

2ej  
9

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OPTIMIZACION EN LA PROLIFERACION DE CALLO  
E INDUCCION DE BROTES " in vitro " DE  
Astrophytum myricostema var. petosina

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

B I O L O G O

Presenta

ALEJANDRO ANAYA SOTO

México, D.F.

1986



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 está 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.

## C O N T E N I D O

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	2
ANTECEDENTES . . . . .	5
a. Descripción botánica . . . . .	5
b. Clasificación botánica . . . . .	7
c. Origen . . . . .	8
d. Distribución . . . . .	9
e. Importancia Económica . . . . .	11
f. Problema de extinción . . . . .	13
g. Métodos de propagación . . . . .	16
h. Cultivo de tejidos . . . . .	19
i. Cultivo de tejidos de cactáceas . . . . .	24
METODOLOGIA . . . . .	27
a. Proliferación de callo . . . . .	28
b. Inducción de brotes . . . . .	30
RESULTADOS Y ANALISIS . . . . .	31
a. Proliferación de callo . . . . .	31
b. Inducción de brotes . . . . .	36
CONCLUSIONES . . . . .	41
RECOMENDACIONES . . . . .	43
APENDICES . . . . .	45
A. Abreviaturas de los reguladores de crecimiento . . . . .	45
B. Figuras . . . . .	46
1. Planta típica de <u>A. myriostigma</u> . . . . .	46
2. Técnicas de propagación por esqueje . . . . .	47
3. Técnicas de propagación por injerto . . . . .	48

4.	Establecimiento del cultivo aséptico . . . . .	49
5.	Tipos de consistencia observados en los callos. . . . .	50
6.	Tipos de callos observados en cada tratamiento a las 10 semanas de cultivo . . . . .	51
7.	Tipos de diferenciación observados en cada tratamiento a las 12 semanas de cultivo, en el medio de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985) . . . . .	52
C.	Cuadros . . . . .	53
1.	Composición del medio nutritivo de germinación de semillas de <i>Le. Fossard</i> (1979). . . . .	53
2.	Composición del medio nutritivo Groenewald, Wessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985) . . . . .	54
3.	Arreglo de tratamientos factorial 5 X 7 de Kn y 2,4-D para la fase de proliferación de callo . . . . .	55
4.	Composición del medio nutritivo "A" para la multiplicación de brotes de <i>Murashige</i> (1976) . . . . .	56
5.	Arreglo de tratamientos factorial 4 X 3 de 2iP e AIA para la fase de inducción de brotes . . . . .	57
D.	Tablas . . . . .	58
1.	Semana de aparición de tejido calloso para cada tratamiento. . . . .	58
2.	Diámetro promedio de la base de los callos (mm) observados al inicio y a lo largo de 10 semanas (cada quince días) para cada tratamiento . . . . .	59
3.	Semana de aparición y número total de brotes en cada tratamiento en el medio basal de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985) . . . . .	61

4. Diámetro promedio de la base de los callos (mm) observados a las 10 semanas de cultivo . . . . .	62
BIBLIOGRAFIA . . . . .	63

R E S U M E N

La colección excesiva con fines comerciales y la destrucción de sus habitats naturales han provocado que diversas especies de cactáceas estan en peligro de extinción; entre ellas se encuentra *Astrophytum myriostigma* var. *potosina*. En 1985 Díaz logró su propagación empleando la técnica de cultivo de tejidos a partir de plántulas germinadas " in vitro ", obteniendo desarrollo de callo y posterior diferenciación en plántulas.

En el presente trabajo se optimizó esta metodología aplicando dos cuadros de tratamientos. En el primero se se leccionó el nivel hormonal 5 mg/l de Kn y 0.5 mg/l de 2,4-D que promovió el desarrollo de callo de consistencia desmenuzable, de buen tamaño y coloración verde intensa. Este callo se sometió a un segundo cuadro de tratamientos en el que se seleccionó el nivel hormonal que favoreció el desarrollo del mayor número de brotes en el menor tiempo, siendo éste 30 mg/l de 2iP y 0.5 mg/l de AIA.

La inducción de brotes se obtuvo en el medio basal utilizado para el desarrollo de callo y no en el medio reportado por Díaz (1985).

El tiempo de inducción de los 46 brotes del tratamiento seleccionado fue de aproximadamente 6 meses y medio correspondiendo un mes para la obtención de los explantes de las plántulas germinadas, dos meses y medio para la inducción y crecimiento de callo y tres meses en la diferenciación de brotes.

INTRODUCCION



Existe la creencia de que las cactáceas, son exclusivas de áreas desérticas, áridas y ardientes aunque la mayoría así lo hacen, hay géneros que viven en selvas tropicales y son epífitas, otros lo son parcialmente (13, 17) de hecho se distribuyen a todo lo largo del continente americano (9, 12, 13, 17, 33) siendo en México donde se localiza el mayor número de especies (12, 13, 17) principalmente debido a su situación geográfica, topografía y climas variados (13, 63).

Actualmente la familia Cactaceae cuenta con más de 2 000 especies (13, 33, 63) y tienen un papel importante en la alimentación del ganado en las cuencas lecheras situadas en las zonas áridas (13, 43, 63). En México tanto el fruto como los cladodios del nopal se emplean en la alimentación humana (13, 63). También las cactáceas se utilizan en la industria química farmacéutica, debido a que producen gomas, mucilagos, pectinas, alcaloides (12, 13, 43, 63) y cada día se van descubriendo más substancias químicas lo que demuestra que es un recurso que no ha sido explotado adecuadamente (63).

La importancia de las especies cactológicas no solo se reduce a lo anteriormente expuesto sino también al aspecto ornamental, debido a sus formas raras y en especial a sus flores vistosas (63) siendo codiciadas por coleccionistas y comerciantes en jardinería (52, 63) habiendo cada día una creciente demanda (5, 8, 52). Nuestro país exporta cactáceas a Alemania Occidental, Alemania Oriental, Japón, Holanda y E.U.A.. En este último se reportó un total de 3,081 Kg bruto en el año de 1979 (6) al siguiente año la exportación total fue de 2 millones de cactáceas (2). Vemos que la explotación comercial se realiza en grandes proporciones, pero es hecha por unos cuantos mexicanos y por un numeroso grupo

de extranjeros (18, 52) llevándolas de contrabando a sus países (2, 53) vendiéndolas a precios muy altos (2, 52).

Este saqueo y la destrucción de sus hábitats naturales han provocado que 91 especies de cactáceas mexicanas estén en peligro de extinción (60).

Diversos institutos han desarrollado líneas de investigación tendientes a sentar bases para el establecimiento de tecnologías adecuadas para el aprovechamiento de estas especies que aseguren por un lado su preservación y por otro ofrezcan una alternativa económica (53). Para ello Vovides en 1981 (60) realizó una lista preliminar de plantas mexicanas raras, vulnerables, en peligro de extinción o ya extintas.

La propagación vegetativa constituye una forma de preservación. En las cactáceas puede ser por medio de esqueje e injerto, sin embargo existen especies en las que ninguno de éstos métodos puede usarse y la propagación debe hacerse por semilla (42). En muchos casos las semillas son difíciles de obtener debido a que algunas plantas son raras y autoestériles y además el crecimiento es muy lento (28, 42).

Otra alternativa es la micropopagación por medio de la cual puede lograrse la rápida propagación vegetativa (18, 37, 42). La técnica consiste en lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, complementado con vitaminas, hormonas y fuentes de carbono, en condiciones de total asepsia, a partir de porciones vegetales muy pequeñas, (17, 18, 29) aportando al mismo tiempo múltiples ventajas y aplicaciones como son la preservación de germoplasma, la obtención de plantas libres de enfermedades principalmente virus y en cualquier época del año, producción de fármacos y otros

productos naturales, disminuir el tiempo de propagación y de desarrollo de algunas especies, para mejoramiento genético, etc. (7, 37, 46).

La técnica se ha utilizado en los cactus para la investigación en la biosíntesis de alcaloides (54), estudiar el proceso de organogénesis (41), estudiar la fotosíntesis en el cultivo de suspensión (53), etc. Sin embargo Mauseth (42), Corona y Chávez (18) y Wochok (61) han propuesto la metodología de cultivo de tejidos como una alternativa de preservar especies de cactáceas en peligro de extinción. Con ésta misma finalidad Díaz (1985) logró la proliferación de callo y el desarrollo de plántulas en Astrophytum myriostema la cual está catalogada como cactus en peligro de extinción (60). En el presente trabajo se pretende optimizar esta metodología seleccionando, por un lado los niveles hormonales que promueven el desarrollo de callo de buena calidad para la provisión constante del material vegetativo necesario en la diferenciación, y por otro elegir los niveles hormonales que favorezcan la formación del mayor número de brotes en el menor tiempo posible.

A N T E C E D E N T E S

### 3. Descripción ecológica

Dentro de las plantas suculentas encontramos a las cactáceas, las cuales se distinguen por tener como órganos exclusivos, las aréolas y son las que dan origen a las hojas reducidas, flores, nuevos tallos, espinas, gloquidas, cerdas, pelos y a veces, raíces adventicias (13).

Las especies de la familia Cactaceae han adquirido una serie de adaptaciones al medio por ejemplo el desarrollo de los parénquimas en el tallo, responsables de la succulencia, han reducido la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas, el limbo de las hojas se ha reducido transformándose en escamas, espinas y gloquidas, existe un engrosamiento de la cutícula y de las membranas celulares de los tegumentos, la gran longitud que adquieren algunas raíces que facilita la absorción rápida del agua, etc. (13, 63).

Las espinas aunque son órganos característicos de las cactáceas no en todas las especies se presentan como sucede en Astrophytum myriostigma (13).

La planta de A. myriostigma es simple o cespitosa (15) y tiene un tallo globular o algo deprimido en el centro y cuando es adulto es algo columnar (9, 40). Alcanza a medir 60 cm. de altura (12, 15, 40) y de 10 a 25 cm. de diámetro (9). Posee un cuerpo con costillas anchas y crestas agudas en número de 4 a 8 (9, 12, 30) frecuentemente 5 (15, 32) y raramente 10 (9, 12, 15, 30, 32). Estas pueden tornarse de rectas a espiraladas (13). ( Fig. 1 )

El tejido epidérmico del sistema tegumentario está formado por 3 o 4 capas epidérmicas de paredes fuertemente cutinizadas, las que se agrupan formando papilas uniformemente

distribuidas y entre éstas hay borlas fibrosas de pelos o escamas cuya función parece ser la de absorber al agua de la atmósfera (13). Estas pequeñas escamas lanosas de color blanco (12, 13) son las que le dan a la planta la apariencia grisácea pero pueden estar suaves como en la var. nuda (30, 32).

Debajo de la epidermis existe una capa de células que constituyen la hipodermis en donde se encuentra oxalato de calcio que son inclusiones cristalinas (13).

La capa adyacente al sistema tegumentario es el tejido colenquimatoso y en A. myriostigma forma un verdadero exosqueleto que le da la consistencia y solidez del tallo (13).

En cuanto a las aréolas, están dispuestas a todo lo largo del filo de cada costilla (9) de 10 a 15 mm. distantes entre sí las que son circulares, lanosas (12, 30) y de color parduzco (9).

La flor amarilla con lustre sedoso por la parte interna (28, 30) crece en el centro de la planta midiendo 4-6 cm. de largo ancho (12, 15, 40). Los segmentos externos del perianto son angostos con las puntas oscuras (12, 30) mientras que los internos son oblongos (15); filamentos y estilos amarillos (12), ovario escamoso (12, 15), presenta 7 lóbulos el estigma (12). La floración ocurre en los meses de Abril a Octubre (28).

Los frutos son gruesos, espinosos (30) secos y dehiscentes en forma de estrella (12).

Las semillas son de color negro, brillantes, frágiles (30) y de forma abarquillada (9).

De esta especie se han descrito 6 variedades en las que está incluida A. myriostigma var. potosina, cuyas caracterís

7

ticas principales son las de tener un tallo de color verduzco y generalmente con 5 costillas, son globulares con el centro deprimido y de diámetro más grande que su altura (25); cuando está en estado adulto carece de escamas excepto en el centro (25); sus flores son más pequeñas que la variedad coahuilensis (12, 25); poseen un fruto seco (12), ligeramente oblongo, lanoso y dehiscente con cuatro o cinco incisiones dispuestas radialmente en la base en donde se encuentran las semillas (25) de color pardo (12).

#### b. Clasificación botánica

Se han elaborado diversas clasificaciones para la familia Cactaceae, las cuales están basadas en la morfología externa de las plantas (11, 13) a excepción del sistema de clasificación de Euxbaum que se basa en los estudios de anatomía comparada y es la más utilizada en la actualidad (11).

La familia Cactaceae está dividida en 3 subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cereoideae, siendo la primera probablemente la ancestral (9, 13).

A. Myriostigma pertenece a la subfamilia Cereoideae y al género Astrophytum (9, 12, 13).

Cabe hacer mención que originalmente, esta especie fue clasificada en 1845 dentro de la tribu Echinocacteeae por Salm Lyck pero debido a que sus flores y semillas son parecidas a las del género Frailea fue transferido por Euxbaum a la tribu Notocactene (13). Además el nombre original de la especie fue Cereus cechicconi (12, 25) sin embargo la ausencia de espinas, su forma y otras características hicieron

que el belga Charles Lasaire en 1866 creara el género Astrophytum y le diera el nombre científico de A. myriostigma y no fue hasta 1922 que se estableciera definitivamente con éste nombre por Britton y Rose (25, 32).

De esta especie se han descrito 5 diferentes variedades a saber: coahuilensis, potosina, basculipensis, cuadricostata ( o variedad tetragona ), columnaris y nuda.

Dado lo anterior el presente trabajo maneja la siguiente clasificación (13, 33).

Reino	Vegetal
División	Embriophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Cactales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cerecoideae
Tribu	Notocactaeae
Género	<u>Astrophytum</u>
Especie	<u>A. myriostigma</u>
Variedad	<u>potosina</u>

#### c. Origen

En general se acepta que las cactáceas son originarias del continente americano y según Buxbaum (1969) (13) tuvieron su origen en las formas ancestrales del Caribe, emigrando hacia el noroeste, diferenciándose durante su trayecto en los géneros actuales que crecen en la mayoría de los tipos



de vegetación de México.

Dentro de los cactus mexicanos están las cuatro especies del género Astrophytum (12, 13, 15, 25): A. myriostigma, A. asterias, A. capricorne y A. ornatum.

A. myriostigma es originaria del noroeste del país (12, 15, 17, 32) y fue descubierta en los cerros de la Hacienda de San Lázaro al noroeste de San Luis Potosí por Galeotti en 1837 (25) quien le dió el nombre científico de Cereus cachicochi (12, 25) cuyo significado en griego es estrella de mar (25) posteriormente Charles Lemaire le dió el nombre de Astrophytum myriostigma (17, 25, 32). Astrophytum significa planta estrella (15, 25, 32), y myriostigma no se refiere a los estigmas de las flores sino más bien a sus escamas pilosas que le dan el color gris blanquecino (32).

Francisco Vender fue el primero en cultivar esta especie y Jas Courant el primero en obtener su flor (25).

#### d. Distribución

Como ya se mencionó las cactáceas son originarias del continente americano y su distribución va desde los 53° latitud norte ( Estado de Alberta y Columbia Británica en Canadá ) hasta los 50° latitud sur ( Patagonia en Argentina ) (9, 12, 13, 17, 33). Sólo una especie del género Rhipsalis ha sido encontrada fuera del continente americano, se piensa que esta especie fue introducida a Africa Tropical en estado de semilla por aves o el hombre (9, 12, 13, 33). Algunos tipos de cactus como las Opuntias han llegado a adaptarse en otras partes del mundo, particularmente en las regiones medi

terráneas de África y Eurasia (9).

Por hallarse el mayor número de especies en nuestro país, se le ha dado el nombre de "Hogar de los Cactus" (17). La gran variedad de especies es debido principalmente a su situación geográfica, topografía y a sus climas variados (13, 63) existiendo una serie de localidades en las que se desarrollan con mayor frecuencia (13).

De la gran variedad de especies que alberga México, encontramos a A. myriostigma cuya distribución va desde el centro, hasta el norte de nuestro país (12, 15, 40) localizándose principalmente en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Tamaulipas, Chihuahua, Durango e Hidalgo (12, 15, 25, 40) hasta una altitud de 2 500 m sobre el nivel del mar (23).

La var. coahuilensis se encuentra cerca de Torreón y montañas del estado de Coahuila; la var. potosina en el estado de San Luis Potosí; var. tamaulipensis va desde Tamaulipas al este de Nuevo León y San Luis Potosí; var. cuadricostata y var. columnaris en el estado de Tamaulipas; y var. nuda en el estado de San Luis Potosí (25).

A. myriostigma es conocida en estos lugares como Peyote cimarrón (Durango), Mitra (San Luis Potosí y Monterrey), Birrete de Obispo (Coahuila) (12, 40) y Bonete en Durango (40) pero en la mayoría de la información bibliográfica se le da el nombre de Birrete de Obispo, en alusión a la forma que presenta.

Por último mencionaremos que esta especie es solitaria y generalmente crece entre las rocas o algunas veces está asociada con Opuntia (15).

### e. Importancia económica

Las cactáceas han alcanzado gran importancia económica pues son utilizadas para la alimentación humana, como forraje para ganado, usos medicinales, en la elaboración y extracción de sustancias diversas, también tienen un amplio valor como plantas de ornato y algunas de ellas se les atribuyen propiedades mágicas, tal es el caso del peyote, que ha desempeñado un papel importante en las leyendas, tradiciones e historias de las diferentes tribus indígenas de México (13, 63) y aún en nuestros días sigue siendo planta sagrada en diferentes regiones de nuestro país y de los E.U.A. (13).

Como alimento humano puede mencionarse que todos los órganos son comestibles, principalmente los cladodios y los frutos (14, 63), los que aparte de ser muy gustados en nuestro país, son alimentos exóticos en otras partes del mundo (63).

Los cladodios, frutos y semillas son importantes para la alimentación del ganado en las cuencas lecheras situadas en las zonas áridas (14, 43, 63) o en los agostaderos como forraje en épocas críticas (63).

Con fines medicinales los cactus se han empleado desde la época prehispánica para el tratamiento de huesos rotos (24), fiebres biliosas y malignas, las hernias y las úlceras (13) y actualmente para el tratamiento de diarreas, facilitar el alumbramiento a las mujeres, o para enfermos de los riñones (43).

De las cactáceas pueden obtenerse colorantes en forma directa o indirecta. En forma indirecta, desde la época prehispánica se ha cultivado la cochinilla, que es un parásito

de los nouzias y del que se extrae la goma, colorante que sirve para la tinción de telas (13) e importante para su aplicación en la industria alimenticia, cosmetológica y farmacéutica (14, 43). En México, los frutos de Coultia schumasinii son empleados para la extracción de colorantes (43).

Las cactáceas se han venido utilizando para la preparación de pegamentos y adhesivos, debido a su alto contenido de mucílagos (12).

Los cactus producen entre otras muchas sustancias, gacinas útiles en la preparación de jaleas y otros dulces (53); y alcaloides, siendo el más conocido la mescalina por los efectos alucinógenos singulares que produce en el organismo (13).

Diversas especies de cactáceas se emplean en la obtención de fibras y pulpa para la fabricación de papel; fuente de azúcar, alcohol y vinagre; como fertilizante; en la fabricación de un material semejante al corcho con propiedades aislantes al calor y al sonido (43, 53).

Vemos que todos los órganos de las cactáceas se han empleado, hasta las espinas que fueron utilizadas en la antigua Tenochtitlán como instrumento de tortura en el auto-sacrificio. Han sido objeto en el diseño de jeroglíficos de diferentes lugares de nuestro país (13, 53) y desde el primer contacto con los europeos, llamaron la atención por sus formas raras, floración vistosa y exótica, lo que hizo que fueran y sean codiciadas por los coleccionistas (24).

En la actualidad los cactus tienen una gran demanda como planta de ornato. Dicha demanda va en aumento (8, 16, 52, 53) y está entre las plantas de ornato clasificadas como las más populares en E.U.A. (33) pues son objeto de obse-

quilo en días especiales como por ejemplo " el viejito " se da como regalo en el día del padre (8); o también se diseñan terrerías o macetas acompañadas con otras especies o figuras de cerámica que acentúan el linaje mexicano ofreciendo al coleccionista una selección muy amplia (8).

Estas colecciones se iniciaron desde el siglo XVII y a través del tiempo aumenta la popularidad de las especies, tal es el caso de A. myriostigma que es considerada como cactus imprescindible en toda colección (30) debido a su forma peculiar de birrete de obispo, ( comúnmente conocido con éste nombre ). Cada día las cactáceas son más caras (8), en 1980 Carregia gigantea ( Saguero ) de 20 pies de alto se vendía a más de mil dólares (16).

Según datos de la Secretaría de Comercio Exterior, en 1981 México exportó 89 769 Kg bruto de cactáceas con un valor de 7,523 dólares a Alemania Occidental, Alemania Oriental, E.U.A., y Japón. Para 1984 de Enero a Junio, disminuyó la exportación a 53 Kg bruto debido a que los cactus en ésta fecha ya fueron considerados como producto controlable (6).

#### f. Problema de extinción

Las especies de la familia Cactaceae han permanecido a lo largo de la historia de México, adquiriendo gran importancia entre las tribus prehispánicas, ésta importancia llegó a tal grado que el jeroglífico de la gran Tenochtitlán ostentaba un nopal, símbolo que aún se conserva en la bandera nacional (13, 63). Posteriormente, al descubrimiento de América, las cactáceas fueron uno de los atractivos más importantes

de México (13, 14, 64) siendo adecuado para llevar a casa, ya en el siglo XVI tales plantas habían sido señaladas como naturalizadas en Europa (20). En el siglo XVIII se iniciaron negocios que vendieron estas plantas extrañas y sus semillas se iban trayendo como una exotización irregular de este recurso (64).

Actualmente las cactáceas son vistas como plantas ornamentales, ya que la belleza de su fisonomía y en especial sus flores las hace ser codiciadas por coleccionistas (63). Desgraciadamente en México pocas personas aprecian el valor natural de los cactus, la mayoría los ve como plantas molestas, estorbosas, etc., en cambio la venta comercial está en grandes proporciones (52). La venta es realizada por unos cuantos mexicanos que conocen su valor comercial y por un numeroso grupo de extranjeros que no les interesa la conservación (52) siendo Japón, Alemania y otros países europeos los que si han sabido apreciarlas y con ésto se las han llevado de contrabando a sus países (2, 16, 64). Este contrabando suma alrededor de 25 millones de cactáceas anualmente que salen de México (2).

Parecería que no existieran leyes que prohiban la colección y exportación de los cactus, sin embargo las hay (2, 16, 52). Estas leyes fueron instituidas durante la gestión gubernamental del General Lázaro Cárdenas (2) siendo la Dirección General de Economía Agrícola de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos la que otorga los permisos (52). Pero estos permisos dejan mucho que desear, ya que en ellos no se especifica claramente lo que se va a coleccionar (nombre de la especie, estado de la planta, número de la misma, etc.) además éstos "permisos" de exportación son autorizados por

otras agencias o funcionarios (2, 52).

Por razones desconocidas, México no ha firmado la convención de Washington, Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Silvestres de Flora y Fauna en Peligro de Extinción ( CITES ) (2, 52, 60).

Además del peligro existente por este saqueo, existen otras causas que amenazan la existencia de éstas valiosas especies como son: a) industrialización y urbanización del país b) apertura de nuevas áreas agrícolas y ganaderas c) la creación de nuevos distritos de riego d) la construcción de caminos e) competencia de otros componentes del eco sistema f) el tendido de líneas eléctricas g) ataque por roedores y plagas h) existencias raras por condiciones como son poblaciones endémicas aisladas y de pequeño tamaño (60, 64).

Como podemos observar las 2 principales causas que amenazan, son la excesiva colección con fines comerciales y la destrucción de habitats naturales (52) y cada día aumentan las especies raras o en peligro de extinción en las listas realizadas por diversas instituciones e investigadores por ejemplo las del Jardín Botánico de la UNAM, las realizadas por Vovides (1981), la de Sánchez - Mejorada (1981). Donde podemos encontrar al cactus A. myriostigma clasificado como planta en peligro de extinción.

### f. Métodos de propagación

Las cactáceas pueden propagarse fácilmente tanto sexual como asexualmente siendo esta última la más común (4, 28). La propagación sexual se lleva a cabo por medio de semillas y se utiliza preferentemente cuando: a) se desea obtener individuos con nuevas características fenotípicas b) la multiplicación asexual es muy lenta c) si se trata de plantas difíciles de propagarse vegetativamente y d) se quiere obtener plantas libres de enfermedades (4, 29). En cambio la propagación asexual se refiere a la reproducción de individuos a partir del uso de partes vegetativas de la planta como yemas, tallos, hojas y raíces, gracias a que estos órganos vegetativos tienen una alta capacidad de regeneración (29).

Las cactáceas pueden propagarse asexualmente, principalmente por esqueje o injerto (4, 9, 28).

La multiplicación por esqueje puede ser mediante partes de tallo como en los cactus de forma columnar, o como en las Opuntias que enraiza algún segmento o bien se enraizan los tubérculos como en las especies del género Mammillaria, también utilizando un hijuelo, separándolo de la planta madre como sucede con las especies globosas de Echinopsis, Rebutia, Mammillaria, etc. y por último enraizando las plantas que por razones patológicas hayan perdido sus raíces (4, 9, 28) (fig. 2). En este tipo de propagación es necesario tomar ciertas precauciones como la de realizar los cortes ya sea transversalmente, en forma cónica o angularmente según la especie a tratar (9, 28) procurando que la altura del corte sea mayor que la base (9) y debe hacerse con navajas bien



afiladas para evitar daño alguno en el corte (28). Es esencial que antes de plantar los esquejes o hijuelos permanezcan en un lugar templado, sombreado y ventilado hasta que la herida de la base esté perfectamente seca (9, 28) y en posición recta (no horizontal) para evitar arqueamiento del esqueje y enraizamiento de las aréolas (28). Pasado este período la pieza vegetal a enraizar no debe hundirse en el sustrato, ligeramente húmedo, más allá de 2-4 cm. (9).

En cuanto al método de propagación por injerto, existen cuatro técnicas, a saber: a) de caras planas b) en cuña c) en cuña invertida y d) en pivote (9) (fig. 3). El primero se usa para especies globulares por ejemplo especies de Ferrocactus sirve como un buen portainjertos para Astrophytum (65), el de cuña invertida para injertos delgados y el último para especies trepadoras. Estas cuatro técnicas requieren de una buena unión entre el injerto y el patrón, para ello, se utilizan materiales tales como cuerdas, cintas adhesivas, broches, espigas, adhesivos como la cianocrilato o 2 tablillas de madera clavadas perpendicularmente entre sí (4, 9, 28, 65).

Al igual que el método de esqueje, el de injerto requiere de ciertas precauciones como son las de utilizar portainjertos vigorosos; unir inmediatamente el injerto y no dejar que cicatrice como el esqueje; frotar ligeramente el injerto sobre la herida del patrón para evitar la formación de burbujas, logrando así un perfecto contacto entre ambas especies; checar que las cuerdas o bandas adhesivas no sujeten fuertemente; remover espigas o broches y no dejarlos indefinidamente para evitar infecciones (4, 9, 28). Por último es recomendable injertar durante la temporada de crecimiento (4, 9).

La propagación o por in de semillas requiere de condiciones más precisas ya que el porcentaje de germinación va a depender de la especie, edad de la semilla, temperatura, humedad, luz y mucho cuidado en el manejo de las mismas, observándose dicho porcentaje a las 2 - 3 semanas de la siembra (23). Es recomendable sembrar en invernadero, aunque puede realizarse en cajas de propagación, siendo las temperaturas óptimas, para la germinación de  $16^{\circ}$  -  $21^{\circ}$  C. por la noche y de  $28^{\circ}$  -  $30^{\circ}$  C. por el día, mientras que en las plántulas ya formadas las temperaturas normales de crecimiento son adecuadas (9, 23, 28).

La siembra se realiza en bandejas de poca profundidad, 5-6 cm., cuyo fondo posee pequeños orificios (9, 23, 28) y consiste en esparcir con sumo cuidado y de forma homogénea las semillas previamente esterilizadas con hipoclorito de calcio (28) sobre la superficie del suelo humedecido (9, 28), teniendo cuidado de no cubrir las con el sustrato ya que necesitan la luz para su germinación (23, 28). Realizado esto, debe mantenerse constante la humedad, regando con agua tibia por capilaridad (9, 23, 28), además para evitar proliferación de hongos que causen pudrición a las plántulas puede pulverizarse con algún producto fungicida (9).

A partir del momento en que la germinación ocurra debe cuidarse que el lugar esté sombreado, manteniendo el color verde vigoroso las plántulas (9, 23, 28) y por último cuando las plantas de tipo globular alcancen un diámetro de unos 7 mm. y las de forma columnar poseen una altura de 2.5 cm. serán trasplantadas a una bandeja más profunda y con un suelo algo menos turboso y más nutritivo (9, 9, 23, 28).

### b. Cultivos de tejidos

Los métodos de propagación vegetativa, de esqueje o injerto no pueden emplearse en cactus (42) y el de semilla es el más lento (4, 42) además algunas plantas son raras y autostériles y por ende son difíciles de obtener (28, 42).

Una alternativa para su posible propagación es el cultivo de tejidos o micropropagación que consiste en el cultivo de porciones o órganos vegetales como meristemos, semillas, embriones, protoplastos, etc., en un medio artificial y bajo condiciones asepticas para inducir el desarrollo de plantas (7, 18, 29).

Esta técnica tiene ventajas y aplicaciones por ejemplo la de obtener fármacos y otros productos naturales, preservar germoplasma, multiplicación clonal de variedades, mejoramiento genético, obtención de plantas libres de patógenos, permite la propagación en cualquier época del año, etc. (7, 29, 37, 46). Sin embargo presenta ciertos problemas como son, entre otros, el de lograr la adaptación de plantas a condiciones ambientales y lo costoso de la técnica principalmente al inicio de la práctica (7).

Las formas básicas de cultivo son seis a saber: a) células y células en suspensión b) órganos c) embriones d) meristemos e) polen y anteras y f) células aisladas y protoplastos (10).

Algunas de estas técnicas son más relevantes que otras, pero independientemente del cultivo a seguir debe tenerse en cuenta al establecer el cultivo: la selección del explante, el medio nutritivo a usar y las condiciones de incubación, aunque éste dependerá de los objetivos que se persigan.

Al seleccionar el explante se considera qué porción de la planta servirá como fuente de tejido, así mismo la edad, estado fisiológico, tamaño, calidad de la planta y temporada en la que es obtenida (46, 47, 56). Este deberá estar libre de microorganismos para que no afecten su desarrollo, lográndose ya sea renovando los tejidos externos de la planta de la que se va a obtener (19, 55) o bien desinfectando el material vegetativo usando agentes químicos como el hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, blanqueadores comerciales, etc. en concentraciones tales que no dañen el tejido (19, 21, 55, 62). Los agentes químicos deben ser renovados fácilmente con agua destilada ya que la retención de éstos en el explante afectaría su desarrollo (19, 62), por ello no es recomendable usar cloruro de mercurio a pesar de ser un desinfectante seguro (19, 62). De igual forma no es recomendable agregar al medio nutritivo antibióticos porque pueden ser metabolizados alterando el crecimiento y desarrollo del tejido (55).

Los diferentes componentes del medio nutritivo interactúan para promover el crecimiento del explante (56). Se han reportado diferentes medios los cuales varían en composición y concentración pero en general los medios nutritivos que se usan en la micropropagación contienen sales inorgánicas, macro y micronutrientes y constituyentes orgánicos como carbohidratos, aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y reguladores de crecimiento (19, 46, 47, 62). En casos particulares se añade al medio carbón activado, agente gelificante (agar) si se trata de un medio sólido y complejos naturales (hidrolizado de caseína, extracto de levadura, leche de coco, etc.). No es recomendable utilizar complejos natura-

les a menos que no se obtenga éxito en el desarrollo del ex-  
plante con sales inorgánicas y constituyentes orgánicos (21,  
31, 46, 47, 55) ya que son de composición variable, por ejem-  
plo dependiendo de la edad del coco.

Cada uno de los elementos que constituyen los macro y  
microelementos tienen una función específica ya sea: para  
formar parte de alguna molécula o constituyente celular, co-  
mo coenzimas, contribuir al potencial osmótico de células y  
tener un papel metabólico específico (19, 50, 51) siendo el  
C, H, O, N los elementos más abundantes de las células (39).

Como fuente de carbono y energía se suministra el medio  
principalmente sacarosa (19, 21, 31, 46). Se ha reportado  
que también actúa en la diferenciación (26, 46, 59).

Los aminoácidos tienen como papel principal, el de ac-  
tuar como sillares para la biosíntesis de proteínas (39) aun-  
que deben tenerse ciertas precauciones como la de usar L-am-  
inoácidos (20, 46) y de que no dañen al explante ya que se ha  
observado antagonismo entre ellos por lo que es necesario  
evaluar cada uno de los aminoácidos cuando se observan efec-  
tos nocivos (21, 31, 46). La adición de un aminoácido dado  
puede inducir una respuesta fisiológica inadecuada (21, 31).

Las vitaminas son necesarias en pequeñas cantidades y  
actúan como coenzimas específicas o grupos prostéticos en  
enzimas importantes que participan en el metabolismo y otras  
actividades especializadas, de aquí su importancia (21, 39,  
51). Dentro de las vitaminas que comúnmente se usan están  
la tiamina, inositol, ácido nicotínico y piridoxina (21, 46).

De igual forma los reguladores de crecimiento se utili-  
zan en pequeñas cantidades y son los principales factores  
que controlan la división, diferenciación y dediferencia-

ción celular (19, 22, 26, 46, 51, 56, 59). Los reguladores de crecimiento se encuentran en el explante (21, 22, 26, 56) pero la mayoría de ellos no responden si no son añadidos exógenamente al medio de cultivo (22, 26, 55, 56) siendo las citoquinas y auxinas las más comúnmente usadas en la micropropagación (21, 31, 46, 58) observándose diferentes respuestas en el tejido a medida que se aumentan o disminuyen los niveles hormonales (19, 31, 46, 56). Por ello la inducción y crecimiento dependen del balance de reguladores de crecimiento presentes en el explante y en el medio de cultivo (22, 47, 56, 58).

Sea muchos los componentes que forman el medio para obtener éxito en la técnica, por lo que se debe seleccionar el medio de cultivo que sea adecuado y para ello se experimenta con medios en los que se obtuvo éxito con especies afines o bien modificándolos o por último realizando diferentes pruebas y observando qué componente es el que está favoreciendo una respuesta (19, 21).

Por otra parte, es necesario realizar trasplantes de 4 a 6 semanas a medio fresco y así tener un crecimiento continuo del explante evitando la acumulación de metabolitos del tejido, agotamiento de nutrientes, etc. que puedan afectar su desarrollo (21, 58, 62). Debe transplantarse tejido sano ya que si éste presenta zonas oscuras es señal de necrosis (21) y disminuye el crecimiento (62).

También es recomendable preparar soluciones concentradas de sales inorgánicas, vitaminas y factores de crecimiento con el fin de facilitar su elaboración (19, 21, 31, 55, 58) utilizando reactivos puros (31, 55).

El medio de cultivo se esteriliza empleando un autocla-

ve a una presión de 15 libras/ pulgada<sup>2</sup> a una temperatura de 121° C, durante 15 a 20 minutos según las recomendaciones sugeridas evitando exposiciones prolongadas. Dado que algunos componentes son termolábiles, en este caso se esterilizan con membranas de filtración como los filtros Millipore (19, 21, 31, 47, 55, 58) o disolviéndolos en alcohol al 70% o clo<sub>2</sub>roformo y posteriormente se añaden al medio estéril en condiciones asépticas (14, 21, 31, 55).

Antes de esterilizar el medio se debe ajustar el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N estando generalmente entre los valores de 5 a 6 (19, 46, 47).

Aparentemente al haber seleccionado el explante y el medio de cultivo se tendría la seguridad de obtener éxito en la propagación sin embargo, se ha observado que la intensidad, longitud de onda y calidad de la luz así como el fotoperíodo y la temperatura son necesarios para regular ciertos procesos morfogénéticos (46, 55, 56). La temperatura que generalmente se usa es de 25° C, aproximadamente (46, 47, 55).

Es claro que el control de la expresión morfogénética es un proceso complejo en el que involucra la interacción del explante, medio de cultivo y condiciones de incubación y para realizar un análisis del crecimiento existen parámetros de medición, entre los cuales está la longitud, peso fresco, peso seco, número de células, volumen total ocupado por las células en una alícuota, índice mitótico, etc. (19, 21, 55, 58).

## 2. Cultivo de células en cultivos

A pesar de que la micropropagación ha sido empleada en diferentes especies, las cactáceas han recibido poca atención (44, 47).

Nitsch en 1951 intenta promover Gaussia en un medio con jugo de tomate; aunque no obtuvo respuesta alguna (54). Hasta 1957, King, fué el primero en obtener la formación de callo empleando como explantes órganos vegetativos y reproductivos de diferentes cactus (44, 54) en el medio de White con 2,4-D (44) logrando subcultivarlos con poco éxito (54).

Steinhart (1958) con el fin de estudiar la biosíntesis de alcaloides "in vitro" logra obtener 3 diferentes tipos de callos, 2 compactos con diferente color y velocidad de crecimiento y uno desmenuzable de rápido crecimiento, en el medio de Hildebrandt suplementado con glucosa, leche de coco y 2,4-D.

Rincoha y Mehra (1964) mantuvieron una continua proliferación de callo de Neomammillaria prolifera y realizaron una serie de experimentos para diferenciarlo variando las concentraciones de sales del medio Murashige - Skoog (1962), diferentes fuentes de carbono, sacarosa, glucosa, fructuosa y glicerol, complejos naturales, leche de coco y jugo de sandía, y utilizando diferentes reguladores de crecimiento ya sea solos o en combinación, 2,4-D, AIA, AIB, ANA, In y GA<sub>3</sub>, observando distintas respuestas en cuanto a cambios de color, crecimiento, consistencia, etc. del callo pero no lograron su diferenciación excepto la iniciación de raíces en cultivos esporádicos. La diferenciación de callo fue realizada hasta 1976 por Kolar, Bartek y Vychoř (42) obteniendo brotes



de Mammillaria woodsi enraizándolos en vermiculita, sin embargo se han desarrollado otras metodologías. Por ejemplo Neuseth (1979) reporta la propagación de once especies de cactáceas a partir de aréolas en el medio de Iin - Staba modificado por Neuseth - Valmorin (1975) en concentraciones óptimas de 1.0 y 10 mg/ l de BAP, excentuando Natiara salicornioides que no necesitó de este regulador, y para lograr el enraizamiento empleó un segundo medio suplementado con 10 mg/ l de ANA. Dentro de estas once especies están Mammillaria elonata y Opuntia polyacantha las cuales también fueron propagadas con otras metodologías, por Johnson y Emino (35, 36) quienes a su vez han propagado otros cactus (37); en todos sus trabajos usaron las sales inorgánicas de Murashige - Skoog (1962) con varios reguladores de crecimiento, tanto auxinas, citoquininas y ácido giberélico en diferentes concentraciones.

Los trabajos de Johnson y Emino (1979) y Lazarte y col. (1982), quien logró la propagación de Echinylum criscardium tuvieron como objetivo utilizar el cultivo de tejidos como una alternativa de propagación comercial para cactáceas.

Otros trabajos han tenido como objetivo el de estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de morfogénesis (41), estudiar la fotosíntesis en cultivo de suspensión como por ejemplo el realizado por Seeni y Gnanam (1980) en Chamaecereus sylvestrii (53), como una alternativa para preservar cactáceas en peligro de extinción (42), esto se ha trabajado poco a pesar de que el cultivo de tejidos presenta la ventaja de preservar germoplasma (61).

Los cactus que han sido propagados con esta finalidad son, entre otros Echinocactus grandis, E. grisonii (18) y

distintas especies de Sedum album (61).

Diaz (1985) trabajó con Astragalus nycotiflora, acerca de la proliferación de callo y la obtención de plántulas con ríletes, utilizando como fuente de explantes trozos de plántulas y semillas, las cuales proliferaron formando tejido calloso en el medio de Greenwald, Meessels y Koleson (1977) modificado por Diaz (1985) con Kn y 2,4-D a una concentración de 5 mg/l de 5 mg/l respectivamente (20). Más tarde se diferenciaron en brotes en el medio A para la proliferación de brotes de Murashige (1976) (31) con 30 mg/l de 2iP y 0.5 mg/l de AIA. El arraizamiento de estos brotes se llevó a cabo en el medio mínimo orgánico de Murashige (1976) (31), adaptándose las plántulas a condiciones de invernadero.

El objetivo del presente trabajo es optimizar el método logía antes citado tanto para el desarrollo de callo como la inducción de brotes aplicando un diseño de tratamientos factorial 7 X 5 de Kn y 2,4-D en un intervalo de 0 a 7 mg/l y 0 a 1.5 mg/l respectivamente con cuatro repeticiones y así seleccionar los niveles hormonales que promuevan el desarrollo del callo de buena calidad (verde y desmenuzable) para el abastecimiento del material vegetativo necesario en la diferenciación. Y otro diseño de tratamientos factorial 3 X 4 de 2iP e AIA en un intervalo de 0 a 30 mg/l y 0 a 0.5 mg/l respectivamente y de aquí elegir los niveles hormonales que favorezcan la formación del mayor número de brotes en el menor tiempo posible.

M E T O D O L O G I A

El material vegetativo empleado para la obtención de los explantes, fueron explantes provenientes de semillas, previamente germinadas bajo condiciones asépticas, de Astrophytum myrtilloides var. potosina de la compañía Gloecker de Nueva York.

La germinación de las semillas se logró escarificando, esterilizando y sembrando de acuerdo al método de Díaz (1985) el cual consistió en remojar las semillas en ácido sulfúrico concentrado agitando suavemente durante cinco segundos, teniendo cuidado en el procedimiento, pues no debe agitarse con vigor para no dañar la semilla ya que el ácido es muy corrosivo (29).

Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada, remojándose posteriormente en ácido giberélico ( $GA_3$ ) al 0.01% durante 24 horas para estimular la germinación y evitar problemas de latencia.

La esterilización superficial o desinfección consistió en remojar las semillas durante 30 minutos en una dilución filtrada de hipoclorito de calcio ( $Ca(OCl)_2$ ) al 7% ( F/V ) más tres gotas de Tween 20.

Una vez realizado esto, en la campana de flujo laminar se efectuó la siembra. Enjuagando primero las semillas con agua destilada estéril tres veces para eliminar el hipoclorito de calcio; a continuación se les quitó la testa con aguja de disección. Este procedimiento tuvo que realizarse rápidamente para evitar la deshidratación de la testa, ya que esto ocasionaba una mayor dificultad en su eliminación, y para no dañar las semillas.

Las semillas se colocaron en frascos de cultivo con 20 ml del medio de germinación de De Fossard (1979) (19)

(Cuadro 1). Como el estado físico del medio fue líquido las semillas se colocaron sobre puentes de papel filtro a manera que mantuvieran la mayor superficie de contacto entre éstas.

Hecha la siembra en condiciones asépticas y dado que las semillas de las cactáceas requieren luz para su germinación se incubaron con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad bajo una intensidad luminosa de 1500 lux a una temperatura de  $24 \pm 1^{\circ} \text{C}$ .

Los medios se agitaron manualmente cada tercer día para tener una mayor distribución de los materiales y una mayor oxigenación del medio.

La obtención de los explantes fue a la cuarta semana de germinación realizando cortes transversales, en forma de disco de 2.0 y 2.5 mm de diámetro y espesor respectivamente eliminando los extremos de las plántulas ( fig. 4 ) ya que observaciones anteriores indican que estas partes no responden al tratamiento o tienden a degenerar (20). Cabe mencionar que los cortes tenían que realizarse a la cuarta semana de cultivo dado que la consistencia del tejido de la plántula era más firme y con ello se evitó dañar los tejidos.

#### a. Proliferación de Callo

Con la finalidad de determinar el mejor tratamiento para la proliferación de callo los explantes se sembraron en el medio de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) (27) modificado por Díaz (1985) (Cuadro 2) con diferentes niveles de 2,4-D y Kn (Cuadro 3).

El medio de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) se ha

empleado con éxito en la propagación "in vitro" de especies suculentas de Arave, Aloe y Barborthia (27) y este compuesto por sales inorgánicas de Murashige - Skoog (1962) (45) y constituyentes orgánicos como agarosa, inositol, tiamina, hidrolizado de caseína, ácido p-aminobenzoico y tirosina.

Las modificaciones de este medio fueron que la concentración del hidrolizado de caseína fue de 500 mg/l en lugar de 3 mg/l, manteniendo los demás constituyentes orgánicos en las mismas concentraciones, además incluye otros constituyentes como el ácido nicotínico, piridoxina, sulfato de adenina y riboflavina solidificando el medio con 3 mg/l de agar-agar.

Los diferentes niveles de los reguladores de crecimiento se añadieron al medio de acuerdo a un diseño de tratamientos factorial ( 5 X 7 ) con cuatro repeticiones en base al trabajo de Díaz (1985) quien logró la proliferación de tejido calloso con una concentración de 5 mg/l de Zn y 1 mg/l de 2,4-D (Cuadro 3).

Todos los medios nutritivos utilizados fueron esterilizados en autoclave a una presión de 15 libras/pulgadas<sup>2</sup> y a una temperatura de 120° C durante 15 minutos, previamente ajustados a un pH 5.7 con HCl 0.1 N ó KOH 0.1 N.

Todos los tratamientos se colocaron en la cámara de incubación en las mismas condiciones que para la fase de germinación de semillas realizando transferencias cada 4 semanas a medio fresco para evitar con ello el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de desechos metabólicos que pudiesen afectar la constante proliferación de callo.

Quincenalmente los treinta y cinco tratamientos fueron revisados evaluando en cada uno de ellos:

- 1.- Tipo de desarrollo ( presencia o ausencia de callo ).

- 2.- Consistencia del callo ( desmenuzable o compacto ).
- 3.- Tamaño del callo ( mm. ).
- 4.- Color del callo ( según catálogo Fantone (3) ).

#### b. Inducción de Brotes

Para esta fase se germinaron estrictamente 30 semillas como se describió anteriormente colocando los explantes obtenidos en el mejor tratamiento para inducción y desarrollo de callo ( 0.5 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de Kn ).

Los callos así obtenidos se fragmentaron en porciones de aproximadamente 2.0 cm. de diámetro y 1.0 cm de altura, sembrando cada uno en el medio A para la proliferación de brotes de Murashige (1976) (31) (Cuadro 4) añadiendo 2iP y AIA los cuales se aplicaron en un intervalo de 0 a 30 mg/l y 0 a 0.5 mg/l respectivamente en un diseño de tratamientos factorial ( 4 x 3 ) con 5 repeticiones (Cuadro 5).

Las condiciones de incubación fueron las mismas que para la proliferación de callo. Los callos se transfirieron a un medio fresco cada cuatro semanas evaluando quincenalmente las siguientes variables:

- 1.- Tipo de desarrollo ( presencia o no de brotes ).
- 2.- Número de brotes.
- 3.- Tamaño de brotes ( mm ).
- 4.- Color de los brotes ( según Fantone (3) ).

Dado que estos callos siguieron el comportamiento descrito por Díaz (1985) es decir muy compactos y blancos se decidió emplear el medio basal de la fase de proliferación de callo dado que en éste no fueron observadas tales respuestas.

R E S U L T A D O S Y A N A L I S I S



### a. Proliferación de Callo

De cada plántula desarrollada a las 4 semanas de cultivo, se obtuvieron 3 explantes formándose de cada uno, tejido calloso el cual se derivó de tejido compuesto de células del parénquima que están en división activa o bien de células del cambium que son quiescentes (56, 53, 68), presentes en los explantes.

El callo empezó a observarse en promedio a las 2 semanas de cultivo (Tabla 1) en este lapso el parecer tuvo lugar una fase de dediferenciación fisiológica y estructural de las células del explante (1, 26, 49) seguido de un aumento en las divisiones celulares y la formación de una masa in diferenciada o tejido calloso (49, 56).

Como puede observarse en la figura 6 fué indispensable la presencia de las 2 hormonas ya que el tratamiento testigo no mostró ningún tipo de respuesta y tratamientos con solo una de las 2 hormonas en diferentes niveles mostraron una respuesta incipiente o nula del tejido. Esto nos indica que el explante requiere al menos de la presencia de 2,4-D y Kn para la inducción de procesos bioquímicos que conduzcan a la división celular y por consiguiente a la formación de callo.

Ambos reguladores de crecimiento han sido utilizados para iniciar y mantener cultivos de callo en diferentes especies de cactáceas (37, 44) ya que como se conocido que las auxinas provocan el alargamiento de las células aumentando la plasticidad celular (34) mientras que el efecto principal de las citocininas en el cultivo de tejidos es inducir la división celular (22, 57), estos efectos no son los únicos pues las citocininas promueven en menor grado el alargamien-

to celular y las auxinas influyen en la división celular (50) estimulando la formación de callo.

No se observó ningún tipo de diferenciación celular debido posiblemente a que el 2,4-D estimula la formación de callo e inhibe el proceso de morfogénesis (46, 55).

Los diferentes tratamientos presentaron dos tipos de consistencia en el callo: desmenuzable y compacta ( fig. 5 ) la primera comprendió del tratamiento 7 al 20 y la segunda en los restantes. Estos resultados contradicen a la generalización hecha por Gresshoff (1978), quien menciona que en general altos niveles de auxinas y bajos de citocininas dan lugar a un callo desmenuzable y viceversa. Pero tal vez la discordancia de resultados este relacionada con el tipo de planta usada pues las especies de la familia Cactaceae presenta características morfológicas y fisiológicas particulares que las hacen ser muy distintas a las demás familias, además de las condiciones en las que se sometieron los explantes en los 35 tratamientos.

La consistencia compacta de los callos empezó a verse a las 5 semanas de cultivo pues originalmente todos presentaron una consistencia desmenuzable.

La compactación del tejido pudo deberse tal vez a que la cinetina influye en la compactación del tejido dado que interviene en la síntesis del material de la pared celular (26, 57). Aunado a ello se sabe que las auxinas aumentan la actividad enzimática que interviene en el metabolismo de sustancias pécticas (34).

El callo desmenuzable ofrece una provisión constante de material vegetativo necesario en la diferenciación ya que este tipo de tejido al fragmentarse crece nuevamente (26, 62).

en cambio el callo de consistencia compacta, al presentar mayor cantidad de sustancias pécticas que ocasionan que las células estén adheridas más firmemente, resisten la fragmentación (1) muriendo por tanto muchas células que estén en la periferia del corte. También habrá más probabilidad de diferenciar al callo de consistencia desmenuzable ya que presenta mayor número de centros meristemáticos que el compacto (1) y además el callo desmenuzable muestra menor variación zonal que el callo compacto (26) y con ello puede tenerse una mayor probabilidad de diferenciación.

La coloración observada en los callos en general fue verde mostrando diferentes tonalidades del mismo, desde verde intenso hasta verde amarillento.

Esta coloración indicó que la actividad fotosintética se realizó normalmente debido a que al explante se le proporcionaron los elementos necesarios ( Hierro, sacarosa, 2,4-D y  $\text{K}_2\text{O}$  ) para la síntesis de clorofila (1) además de la luz ( 1500 lux ) y temperatura (  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  ).

Las diferentes tonalidades de verde observadas fueron debidos posiblemente a que el 2,4-D y  $\text{K}_2\text{O}$  afectan la síntesis de clorofila (1) ( la cinetina evita la destrucción de la clorofila ) o tal vez a los subcultivos realizados pues los subcultivos continuos afectan la coloración del callo (26). Cabe mencionar que en los callos de consistencia compacta se formó una capa blanca que los cubrió en gran parte, mientras que el callo de consistencia desmenuzable presentó zonas o puntos blanquecinos pero fue en general verde.

El color verde en el tejido calloso apareció a las tres semanas de cultivo ya que inicialmente los explantes verdes adquirieron una coloración rojiza debido al parecer a la pre

sencia de la tiroxina, hidrolizado de caseína y sacarosa (54) por lo que se eliminó la tiroxina del medio disminuyendo con ello en gran parte esta coloración pues cuando este aminoácido estuvo presente llegaron a necrosarse los explantes. La coloración siguió manifestándose aún cuando el medio contenía 10 mg/l de ácido ascórbico.

La coloración rojiza se presentó nuevamente en la base del callo cada vez que se subcultivaban en medio fresco. Este fenómeno posiblemente fué debido a que se dañó el tejido al transplantarlo ya que se eliminaban las partes necróticas acompañadas de tejido sano, o tal vez porque no se transplantaron rápidamente provocándose la deshidratación del tejido. Sin embargo tal coloración no afectó el crecimiento del callo pues pasando esta fase cambiaron a un color verde amarillento y a medida que pasó el tiempo se tornaron a un color verde oscuro indicándonos un incremento en la actividad fotosintética al aumentar el tiempo de cultivo o edad del callo.

En cuanto al tamaño del callo originalmente y dado que el desarrollo del callo mismo siguió un patrón de crecimiento circular se midió el diámetro de su base, observándose con ello un incremento, en general, al doble en tiempos de 15 días (Tabla 2). Sin embargo ésta manera de medir el crecimiento no fue confiable pues los callos adquirieron formas irregulares.

Otra forma de evaluar el crecimiento del callo es a través del registro del peso fresco pero no se aplicó, pues presenta una serie de inconvenientes que hacen que dicha medición tampoco sea confiable como son la acumulación de grandes cantidades de carbohidratos dentro de las células (21, 62), cambios en el rango de crecimiento como resultado de la

manipulación del tejido y para cesar el callo debe sacarse del medio y cesarlo en condiciones asepticas con lo cual habria mayor posibilidad de continuación (21).

Sin embargo como puede observarse en la Fig. 6 a medida que aumenta la concentración de ambas hormonas, los callos tienden a ser más grandes en la base, cubriendo gran parte de la superficie del medio de cultivo, encontrándose en los tratamientos 18, 19 y 20 los que mostraron callos más grandes ( Tabla 2 ).

El tamaño del callo es importante ya que al ser mayor el volumen de tejido calloso aumenta la probabilidad de que haya más zonas meristemáticas donde se forman los órganos, los cuales representan un pequeño porcentaje del cultivo total (22) por lo tanto entre mayor sea este porcentaje de zonas meristemáticas habrá más posibilidad de diferenciación en el tejido calloso.

Después de 10 semanas de observación y dado lo anterior se consideró que las mejores respuestas estuvieron en los tratamientos 18, 19 y 20 ya que fueron los callos más desmenuzables y los más grandes habiendo mayor posibilidad de diferenciación y con ello tener más éxito en la siguiente fase de inducción de brotes.

De los tres tratamientos el mejor fue el 19 ( 5 mg/l de Kn y 0.5 mg/l de 2,4-D ) debido a que presentó una coloración verde intensa al igual que el tratamiento 20 no siendo así el tratamiento 18.

En general la coloración verde intensa, junto con la consistencia desmenuzable y de buen tamaño nos indica que el callo es más favorable a la inducción de brotes.

No se eligió el tratamiento 20 dado que presentó una ma

por concentración de Zn ( 7 mg/l ) que el tratamiento 19, lo cual desde el punto de vista económico implicaría un gasto mayor para resultados semejantes pudiéndose obtener a una concentración menor.

#### b. Inducción de Brotes

En esta fase los callos obtenidos en el tratamiento 19 de la fase de proliferación de callo y sometidos a los 12 tratamientos de 2iP y AIA en el medio "A" para la multiplicación de brotes de Murashige (31) respondieron de la siguiente manera:

Ningún tratamiento presentó desarrollo de brotes a excepción del 8 donde se desarrollaron 16 brotes en un frasco y 10 con 13 brotes en otro frasco. En el resto se formó tejido calloso de consistencia compacta y una capa blanca de células cubrió todos los callos.

En los callos cultivados en los mismos tratamiento y empleando el medio basal de la fase de proliferación de callo (Gronwald, Wessela y Koleman modificado por Díaz ) se observó diferenciación de brotes en los tratamientos 7, 8, 10, 11 y 12 a la décima semana de cultivo a excepción del tratamiento 7 que fué a la sexta semana pero en un solo frasco ( fig. 7 ).

En este lapso, de 10 semanas, al parecer las divisiones celulares continuaron, posteriormente se volvieron organizadas, tal vez por la influencia del 2iP pues las citocininas intervienen en la orientación de las divisiones celulares

(57) dando como resultado la formación de estructuras diferenciadas o centros meristemáticos, conocidos como meristemoides; originándose de aquí los brotes (21, 26, 47, 59). Cabe destacar que se desconoce como los factores regulan el origen de estas zonas meristemáticas (21).

Los brotes se originaron comunmente en la parte media inferior del callo a excepción del tratamiento 7 en donde los brotes fueron centrales.

La inducción de brotes se debió, posiblemente, a las altas concentraciones de citocininas y bajas de auxinas (26, 46, 47). El 2iP es la citocinina más activa y el AIA es la auxina más usada (46). Estos dos reguladores de crecimiento han sido utilizados para la propagación de otras especies de cactáceas como por ejemplo Mammillaria elongata y Opuntia polyacantha (35, 36).

Como puede observarse en la Tabla 3 el mayor número de brotes estuvo en los tratamientos 11 y 12.

El número de brotes en cada repetición de los tratamientos fue variable debido tal vez a una serie de factores que afectan el proceso de organogénesis como son; los subcultivos continuos realizados (46, 47), la variabilidad celular existente entre los callos (46), el tiempo de cultivo (47), tamaño original de los callos (inóculo) (48), a la competencia morfogénica (46, 58), al manipuleo realizado en cada subcultivo (21) pues se sabe que cada uno de estos factores afecta la respuesta.

También es recomendable trasladar el callo que se desarrolló en presencia de 2,4-D a un medio sin hormonas y después al medio de inducción de brotes ya que este regulador de crecimiento se acumula en el interior del callo impidiendo

de el proceso de organogénesis (48) podemos notar que no sólo basta con fragmentar el callo en piezas similares para emplearse en la inducción de brotes, sino que habría que asegurarse que estos fragmentos tengan el mismo potencial de crecimiento (1) y para ello habría que ver qué partes del callo son las más adecuadas.

Pudo verse que no solamente son necesarios ambos reguladores de crecimiento para la inducción de brotes sino que éstos interactúan con los componentes del medio nutritivo ya que en el cuadro anterior de tratamientos el medio de cultivo no incluye algunas vitaminas y componentes. Se menciona que el hidrolizado de caseína aumenta la inducción de brotes en presencia de cinetina e AIA (25).

Así mismo son necesarios ambos reguladores de crecimiento para dicha inducción pues el tratamiento testigo y tratamientos con una de las dos hormonas solamente en diferentes niveles de la otra no presentaron formación de brotes.

En lo que respecta al tamaño de los brotes no pudo medirse con exactitud dado que fue difícil determinar la base de los mismos ya que éstos se desarrollaron muy juntos, pero los más grandes en general alcanzaron a medir 4 mm de altura y 2 mm de diámetro. La coloración fue similar a la observada en los callos aunque algunos fueron de color verde más claro.

Como ya se mencionó los tratamientos 11 y 12 presentaron mayor número de brotes. De estos dos el mejor fue el 12 obteniéndose un total de 46 a diferencia del tratamiento 11 que fueron 31 y además se obtuvieron en menor tiempo, 3 semanas, que fue el objetivo trazado en el presente trabajo aunque habría que repetir estos dos tratamientos con un mayor



número de repeticiones pues en ambos no fue homogénea la respuesta, es decir se presentó en tres repeticiones y un número variable de brotes entre los mismos.

A pesar de que se desarrollaron más brotes en el tratamiento 12 presenta un inconveniente que el 2iP es de las citoquininas más caras (46) y este tratamiento tiene la concentración más alta no siendo así el tratamiento 11 que es menor por lo que se inclinaria en escoger a este último y además la diferencia en el tiempo de obtención no es muy grande entre ambos tratamientos.

Cabe mencionar que en los 12 tratamientos la consistencia del callo fué desmenuzable formandose una capa blanquecina en algunos callos pero en general fueron verdes haciéndose más intensa la coloración a la sexta semana, a diferencia del cuadro anterior en que fue a la décima. También puede observarse que en este cuadro de tratamientos que a medida que aumentó la concentración de 2iP fueron más grandes los callos alcanzando a cubrir la superficie del medio de cultivo en la mayor parte de éstos a la décima semana no siendo así en el cuadro anterior ya que en este lapso alcanzaron a medir el doble del tamaño original del explante (Tabla 4). En ambos cuadros hubo un ligero crecimiento del callo en el tratamiento testigo, es decir, independientemente del medio basal en donde estén los explantes se requiere de ambas hormonas para mantener el crecimiento del callo.

Tal parece ser que la consistencia, coloración y crecimiento del callo dependen de la interacción de los componentes del medio y de los reguladores de crecimiento.

La coloración rojiza estuvo presente cada vez que se subcultivó el callo, pero en menor grado que en la fase de

proliferación de callo presentandose en la orilla de la base del callo y no en toda la base.

CONCLUSIONS

Tanto en la fase de proliferación de callo como en la de inducción de brotes fue indispensable la presencia de auxinas y citocininas requiriéndose de una mayor concentración de citocininas.

El tratamiento con 0.5 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de Kn fue el mejor en la fase de proliferación de callo mientras que 0.5 mg/l de AIA y 30 mg/l de 2iP fue donde se obtuvo mayor número de brotes en el menor tiempo. En ambos tratamientos se empleó el medio basal de Groenewald y col. (1977) modificado por Díaz (1985).

Al comparar los cuadros de tratamientos factoriales, utilizando diferentes medios basales, en la fase de inducción de brotes, se observó que el medio basal de Groenewald y col. (1977) modificado por Díaz (1985) fue mejor, por lo que puede concluirse que el desarrollo y diferenciación de callo no solo dependen de los reguladores de crecimiento sino que estos interactúan con los componentes del medio nutritivo.

Se obtuvieron 46 brotes en cuatro repeticiones del tratamiento antes mencionado en un lapso de seis meses y medio por lo que puede concluirse que la técnica de cultivo de tejidos, bajo la metodología desarrollada, es de gran utilidad en la propagación de Astrophytum myriostigma var. potosina.

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo puede concluirse que se realizaron en su tota-

edad, sin embargo habría que repetir el tratamiento seleccionado de la fase de inducción de brotes con un mayor número de repeticiones ya que como se vió tal indución se presentó en tres repeticiones y un número variable de brotes entre ellos.

Los resultados obtenidos indican que la técnica de cultivo de tejidos es una buena alternativa para poder conservar las especies de cactáceas mexicanas que se encuentran en peligro de extinción, además ofrece una alternativa económica pues es un método rápido y factible, requisitos necesarios para poder satisfacer la demanda como planta de ornato y con ello evitar el saqueo indiscriminado.

RECOMENDACIONES

Dado que en el presente trabajo se aplicó la técnica de cultivo de tejidos como una alternativa para la preservación de la especie Astronotus myriostigma var. potosina se recomienda lo siguiente:

No mantener el tejido calloso en continuo crecimiento por largos períodos de cultivo para evitar que se presenten aberraciones cromosómicas, mutaciones genéticas y endomitosis celular (10, 21, 26, 47).

Realizar análisis cromosómico de los brotes obtenidos ya que en general se ha visto que las plantas obtenidas vía callo muestran inestabilidad genética (10, 21, 26). Además al parecer el 2,4-D en un rango de 0.2 - 2 mg/l no causa inestabilidad genética (46) sin embargo habría que realizar dichos análisis para asegurarse que este regulador de crecimiento bajo la concentración empleada no causó tal inestabilidad.

Después de varios subcultivos los callos pueden continuar creciendo al pasarlos a un medio basal sin contener reguladores de crecimiento (26, 45, 53) por lo que sería conveniente realizar este experimento pues desde el punto de vista económico habría un ahorro en el costo de las hormonas empleadas en este trabajo, principalmente del 2iP que es la citocinina más cara, y que en su mayoría se importa.

Sería conveniente realizar trabajos tendientes a la posible preservación de las demás especies mexicanas

que estan en peligro de extinción bajo esta metodología. También sería conveniente la realización de una propagación masiva bajo esta metodología desarrollada para satisfacer, en lo posible, la creciente demanda como plantas ornamentales.



APPENDICES

Abreviaturas de los reguladores de crecimiento que aparecen en el texto.

**Auxinas:**

- IAA      Acido Indolacético
- IAB      Acido Indolbutírico
- ANA      Acido Naftolenoacético
- 2,4-D    Acido 2,4-D Diclороfenoxiacético

**Citocininas:**

- BAF      N<sub>6</sub>-Benzilamino purina
- Kn      Cinetina
- 2iP      N<sub>6</sub>-Isopenteniladenina

**Giberelina:**

- GA<sub>3</sub>      Acido Giberélico

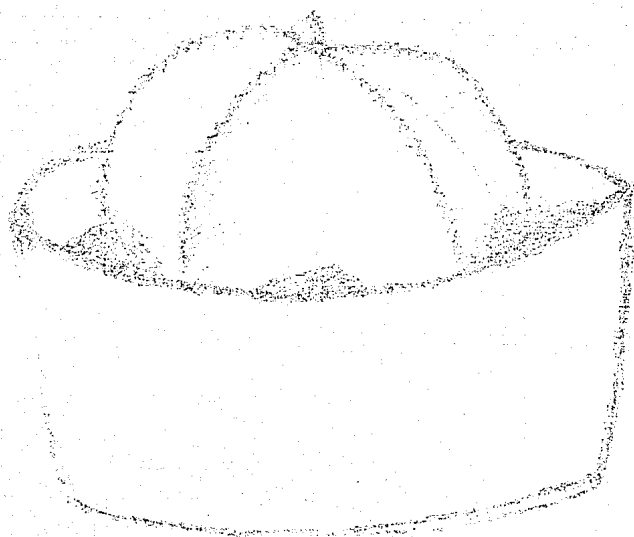
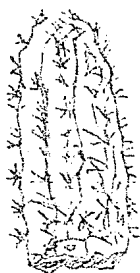


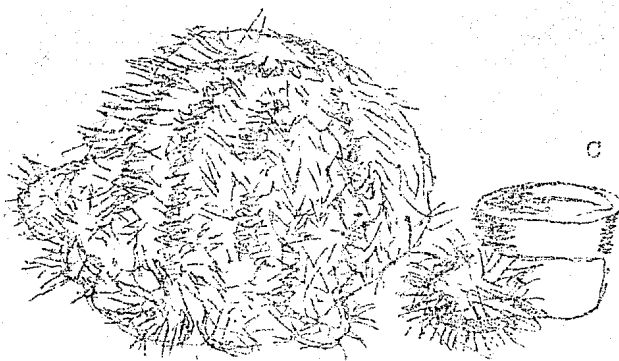
Figura 1 Planta típica de A. variostigma.



A



B



C

Figura 2 Técnicas de propagación por esqueje:  
 A.- Cortando partes de tallo  
 B.- Enraizando algún segmento de la planta  
 C.- Separando un hijuelo de la planta madre  
 (4, 28).



A



B



C

Figura 3 Técnicas de preparación por injerto (4):  
 A.- De ceras planas  
 B.- En cuña  
 C.- En cuña invertida

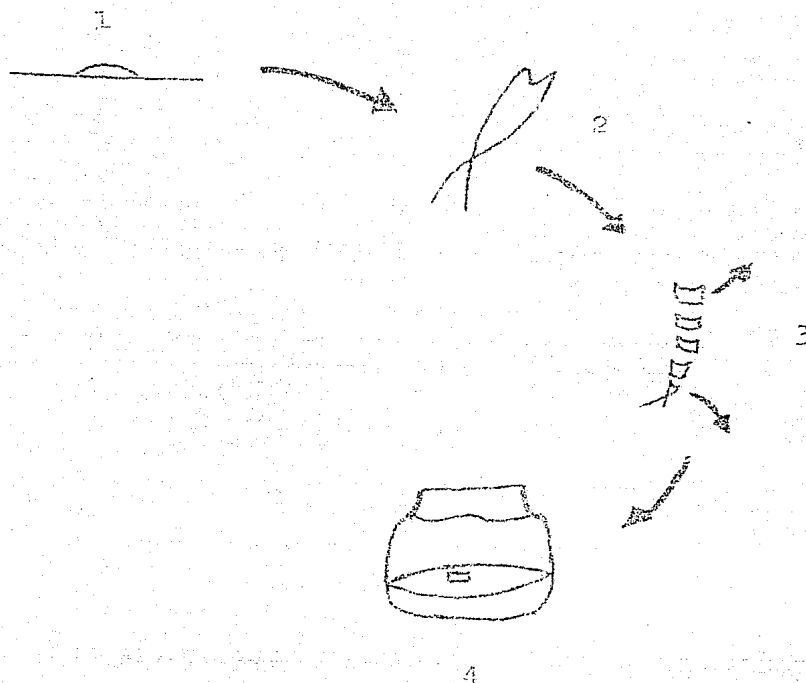
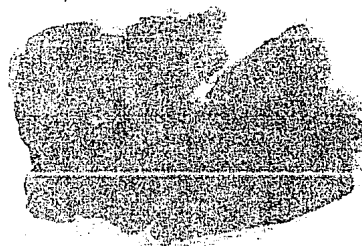


Figura 4 Establecimiento del cultivo aséptico

- 1.- Semilla en el medio para germinación de De Fossard (1979).
- 2.- Plántula.
- 3.- Cortes transversales eliminando los extremos (de. semena).
- 4.- Explante en el medio de Greenewald, Wessels y Kolesen (1977) modificado por Díaz (1985).




---

CALLO COMPACTO

---

CALLO DESMENUZABLE

Figura 5 Tipos de consistencia observados en los callos.

$K_n$	0	1.0	3.0	5.0	7.0
24-D					
0					
0.1					
0.3					
0.5					
0.7					
1.0					
1.5					

Figura 6. Tipos de callos observados en cada tratamiento a las 10 semanas de cultivo.



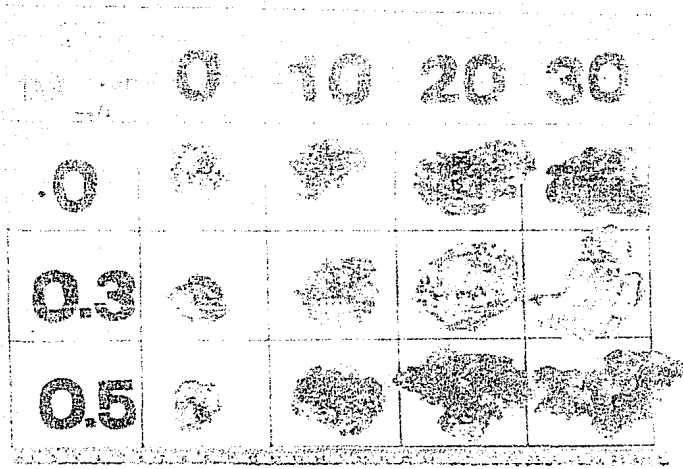


Figure 7. Tipos de diferenciación observados en cada tratamiento a las 12 semanas de cultivo, en el medio de Groenewald, Bessels y Kollman (1977) modificado por Díaz (1985).

SALES INORGANICAS ( mg/l )

Macronutrientes

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ...	472.3
$\text{KNO}_3$ .....	101.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	123.25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	122.4

Micronutrientes

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	2,535
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	4,305
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	0.4974
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ..	0.0242
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	13.9
$\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	18.0

CONSTITUYENTES ORGANICO ( mg/l )

Fuente de Carbono

Sacarosa .....	2055.86
----------------	---------

SOPORTE INERIE

Paapel Filtro

Cuadro 1 Composición del medio nutritivo de germinación de semillas de De Poggard ( 1979 )

## MACRONUTRIENTES ( mg/l )

## Macronutrientes

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	1650
$\text{KNO}_3$ .....	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	170

## Micronutrientes

$\text{H}_3\text{BO}$ .....	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	22.3
KI .....	0.83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ..	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
Na . EDTA .....	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	27.8

## CONSTITUYENTES ORGANICOS

## Vitaminas

Riboflavina .....	0.1
Ac. Nicotínico ...	0.5
Piridoxina - HCl .	0.1
Tiamina - HCl .....	0.4
Inositol .....	100
Ac. p-aminobencóico	0.1

## Aminoácido ( mg/l )

Tirosina .....	100
----------------	-----

## Base Nitrogenada ( mg/l )

Sulfato de Adenina .	80
----------------------	----

## Fuente de Carbono ( gr/l )

Sacarosa .....	30
----------------	----

## COMPLEJO NATURAL ( mg/l )

Hidrolizado de Caseína	500
------------------------	-----

## SOPORTE INERTE ( gr/l )

Agar .....	8
------------	---

Cuadro 2 Composición del medio nutritivo Groenewald, Wegsels y Boleman (1977) modificado por Díaz (1985)

Kn \ 2,4-D	0	1.0	3.0	5.0	7.0
0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
0.3	11	12	13	14	15
0.5	16	17	18	19	20
0.7	21	22	23	24	25
1.0	26	27	28	29	30
1.5	31	32	33	34	35

Cuadro 3 Arreglo de tratamientos factorial 5 X 7 de Kn y 2,4-D para la fase de proliferación de callo.

# Número de tratamiento

K mg/l

SALES INORGANICAS ( mg/l )

Macronutrientes

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	1650
$\text{KNO}_3$ .....	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	170
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	170

micronutrientes

$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	22.3
$\text{KI}$ .....	0.83
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ...	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$ .....	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	27.8

CONSTITUYENTES ORGANICOS

Vitaminas ( mg/l )

Tiamina - HCl ....	0.4
Inositol .....	100

Base Nitrogenada ( mg/l )

Sulfato de Adenina	80
--------------------	----

Fuente de Carbono ( gr/l )

Sacarosa .....	30
----------------	----

SOPORTE INERTE ( gr/l )

Agar .....	8
------------	---

Cuadro 4 Composición del medio nutritivo " A " para la multiplicación de brotes de Murashige (1976)

2iP AIA	0	10	20	30
0	#1	2	3	4
0.3	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12

Quadro 5 Arreglo de tratamientos factorial 4 X 3 de 2iP e AIA para la fase de inducción de brotes.

# Número de tratamiento

= mg/l

Tabla 1. Número de unidades de tejido coltore para cada tratamiento

S = Semana

T = Número de tratamiento

- = Tratamientos en donde no hubo respuesta

S	1	2	3	4
1	---	---	---	---
2				/
3				/
4				/
5	---	---	---	---
6				/
7				/
8		/		
9		/		
10		/		
11				/
12				/
13		/		
14		/		
15		/		
16		/		
17		/		
18		/		
19		/		
20		/		

S	1	2	3	4
21	---	---	---	---
22		/		
23		/		
24		/		
25		/		
26	---	---	---	---
27		/		
28		/		
29		/		
30		/		
31	---	---	---	---
32		/		
33		/		
34		/		
35		/		

Tabla 2

diámetro promedio de la base de los collos (mm) observado al inicio y a lo largo de 10 semanas (cada quince días) para cada tratamiento.

S = Semana

T = Número de tratamiento

T	S	Inicial	2	4	6	8	10
1	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	3	5	6
3	2	2	3	3	3	3	5
4	2	2	2	3	6	9	11
5	2	2	2	2	2	2	2
6	2	2	3	3	3	3	3
7	2	2	3	3	7	11	15
8	3	3	3	4	4	-	-
9	2	2	4	6	9	-	-
10	2	2	5	7	9	16	36
11	2	2	2	4	5	5	6
12	2	2	2	4	7	11	16
13	2	2	3	5	5	11	17
14	2	2	3	5	5	11	16
15	3	3	6	10	15	22	28
16	2	2	4	6	10	12	15
17	3	3	3	5	8	15	26
18	3	3	5	9	21	36	49
19	2	2	6	13	29	41	47
20	3	3	5	12	17	26	40



Tabla . . . . Continuación

T	S	Inicial	2	4	6	8	10
21		2	3	3	3	3	3
22		3	3	4	5	8	11
23		3	7	9	15	-	-
24		3	8	11	14	-	-
25		2	6	10	15	25	34
26		3	3	4	4	4	4
27		3	3	4	5	8	10
28		2	3	5	6	14	17
29		3	4	6	10	19	27
30		2	4	10	16	21	33
31		3	3	3	3	3	3
32		3	7	10	18	24	29
33		2	8	17	23	31	39
34		2	5	10	19	27	35
35		2	5	6	9	19	26

- = No se siguió observando.

Tabla 3 Semana de aparición y número total de brotes en cada tratamiento en el medio basal de Groenewald, Wessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985).

Tratamiento.	Semana de Aparición de los brotes	Número total de brotes. #
7	4	2
8	10	10
10	12	3
11	10	37
12	8	46

# = A las doce semanas.

Tabla 4 Diámetro promedio de la base de los callos (mm) observados a las 10 semanas de cultivo:

T = Número de tratamiento M = Medio

A = en el medio A para la proliferación de brotes de Murashige (1976).

B = en el medio de Groenewald, Weessels y Koleman (1977) modificado por Díaz (1985).

T	M	A	B
1		30	28
2		34	38
3		//	41
4		51	//
5		28	31
6		44	37
7		40	//
8		45	//
9		31	27
10		47	43
11		//	//
12		33	41

// = Callos que cubrieron toda la superficie del medio.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aitchinson, P.A., A.J. Macleod y M.M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue ( callus ) cultures. En: Plant Tissue and Cell Culture. ( H.E. Street Ed. ). Blackwell Scientific Publ., Oxford: 267 - 306.
- 2.- Anderson-Grossgerge, 1977. ¿ Sabe usted qué son las suculentas ? Ovaciones, 1ra. ed., 3 de Mayo.
- 3.- Anon. 1963. Coated stock, Pantone color specifier. Pantone Inc., New Jersey.
- 4.- Anon. 1978. Cactus and succulents. ( L. Brandt Ed. ). Lane Publ. Co., California.
- 5.- Anon. 1980. Mercado de flores y plantas de ornato de los E.U.A. I.M.C.E., México.
- 6.- Anon. 1984. Boletín Mensual 1981 - 1984. Departamento de Comunicación de la Dirección General de Economía Agrícola, S.A.R.H., México.
- 7.- Anon. 1984. Curso de preparación de plantas por cultivo de tejidos. CONAFRUT - S.A.R.H., México.
- 8.- Rakoc, S. 1983. Cacti: Retail plants tailored for the 1980s. Florests' Rev. 172, 4465: 26 - 34.
- 9.- Ballester, J.F. 1980. Los cactus y las otras plantas suculentas. Floreprint, España.
- 10.- Bengochea, T. y J. Dodds. 1983. Uso del cultivo de tejidos para almacenar material genético en plantas. Ciencia y Desarrollo. 51: 61 - 64.
- 11.- Bracementes, R.M. 1981. Consideraciones sobre la clasificación de las cactáceas. Cact. Suc. Mex. 25: 20 - 23.
- 12.- Bravo, H. 1937. Las cactáceas de México. U.N.A.M., México.
- 13.- ----- 1978. Las cactáceas de México. U.N.A.M., México.
- 14.- ----- y H. Piña. 1979. Algunos aspectos sobre la industrialización de los nopales. Cact. Suc. Mex. 24:

27 - 31.

- 15.- Britton, N.S. y J.N. Rose. 1963. The Cactaceae. Dover Publ., New York. 3.
- 16.- Carey, R.H. 1980. Safeguarding the cacti. Garden. 1, 5: 4 - 7, 31.
- 17.- Clives, I. 1970. The complete handbook of cacti and succulents. Ward Lock Limited, Londres.
- 18.- Corona, V. y V.M. Chávez. 1982. Cultivo de cactáceas en medios asépticos. Cact. Suc. Mex. 27: 17 - 23.
- 19.- De Fossard, R.A. 1979. Tissue culture for plant propagators. The University of New England Printery, Australia.
- 20.- Dísz, P. 1985. Propagación "in vitro" de Astrophytum myriostigma. En: La Investigación, el Desarrollo Experimental y la Docencia CONAFRUT - S.A.R.F. Durante 1984. CONAFRUT - S.A.R.F., México.
- 21.- Dodds, J.H. y L.W. Roberts. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge.
- 22.- Everett, N.P., P.L. Wang y H.E. Street. 1978. Hormone regulation of cell growth and development "in vitro". En: Frontiers of Plant Tissue Culture. ( T.A. Thorpe Ed. ). Int. Assoc. for Plant Tissue Culture, Calgary: 307 - 316.
- 23.- Fearn, B. 1981. Seed germination: the modern approach. The Cactus and Succulent Journal of Great Britain. 43, 1: 13 - 16.
- 24.- Friederich, H. 1985. Las primeras relaciones de cactáceas en la vieja Europa. Cact. Suc. Mex. 20: 53 - 67.
- 25.- Gilkey, J.E. 1944. The Astrophytum group. Cactus and Succulents Society of America. 16, 10: 143 - 151.
- 26.- Gresshoff, P.W. 1978. Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured "in vitro".

- En: Phytormones and Pelated Compounds - A Comprehensive Treatist. ( D.S. Letham, P.B. Goodivin y T.J.V. Higgins Eds. ). Amsterdam, North Holland. 2: 1 - 29.
- 27.- Groenewald, E.G., D.C.J. Wessels y A. Koleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species ( Agavaceae ). Z. Pflanzenphysiol. 81: 369 - 373.
- 28.- Haage, W. 1963. Cacti and Succulents. Vista Books, London: 34 - 43.
- 29.- Hartman, H. y D.E. Kester. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. C.E.C.S.A., México.
- 30.- Hecht, H. 1981. Cactus y otras suculentas. Omega, España.
- 31.- Huang, L. y T. Murashige. 1976. Plant tissue culture media: Major constituents, their propagation and some applications. Tissue Culture Assoc. Man. 3: 539 - 546.
- 32.- Hunt, D., N. Taylor y J. Fenter. 1980. Connoisseurs' cacti. The Cactus and Succulent Journal of Great Britain. 42. 1: 4 - 6.
- 33.- Hutchinson, J. 1967. The genera of Flowering plants ( Angiospermae ). Oxford University Press, Cambridge. 2.
- 34.- Jacobs, E.P. 1979. Plant hormones and plant development Cambridge University Press, Cambridge.
- 35.- Johnson, J.L. y E.R. Emino. 1977a. Propagation of Opuntia poliacantha as influenced by plant growth regulators. HortScience. 12, 4: 239.
- 36.- ----- . 1977b. Tissue culture propagation of Wamillaria elongata as influenced by plant growth regulators. HortScience. 12, 4: 394.
- 37.- ----- . 1979. Tissue culture propagation in the cactaceae. Cactus and Succulent Journal (U.S. ). 51: 275 - 277.

- 38.- Izarte, J.S., W.S. Gaiser y O.P. Brown. 1982. " in vitro " propagation of Spinthyllus chiyoecardium. HortScience. 17. 1: 84.
- 39.- Lenhinger, A. 1980. Biotécnicas. Osera, España.
- 40.- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. F.C.A., México.
- 41.- Mauseth, J.D. y E. Halcerin. 1975. Hormonal control of organogenesis in Cnuntia polycantha ( Cactaceae ). Amer. J. Bot. 62, 8: 869 - 877.
- 42.- Mauseth, J.D. 1979. A new method for the propagation of cacti: Sterile culture of axillary buds. Cactus and Succulent Journal ( U.S. ). 51: 186 - 187.
- 43.- Meyer, F.N. y J.L. Laughlin. 1981. Economic uses of Cnuntia. Cactus and Succulent Journal ( U.S. ). 53: 107 - 112.
- 44.- Minocha, S.O. y P.N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus culture of Neomammillaria prolifera Miller ( Cactaceae ). Amer. J. Bot. 61. 2: 168 - 172.
- 45.- Murashige T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 493.
- 46.- ----- 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135 - 166.
- 47.- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plant from tissue culture, En: Plant Cell Tissue and Organ Culture ( J. Reinert y Y.P.S. Bajaj Eds. ). Springer - Verlag, N.Y.: 179 - 206.
- 48.- Negrutiu, I. 1978. " in vitro " organogenesis of Arabidopsis thaliana ( L. ) Heinh - A model system, En: Proc. Symp. of Plant Tissue Culture. Science Press, Pekings: 409 - 420.
- 49.- Reinert, J., Y.P.S. Bajaj y B. Zbell. 1977. Aspects



- of organization - organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. En: Plant Tissue and Cell Culture. ( H.E. Street Ed. ). Blackwell Scientific Publ., Oxford: 389 - 427.
- 50.- Rojas, G.M. 1982. Fisiología vegetal aplicada. McGraw Hill, México.
- 51.- Salisbury, B. y C. Ross. 1978. Plant physiology. Wadsworth Publ. Co. N.Y.
- 52.- Sánchez - Mejorada, H. 1980. México's problems and programmes monitoring trade in common and endangered Cacti. The Cactus and Succulent Journal of Great Britain. 44, 2: 36 - 38.
- 53.- Seeni, S. y A. Gnanam. 1980. Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant Chamaecereus sylvestrii ( Cactaceae ). Physiol Plant, 49: 465 - 472
- 54.- Steinhart, C.E. 1962. Tissue cultures of a cactus. Science, 137: 545 - 546.
- 55.- Street, H.E. 1977. Laboratory organization, En: Plant Tissue and Cell Culture. ( H.E. Street Ed. ). Blackwell Scientific Publ., Oxford: 11 - 30.
- 56.- ----- . 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. En: Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Application. ( Sharp W.R. y col., Eds ). Academic Press University, N.Y.: 17 - 36.
- 57.- Szwedkoska, A. 1974. The role of the cytokinins in the control of cell growth and differentiation in culture. En: Tissue Culture and Plant Science. ( H.E. Street Ed. ). Academic Press University, N.Y.: 17 - 36.
- 58.- Thomas, E. y M.R. Davey. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publ. LTD, London.
- 59.- Thorpe, T.A. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis " in vitro ". En: Frontiers of Plant Tissue Culture. ( T.A. Thorpe Ed. ). Int. Assoc. for Plant Tissue Culture, Calgary: 49 - 58.

- 60.- Vovides, A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. Biótica.5, 2: 219 - 279.
- 61.- Wochok, Z.S. 1981. Role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. Biol Conserv. 20, 2: 83 - 90.
- 62.- Yeoman, M.M. y H.E. Street. 1977. Tissue ( callus ) cultures techniques. En: Plant Tissue and Cell Culture. ( H.E. Street Ed. ). Blackwell Scientific Publ., Oxford: 31 - 61.
- 63.- Zapiren, M. 1981. Presentación de audiovisual de cactáceas. En: Segunda Reunión Nacional sobre Ecología, Manejo y Domesticación de las Plantas Útiles del Desarrollo. Subsecretaría Forestal, I.N.I.F.: 103 - 106.
- 64.- ----- . 1982. Protección forestal de las especies ornamentales amenazadas. En: Segunda Reunión Nacional sobre Ecología, Manejo y Domesticación de las Plantas Útiles del Desarrollo. Subsecretaría Forestal, I.N.I.F.: 109.
- 65.- Zeislen N. y A. Kerent. 1983. A technique for grafting cacti. Florest's Rev. 172, 4465: 25.