphanta minima* la tasa de pérdida de agua fue alta durante los primeros cinco días después de la transferencia al sustrato, pero que a los quince días ya se había estabilizado, por lo que la cantidad de agua perdida no afectó la sobrevivencia de las plantas, lo que atribuyeron al cuerpo suculento de las cactáceas.

A los 20 días de haber sido transferidas *ex vitro*, el porcentaje de sobrevivencia fue del 92%

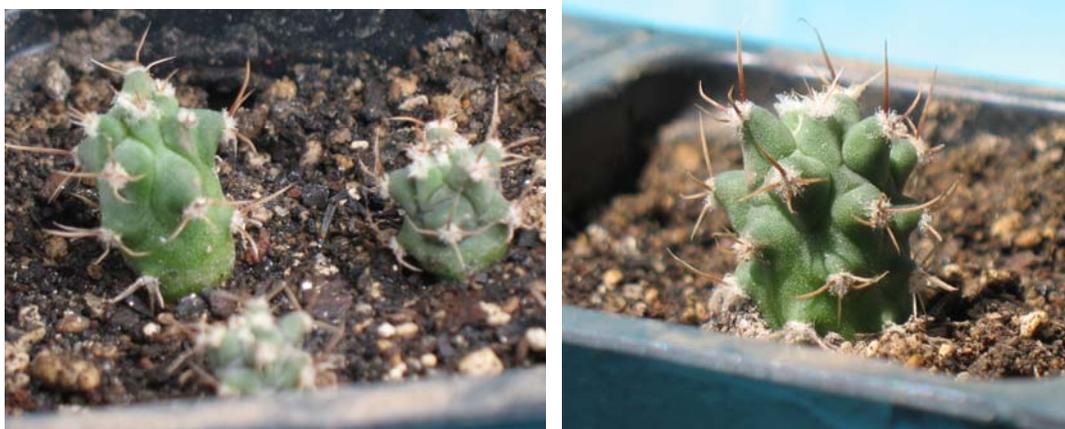


Figura 19. Brotes enraizados de *T. rinconensis* después de un mes en condiciones *ex vitro*.

(318 de 346 brotes enraizados). Después de permanecer 45 días en un ambiente controlado se llevaron al invernadero donde el porcentaje de sobrevivencia mantuvo su valor después de otros 45 días (Figura 19), lo cual indica que para las plantas propagadas por cultivo de tejidos resulta recomendable proporcionar un periodo de por lo menos dos a cuatro semanas de aclimatización en condiciones ambientales controladas que hagan menos agresivo el cambio directo a un invernadero.

7. CONCLUSIONES.

- Se establecieron las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *T. rinconensis*.
- La técnica de desinfección de las semillas fue exitosa obteniendo 0% de contaminación y un porcentaje de germinación del 82%.
- El empleo de medio líquido con puentes de papel filtro promovió la elongación de las plántulas para permitir su manipulación y facilitar la obtención de los explantes.
- La formación de los brotes fue por organogénesis directa por medio de la activación de yemas preexistentes (aréolas).
- El explante más regenerativo fue el apical. Para este tipo de explante, el mejor tratamiento para la proliferación de brotes fue 2iP/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ con un promedio estadísticamente significativo de 4 brotes por explante.
- Para los explantes laterales el mejor tratamiento fue BA/ANA 1/0.1 mg L⁻¹ con un promedio de 1.6 brotes por explante. Estadísticamente no existieron diferencias significativas para este tipo de explantes en todos los tratamientos.
- La formación de raíces en los brotes regenerados no requirió de la presencia de auxinas en el medio de cultivo, sin embargo su desarrollo fue lento.
- La aclimatización de los brotes fue exitosa ya que sobrevivió el 92% de los brotes en condiciones *ex vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte D., F. Jiménez y M. Dita. 1998. **Aclimatización**. En: J. N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 193-206.
- Aíra de M. L., R. Cássia, L. A. Gallo, E. T. de Oliveira y M.E. Soares. 2006. ***In vitro* propagation of *Notocactus magnificus***. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 84: 165-169.
- Alvarado C. Y. 1998. **Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas**. En: J. N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 81-104.
- Álvarez R.J.G., H. Benítez y A. Olivera. 2003a. **CITES: Un convenio para proteger plantas y animales amenazados por el comercio ilegal**. Biodiversitas. 8 (49): 2-6.
- Álvarez R.J.G., H. Benítez y A. Olivera. 2003b. **La ciencia en el combate al comercio ilegal de especies**. Biodiversitas. 8 (49): 7-11
- Arias S. 1993. **Cactáceas: conservación y diversidad en México**. Revista de la Sociedad Mexicana de la Historia Natural XLIV: 109-115.
- Arias S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005. **Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Cactáceas y suculentas mexicanas**. 50 (4): 100-125.
- Barthlott W. y D.R. Hunt. 1993. **Cactaceae**. En: K. Kubitzki, J.G. Rohwer, y V. Bittrich (Eds.), The families and genera of vascular plants Vol II Flowering plants. Dicotyledons. Springer-Verlag, Berlin.
- Becerra R. 2000. **Las Cactáceas, plantas amenazadas por su belleza**. Biodiversitas. 6 (32): 2-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002. **Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES**. Biodiversitas. 32: 8-11.
- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. **El interesante mundo de las cactáceas**. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 233 pp.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. **Las cactáceas de México**. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. 158-166 pp.

- Britton N.L y J.N. Rose. 1963. **The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family**. Vols. III y IV. Dover Publications, Inc. Nueva York. 318 pp.
- Castro-Gallo I., E. Meza-Rangel, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2002. **Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas**. *Scientiae Naturae* 4(2):5-24.
- Dávila-Figueroa C., M. de L. de la Rosa-Carrillo, E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. ***In vitro* propagation of eight species of *Turbinicarpus* (Cactaceae)**. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 41: 540-545.
- Dodds J.H. y L.W. Roberts. 1982. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge University Press. Cambridge. 178 pp.
- Falk, D. A. 1990. **Integrated strategies for conserving plant genetic diversity**. *Bot.Gard.* 77:38-47.
- Fay, M. 1994. **In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?**. *Biodiversity Conservation.* 3: 176-183.
- Flores-Rentería D., Soria-Campos, J. Márquez-Guzmán, L.P. Olguín-Santos y A.L. López-Escamilla. 2006. **Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed) Moran y *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg (Cactaceae), especies mexicanas amenazadas de extinción**. *Memorias in extenso del V Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas*. Hermosillo, Sonora.
- García a. L. y J.C. Noa. 1998. **Obtención de plantas libres de patógenos**. En: J. N. Pérez (ed.). *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 137-149.
- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe. 1996. **Plant hormones and plant regulators in plant tissue culture**. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 32: 272-289.
- Gaspar T., T. Franck, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J. F. Hausman y J. Dommes. 2002. **Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue culture**. *Plant Growth Regulation.* 37: 263-285.
- Giusti P., F. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. ***In vitro* propagation of three endangered cactus species**. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.

- Glass C. 1998. **Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México**. Vol. 1. Ediciones Cante. México D.F.
- Gómez, R. 1998a. **Cultivo de células y tejidos**. En: J. N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 25-44.
- Gómez R. 1998b. **Embriogénesis Somática**. En: J. N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 57-79.
- González R. H., A. C. Ramos, I. B. Camarillo y H. Silos. 2000. **Biotecnología Vegetal. Manual de Cultivo de Tejidos**. Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. México. 133 pp.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2003. **Catálogo de cactáceas mexicanas**. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional par el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. 315 pp.
- Hernández H.M. y H. Godínez. 1994. **Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas**. Acta Botánica Mexicana. 26: 33-52.
- Hernández M. H., C. Gómez-Hinostrosa y B. Goettsch. 2004. **Checklist of Chihuahuan desert Cactaceae**. Harvard papers in Botany. 9 (1): 51-68.
- Hinton J. y G. S. Hinton. 1995. **Checklist of Hinton's collections of the flora of South-Central Nuevo León and adjacent Coahuila**. Acta Botánica Mexicana. 30: 41-112.
- Hurtado D. y M. E. Merino. 1987. **Cultivo de tejidos vegetales**. Trillas. México. 239 pp
- Hussey G. 1986. **Vegetative propagation of plants by tissue culture**. En: M.M. Yeoman (ed.). Plant Cell Technology. Blackwell Sci. Publ. Oxford. 29-66 .
- Jiménez E. 1998. **Generalidades del Cultivo *in vitro***. En: J. N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. p: 13-22.
- Kevers C., T. Franck, R. Strasser, J. Dommes 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.

- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. ***In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism.** *Scientia Horticulturae* 81(1):71-87.
- Mandujano M., J. Golubov y J. Reyes. 2002, **Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar.** *Biodiversitas*. 6 (40): 2-7.
- Mauseth J. 1979. **A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds.** *Cactus and Succulent Journal* 51:186-187.
- Mosco A. y C. Zanovello. 2002. **Thelocactus. An introduction to the genus.** *Cactus & Co.* 2 (6): 146-171.
- Moreno E. 1984. **Análisis físico y biológico de semillas agrícolas.** Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 383 pp.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Orellana P. P. A. 1998. **Propagación vía organogénesis.** En: J. N. Pérez (ed.). *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología.* Instituto de Biotecnología de Plantas. Villa Clara. 151-178.
- Ortiz-Montiel J. G. y R. Alcántara-García. 1997. **Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter).** *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 42 (1): 3-6.
- Papafotiou M., G.N. Balotis, PT. Louka y J. Chronopoulos. 2001. ***In vitro* Plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.
- Pérez-Molphe-Balch, M. E. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. del R. Morones y H. J. Lizalde. 1998. **Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation.** *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 34: 131-135.
- Peréz-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador. 2002. ***In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran desert.** *HortScience*. 37 (4): 693-696.
- Pezoa, A. 2001. **Estrategias de conservación de la diversidad biológica.** En: F. A. Squeo, G. Arancio y J.R. Gutiérrez (Eds.). *Libro rojo de la flora nativa y de los sitios*

- prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo. Ediciones Universidad de la Serena. La Serena. 18: 273-280.
- Phillips G. 2004. **Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants- Recent advances.** *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 40 (4): 342-345.
- Phillips R. L., S. M. Kaeppler y P. Olhoft. 1994. **Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls.** Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 91 (12): 5222-5226.
- Pospíšilová J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzáková. 1999. **Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions.** *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.
- Razdan M. 2003. **Introduction to Plant Tissue Culture.** Segunda edición. Science Publishers, Inc. Enfield. 375 pp.
- Rodríguez G M., 2006. **Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción.** Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Rubluo A. 1997. **Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae).** *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 40: 193-205
- Santos-Díaz M. del S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. de L. Santos-Díaz. 2003a. ***In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae).** *In vitro* Cell.Dev.Biol.-Plant.39: 480-484.
- Santos-Díaz M. del S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. del L. Santos-Díaz. 2003b. **Clonal propagation of *Turbinicarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction.** *Bradleya*, 21: 7-12.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. **Norma Oficial Mexicana NOM-059ECOL2001 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. 6 de marzo de 2002. México, DF.
- Singh B B. 1999. **Regeneration of *Coryphanta elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants.** *Scientia Horticulturae*. 81: 337-344.

- Starling R. y J. Dodds.1983. **Tissue-culture propagation of cacti and other succulents.** Yearbook of British Cactus and Succulent Society 1:84-90.
- Tapia C., D.M. 2006. **Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción.** Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73 p.
- Velázquez L. y R. Soltero. 2001. **Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. micromeris, Cactaceae.** Cactáceas y Suculentas Mexicanas. XLVI (3):56-62.
- Villarreal-Quintanilla. J. Á. y J. A. Encina-Domínguez. 2005. **Plantas vasculares endémicas de Coahuila y algunas áreas adyacentes, México.** Acta Botánica Mexicana. 70: 1-46.
- Vovides A. P., V. Luna y G. Medina. 1997. **Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación.** Acta Botánica Mexicana. 39:1-42.
- Zamora M.H.C., A.L López-Escamilla, L.P. Olguín-Santos y J. Márquez-Guzman. 2007. **Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (*galeotti* ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae).** Memorias del XVII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, Zacatecas.

Páginas en red:

- Mosco, A. 2004. página en red:
www.thelocactus.cactus-all.com/Species_Files/rinconensis.html
- Comisión Nacional de Áreas Nacionales Protegidas (2005), página en red:
www.conanp.gob.mx/anp/rb.php
- International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. Red List of threatened Species (2004), página en red:
www.redlist.org
- Desert Tropicals:
www.desert_tropicals.com/Plants/Cactaceae/Thelocactus_hintonii.html
- Infojardin:
www.infojardin.com/foro/Showthread.php?t=37408

- Ciao! Die shopping community:
www.ciao.de/Thelocactus_rinconensis_14337224
- Digilander:
www.digilander.libero.it/cacti/p01/pL053.htm
- Top tropicals:
www.toptropicals.com/html/totropicals/cultivar.htm
- Worl Wild Life Fund:
www.wwf.org.mx/wwwfmex/especies4_amenazadas.php
- Web shots:
<http://home-and-garden.webshots.com/photo/1369405866058706046VkJbIk>
- Cacti guide:
<http://cactiguide.com/Thelocactus.htm>
- Ortega Cactus:
www.ortegacactus.es/ortegacactus.junio2007.pdf
- Vendita on line di piante:
www.ilgiglio.biz/index.php?option=com_virtvemart&page=shop.browser&category_id=53&Itemid=48&vmcchk=1

9. ANEXOS.

ANEXO 1.

Descripción Botánica de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose

Glass (1998).

Tallo: 20 cm de diámetro. *Costillas:* 24 onduladas, entre 10 y 20 mm de ancho y de 10 a 25 mm de alto, verde grisáceo con tonalidades púrpura bajo fuerte exposición a la luz, mas o menos divididas en tubérculos bastante prominentes. *Espinas:* 3-10 no fácilmente distinguibles entre radiales y centrales, 15-70 mm de largo, curvadas que no se desintegran con el tiempo, color castaño cuando jóvenes, luego desde amarillentas hasta gris, más oscuras y gruesas hacia la base.

Flores: de 40 mm de largo, 45 mm de diámetro; *segmentos externos del perianto:* con matices púrpura; *segmentos internos del perianto:* amarillas, más oscuras hacia la base, anteras amarillas, estilo con unos 8 lóbulos del estigma amarillento que sobresalen de las anteras.

Frutos: Globoso con escamas, carnosos al principio, luego se secan, dehiscentes basalmente; *semillas:* café oscuro, casi negras 1.9 mm de largo 1.5 mm de ancho un poco curvadas, con hilo basal.

Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991).

Planta generalmente simple. *Tallo* depresso-subgloboso hasta muy aplanado, de alrededor de 12 a 20 cm de diámetro y hasta cerca de 8 cm de altura, de color azul glauco y ocasionalmente verde grisáceo. *Costillas* no claramente definidas, mas o menos prominentes, fuertemente tuberculadas, con escasos tubérculos en cada una de ellas. Generalmente tan sólo 2 o 3. *Tubérculos* oscuramente dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, mas o menos aplanados lateralmente, algo angulosos, con la base mas o menos poliédrica, provistos de un corto surco areolar. *Aréolas* circulares, grandes, de alrededor de 6 mm de diámetro, cuando jóvenes lanosas, después desnudas. *Espinas radiales* 5 a 11, ausentes en dos de las variedades, robustas, rectas o encorvadas. *Espinas centrales* 3 a 5, robustas rígidas, a veces faltantes en una de las variedades. *Flores* grandes de cerca de 4 cm de longitud y de diámetro, de color variable desde blanco hasta amarillo pálido o con una franja media rosada hasta rosado purpúrea; filamentos blancos;

anteras de color amarillo anaranjado intenso; estilo blanquecino; lóbulos del estigma 7 a 12, de color crema. *Fruto* toneliforme, de 6 a 7 mm de longitud, escamoso, al principio carnoso, después seco, conserva adheridos los restos secos del perianto. *Semillas* ovoides, de 1.5 a 1.7 mm de longitud; testa de color castaño muy oscuro, casi negra; hilo circular muy amplio, circundado por un anillo que deja el funículo al desprenderse; micrópilo fuera del hilo; embrión ovoide, succulento, con restos de perisperma.

ANEXO 2.

Formulación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Elementos	Concentración (mg L ⁻¹)		
	MS	MS 50%	MS 50% CA
MACRONUTRIMENTOS			
NH ₄ NO ₃	1.65	0.825	0.825
KNO ₃	1.9	0.95	0.95
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.37	0.185	0.185
KH ₂ PO ₄	0.17	0.085	0.085
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.44	0.22	0.22
MICRONUTRIMENTOS			
KI	0.00083	0.000415	0.000415
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031	0.0031
MnSO ₄ •4H ₂ O	0.01689	0.008445	0.008445
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.0086	0.0043	0.0043
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.00025	0.000125	0.000125
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.000025	0.0000125	0.0000125
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.000025	0.0000125	0.0000125
Sol. Fe- EDTA			
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0.0373	0.01865	0.01865
FeSO ₂ •7H ₂ O	0.0278	0.0139	0.0139
VITAMINAS			
Ácido Nicotínico	0.0005	0.00025	0.00025
Piridoxina-HCl	0.0005	0.00025	0.00025
Tiamina-HCl	0.0001	0.00005	0.00005
Myo-Inositol	0.1	0.05	0.05
GLICINA	0.002	0.001	0.001

SACAROSA	30gL ⁻¹	15gL ⁻¹	
AGAR	8gL ⁻¹		9gL ⁻¹
CARBÓN ACTIVADO	--	--	1gL ⁻¹
pH	5.7 – 5.8		

La esterilización del material y medio de cultivo se realizó en una autoclave a 121 °C y 1.5 Kg/cm² de presión durante 18 minutos.