

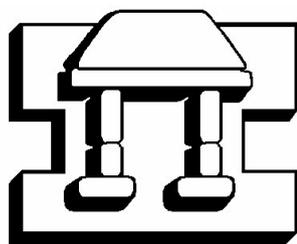


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Micropropagación de *Neobuxbaumia tetetzo* (Cactaceae) del
Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, con fines de conservación
ex situ”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
ANGÉLICA GALVÁN TORRES



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ERNESTO AGUIRRE LEÓN

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA

2005



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.

Dedicatoria

Papas: Siempre les estaré profundamente agradecida, porque sin duda éste logro así como muchos otros se los debo a ustedes, ya que siempre fueron ejemplo de perseverancia y lucharon por sacarnos adelante a mí y a mis hermanos. Gracias por darme las bases para caminar por esta vida. Los quiero mucho.

Especialmente te agradezco mamá por la fortaleza que haz demostrado estos últimos diez años, finalmente a tí te debo el tener una carrera universitaria. Se que mi papá debe estar muy orgulloso de nosotras.

También dedico este trabajo a mis hermanos, Maribell, Roberto y Rodrigo; aunque no acostumbre ser muy afectuosa, los quiero mucho.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de estudiar esta carrera tan maravillosa.

A mi director de tesis M. en C. Ernesto Aguirre, por ser más que un maestro para mí y por todo el apoyo brindado en estos últimos años.

A la maestra Ma. Elena Huidobro y al profesor José Luis Gama, por darme ese empujoncito que tanta falta me hacía para concluir este trabajo.

A mis revisores de Tesis: Biol. Josefina Vázquez, Biol. Marcial García y Biol. Antonio Meyrán por sus sugerencias para la culminación de esta tesis.

A todas las personas que colaboraron en mi formación profesional y personal, profesores, amigos y familiares. Especialmente a tí Gustavo, sin duda mi mano derecha a lo largo de esta carrera, gracias por todo.

A Edgar Hernández, por estar a mí lado y hacerme tan feliz; te quiero mucho.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 5 |
| 4. OBJETIVOS | 10 |
| Objetivo General | 10 |
| Objetivos Particulares | 10 |
| 5. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE | 11 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODO | 13 |
| 6.1 Iniciación | 13 |
| 6.2 Multiplicación..... | 13 |
| 6.3 Enraizamiento | 14 |
| 6.4 Aclimatización | 14 |
| 7. RESULTADOS | 16 |
| 7.1 Formación de callo. | 16 |
| 7.2 Formación de brotes. | 20 |
| 7.3 Enraizamiento | 24 |
| 7.4 Aclimatización | 28 |
| 8. DISCUSIÓN | 33 |
| 9. CONCLUSIONES | 40 |
| 10. REFERENCIAS | 41 |
| 11. APÉNDICE | 48 |
| Antecedentes Históricos | 48 |
| Abreviaturas Utilizadas | 50 |
| Glosario..... | 50 |

1. RESUMEN

Neobuxbaumia tetetzo es una cactácea columnar que habita el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, donde existen diversos factores naturales que evitan el establecimiento de sus plántulas como la depredación de semillas, la alta radiación solar y la carencia de plantas nodriza, causado por la perturbación del hábitat. La micropropagación es un instrumento que permite la conservación de especies vegetales y ayuda al mantenimiento de colecciones vivas que actúan como fuentes de germoplasma con el que, a su vez, se realizan actividades de investigación y educación. Por lo anterior, este trabajo pretende desarrollar un método de micropropagación para *N. tetetzo* aplicable a su conservación *ex situ* que favorezca el reingreso a su hábitat natural. Se partió de plántulas germinadas *in vitro* con cinco meses de edad que se dividieron en dos grupos, el primero fue sometido a etiolación durante dos meses y el segundo se mantuvo en condiciones de iluminación ($35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Pasado dicho tiempo se obtuvieron explantes que contuvieran 2 ó 3 areolas y se cultivaron en medio MS adicionado con las citocininas BAP o 2iP en diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10 y $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La etiolación no favoreció la micropropagación de *N. tetetzo* ya que fue mejor la respuesta observada con explantes no etiolados donde la organogénesis inició a partir de la tercer semana de cultivo. La mayor proliferación se obtuvo con explantes no etiolados en el tratamiento con 2iP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), donde se formaron en promedio hasta 15 brotes por explante. Se obtuvo el 75% de enraizamiento utilizando medio MS libre de reguladores de crecimiento. Las plantas enraizadas fueron trasplantadas a una mezcla de tierra-arena para iniciar la fase de aclimatización, la cual concluyó en el invernadero, donde ocho semanas después se cuantificó el 89% de sobrevivencia. La micropropagación de *N. tetetzo* bajo las condiciones hasta ahora probadas es factible a gran escala y resulta una herramienta útil en proyectos de restauración para la reintroducción de la especie al hábitat natural.

2. INTRODUCCIÓN

Entre las numerosas zonas áridas del país, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, constituye una de las zonas secas de mayor diversidad florística en México; sobresalen algunas familias de plantas que han encontrado aquí un centro de diversificación como: Asteraceae, Cactaceae y Poaceae, entre otras (Valiente-Banuet y cols., 2000).

En la actualidad en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán es posible observar zonas con distintos niveles de deterioro causados por fenómenos naturales como la erosión hídrica y eólica, así como por actividades humanas que han provocado la pérdida de cobertura vegetal, causando cambios en el uso de suelo, perjudicando parcial o totalmente los sistemas naturales y propiciando su desaparición. Dentro de este Valle, se encuentra Zapotitlán Salinas, zona que se ve afectada por dichos procesos de deterioro, lo que resulta en una baja productividad, desertificación, alteración de los sistemas naturales, desequilibrio en los procesos e interacciones ecológicas, disminución y pérdida de la biodiversidad (Informe UBIPRO, 2001).

Dentro del Valle de Zapotitlán Salinas, las cactáceas están representadas por 75 especies incluidas en 21 géneros (Dávila y cols., 1993). El género *Neobuxbaumia* esta representado por 3 especies columnares: *N. mezcalaensis*, *N. macrocephala* y *N. tetetzo*, las cuales presentan diferentes áreas de distribución. *N. tetetzo* crece en las laderas de los cerros formando parte de la vegetación de la selva baja espinosa y caducifolia entre 800 y 1200 msnm, y es un elemento dominante de las comunidades vegetales denominadas tetecheras (Valiente-Banuet y cols., 2000 y SEMARNAT, 2003).

La reproducción natural de esta especie se lleva a cabo mediante la dispersión de semillas, realizada principalmente por el murciélago frugívoro *Leptonycteris curasoae*. El proceso de germinación ocurre preferentemente bajo la cobertura de *Mimosa luisiana*, arbusto abundante en las comunidades vegetales de Zapotitlán Salinas que actúa como planta nodriza. Esta asociación explica el establecimiento de dicha especie debido a que genera un micrositio donde la

radiación solar es menor, y consecuentemente se reduce la temperatura del suelo y hay mayor humedad disponible (Valiente-Banuet y cols, 1991).

Valiente-Banuet (2003) y Godínez-Álvarez (1999) han evaluado que la sobrevivencia de esta cactácea es relativamente baja dentro del Valle de Zapotitlán Salinas, ya que aproximadamente solo 3 de cada 2160 plántulas logran establecerse (0.1%); los factores que intervienen en este proceso, además de la no asociación a plantas nodriza, son la depredación de frutos y semillas, así como la alta radiación solar.

Esta cactácea se considera clave en el mantenimiento de la diversidad de invertebrados y vertebrados, especialmente insectos, aves y murciélagos nectarívoros y frugívoros. El aprovechamiento que se le da de manera local, es principalmente el consumo de frutos, llamados higos de teteche, al igual que las semillas; los tallos son utilizados como forraje y cuando son tiernos se consumen guisados o encurtidos con vinagre; los haces vasculares, una vez secos, se utilizan en la construcción de techos y cercas de las casas campesinas tradicionales o como leña en sustitución de leguminosas arbóreas. En el vivero de la localidad, se le propaga por semilla para venta como planta ornamental (Valiente-Banuet y cols. 1996), aunque no existe un manejo específico del recurso, por lo que la recolección de los productos útiles directamente en las poblaciones silvestres de la especie es una práctica común (Casas, 2002; SEMARNAT, 2003).

Una alternativa que ha mostrado ser eficiente para la conservación de cactáceas es el cultivo de tejidos, el cual se ha enfocado a incrementar el número de individuos bajo condiciones asépticas en un medio artificial con nutrición, luminosidad y temperatura; a partir de explantes muy pequeños tales como embriones, semillas, tallos, meristemos apicales o radiculares, callos, células aisladas o granos de polen (Hartman, 1975; Corona y cols., 1982).

Los sistemas de propagación *in vitro* poseen grandes ventajas en comparación con otros métodos tradicionales como son el que permiten reproducir grandes cantidades de plantas a partir de pocos explantes; reducen la necesidad de

alterar áreas naturales para obtener material vegetal que sirva de “planta madre”; disminuye la mortalidad de las plántulas en las primeras fases del desarrollo y permite obtener plantas libres de patógenos así como un ciclo de cultivo relativamente corto.

La germinación y propagación *in vitro* de *N. tetetzo*, son instrumentos que facilitarían su conservación *ex situ*, manteniendo colecciones vivas que actuarán como reservorios de germoplasma, en los cuales se realizarán actividades de investigación y educación; razones por las que se propone este estudio, así mismo ayudaría en su reingreso al hábitat natural en proyectos de restauración de zonas perturbadas, e incluso su manejo con fines ornamentales entre otros.

3. ANTECEDENTES

A pesar de que la propagación de cactáceas por cultivo de tejidos ha sido estudiada extensivamente, por el momento no se han encontrado reportes de micropropagación para *Neobuxbaumia tetetzo*, por ello, este trabajo está basado en metodologías realizadas para otras especies de la familia, las cuales en su mayoría están amenazadas o en peligro de extinción. Algunos de los trabajos realizados en la propagación *in vitro* de cactáceas se enlistan enseguida:

Mauseth (1979) propagó varias especies de cactáceas a través de yemas axilares, entre ellas *Pachycereus pringlei*, una cactácea columnar. El medio de cultivo fue Lin y Staba, adicionado con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP), las especies propagadas fueron establecidas exitosamente en suelo.

Johnson y Emino (1979) cultivaron ocho especies de cactáceas usando medio de cultivo Murashige & Skoog 5519 (MS) con varios reguladores de crecimiento. Obtuvieron callo en todas las especies probadas, raíces en seis y se promovió la diferenciación de brotes o elongación en cuatro especies.

Vyskot y Jára (1984) describieron una técnica basada en la estimulación hormonal de las yemas axilares de *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus spachianus*, cultivadas en medio MS con bajas concentraciones de las auxinas ácido indolacético (AIA) o ácido naftalénacético (ANA) y de las citocininas BAP o cinetina. Se produjeron brotes y fueron trasplantados a suelo con más del 80% de sobrevivencia.

Corona y Yáñez (1984) intentaron la propagación de *Cephalocereus senilis* sobre medio MS con varias combinaciones de cinetina con ANA, ácido indolbutírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y AIA. Obtuvieron callo y en ningún caso se logró la formación de brotes.

Ault y Blackmon (1987) realizaron la propagación de *Ferocactus acanthodes* cultivando explantes apicales de plántulas germinadas *in vitro*. Lograron la proliferación de brotes a partir de yemas axilares en medio MS adicionado con cinetina.

Dabekaussen y cols. (1991) desarrollaron un sistema de cultivo para estudiar los efectos que afectan la activación areolar de *Sulcorebutia alba*, utilizando medio MS con varias citocininas; observaron que la presencia de estas últimas es esencial para activar las areolas.

Rubluo y cols. (1993) crearon una estrategia para el reestablecimiento de *Mammillaria haageana*, *M. huitzilopochtli* y *M. san-angelensis*, especies en peligro de extinción. Utilizaron plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes cultivados en medio MS con benciladenina (BA). *M. san-angelensis* fue propagada masivamente y reestablecida exitosamente en su hábitat natural.

Garrido (1998) determinó las concentraciones hormonales para la generación de brotes axilares a partir de areolas con las combinaciones de ANA con KIN en medio de cultivo MS para las especies *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum*. Se obtuvo un 100% de sobrevivencia de las plantas generadas *in vitro* trasplantadas a suelo.

Pérez y cols. (1998) desarrollaron sistemas de micropropagación para 21 especies de cactáceas mexicanas usando explantes de plántulas germinadas *in vitro* o segmentos de plantas juveniles de invernadero cultivadas en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BA y ANA. En todas las especies se registró la múltiple formación de brotes a partir de las areolas.

Malda y cols. (1999a) realizaron la micropropagación de la especie *Coryphantha minima* para determinar los factores que alteran el crecimiento, y modifican la actividad CAM. Concluyeron que el crecimiento de esta especie se acelera considerablemente con el cultivo *in vitro* comparado con el crecimiento que se observa *in situ*.

Malda y cols. (1999b) micropropagaron *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima* utilizando el medio de cultivo MS adicionado con BA y ANA para inducir la organogénesis. Las plantas formadas fueron enraizadas sobre un medio libre de reguladores de crecimiento y posteriormente se establecieron en invernadero. Se observó que las plantas obtenidas *in vitro* tienen menor contenido de ceras epicuticulares comparadas con las plantas cultivadas *ex vitro*, sin embargo esto no fue un factor que afectara la aclimatización.

Flores-León y Ortiz-Montiel (1999) propagaron *in vitro* *Cephalocereus senilis* a través de activación areolar de plantas etioladas. Los explantes fueron cultivados en medio MS adicionado con BAP en diferentes concentraciones. Todos los tratamientos formaron brotes a partir de callo.

Bhau (1999) regeneró brotes de *Coryphantha elephantidens* a partir de explantes de raíz cultivados con MS adicionado con 2,4-D y cinetina. La talla del explante y la concentración de sacarosa influyeron considerablemente en la regeneración a partir de callo. Las plantas regeneradas fueron enraizadas con medio MS libre de reguladores de crecimiento y fueron aclimatizadas, obteniendo el 100% de sobrevivencia en invernadero.

Anicua y Rivas (2000) establecieron las condiciones de propagación *in vitro* de tres cactáceas en riesgo o peligro de extinción. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de las citocininas KIN y BAP en la activación areolar de *Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*, las cuales tuvieron un periodo de etiolación previo a la toma de explantes para inducir la formación de auxinas endógenas. Solo se logró la formación de brotes para el género *Mammillaria*, en el caso de *E. grusonii* únicamente se formó callo.

Fuentes y Martínez (2001) regeneraron *Mammillaria conspicua* a través de areolas activadas *in vivo* por etiolación, utilizaron como reguladores de crecimiento BAP y 6-(?, ?-dimetilalilamino) purina (2iP); las plantas generadas *in vitro* fueron aclimatizadas en invernadero.

Papafotiou y cols. (2001) regeneraron *Mammillaria elongata* a través de callo obtenido a partir de tubérculos cortados como explantes. El medio de cultivo se adicionó con diferentes concentraciones de BAP y ANA. Los brotes formados fueron subcultivados para su enraizamiento sobre un medio con AIA. Las plantas obtenidas a través de este sistema fueron establecidas *ex vitro*.

Giusti y cols. (2002) realizaron la micropropagación de *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* probando combinaciones de ANA, BA, cinetina y TDZ en diferentes concentraciones. Obtuvieron una buena proliferación de brotes, en algunos casos asociados a gran formación de callo o brotes hiperhidratados. BA y cinetina fueron los reguladores de crecimiento que indujeron los mejores brotes.

Pelah y cols. (2002) cultivaron segmentos de cotiledón de *Selenicereus megalanthus* con diferentes concentraciones de TDZ. El enraizamiento de los brotes se obtuvo cultivándolos con ANA. Las plantas enraizadas fueron transferidas a suelo y aclimatizadas exitosamente en invernadero.

Rubluo y cols. (2002) observaron la influencia de auxinas como único regulador de crecimiento exógeno sobre la morfogénesis de plantas de *Mammillaria san-angelensis* subcultivadas por largo tiempo. Se regeneraron brotes a partir de explantes cultivados con auxinas, siendo AIA la que dio mejor respuesta.

Pérez-Molphe-Balch y cols. (2002) desarrollaron sistemas de micropropagación para tres cactáceas columnares del desierto de Sonora: *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* a través de explantes apicales, laterales y transversales de plántulas germinadas *in vitro* cultivados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BA y 2iP. Se formaron brotes en todos los casos, siendo el explante transversal el mejor para las tres especies.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar una vía de propagación *in vitro* para *Neobuxbaumia tetetzo* a partir de areolas que sea aplicable a su conservación *ex situ*.

Objetivos Particulares

Comparar el desarrollo de explantes de *N. tetetzo* obtenidos de plántulas etioladas y no etioladas.

Determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento (BAP y 2iP) que favorezcan la multiplicación de brotes *N. tetetzo* a partir de areolas.

Estimar el porcentaje de enraizamiento de las plantas obtenidas a través de micropropagación.

Cuantificar la sobrevivencia de las plantas después de la aclimatización en invernadero con fines de cultivo.

5. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Neobuxbaumia tetetzo es endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán; llamada comúnmente teteche o tetecho alcanza de 10 a 15 m de altura; cuando jóvenes, son plantas columnares simples, que en algunos casos se ramifican; el tallo es grueso de hasta 60 cm. de diámetro con numerosas costillas (hasta 20); presenta de 7 a 12 espinas centrales y 1 a 3 radiales, su color es verde grisáceo claro. Las flores son apicales, nocturnas y de color blanco verdoso de 5.5 cm. de largo y, aparecen de mayo a julio y son polinizadas por murciélagos y aves; el fruto es ovoide con pequeñas escamas, permanece adherido al tallo hasta que se seca; las semillas son pequeñas, negras y brillantes. Algunas sinonimias son *Cereus tetetzo*, *Pachycereus tetetzo*, *Cephalocereus tetetzo* y *Carnigea tetetzo* (Godínez-Álvarez, 1999; SEMARNAT, 2003)(Fig. 1).

Su clasificación taxonómica según Cronquist (1968) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Pachycereeae

Subtribu: Cephalocereinae

Género: *Neobuxbaumia*

Especie: *Neobuxbaumia tetetzo*



Figura 1. *Neobuxbaumia tetetzo* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Iniciación

Para la obtención del tejido vegetal, se realizó la germinación de semillas recién colectadas de *Neobuxbaumia tetetzo* provenientes de Zapotitlán Salinas, las cuales se lavaron con agua y jabón, se colocaron en alcohol al 70% por un minuto y se aplicó cloro comercial diluido al 10% durante 20 minutos, posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada esterilizada. Las semillas fueron cultivadas en frascos Gerber con 20 ml de medio Knudson C (KC) adicionado con 2% de sacarosa y $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, sin reguladores de crecimiento; el pH se ajustó a 5.7; fueron sembradas 6 semillas por frasco con 5 repeticiones cada uno. Los cultivos fueron incubados a $31 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16h. luz ($35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 8h. oscuridad.

6.2 Multiplicación

Las plantas de *N. tetetzo* germinadas *in vitro* con cinco meses de edad fueron divididas en 2 grupos, el primero fue sometido a etiolación y el segundo se mantuvo en las condiciones de iluminación antes mencionadas; cada uno de los grupos incluyó doce organismos. Transcurridos dos meses (siete desde su germinación) se obtuvieron de cada planta 4 explantes (yemas axilares), que contenían de 2 ó 3 areolas cada uno; las yemas axilares etioladas y no etioladas se cultivaron al azar en frascos Gerber con 20 ml de medio MS adicionado con bencilaminopurina (BAP) o 6-(γ,γ -dimetilalilamino) purina (2iP) en diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10 y $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Adicionando además, 3% de sacarosa y $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar. Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento. El pH del medio se ajustó a 5.8 y el medio se esterilizó durante 15 minutos (presión: 1.05 kg / temperatura $120\text{-}121^\circ\text{C}$). Las condiciones de cultivo fueron: fotoperiodo 16 hrs. ($35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ lámparas tipo luz blanca fría) y temperatura de $31 \pm 2^\circ\text{C}$.

Cada 30 días los explantes fueron transplantados a un medio fresco de igual composición al antes descrito para evitar la acumulación de metabolitos secundarios en el medio.

Una vez habiendo proliferación, los brotes fueron separados y la superficie de corte se enjuagó en un antioxidante ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico + $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico) para evitar la oxidación del tejido.

6.3 Enraizamiento

Los brotes obtenidos de aproximadamente 1 cm. fueron trasplantados a medio MS sin reguladores de crecimiento para inducir la formación de raíces. La respuesta se estimó por el porcentaje de enraizamiento.

6.4 Aclimatización

Las plántulas que exhibieron una raíz = 1cm se trasplantaron a frascos con una mezcla estéril de tierra y arena (1:1), fueron tapados con una película plástica transparente (closures sun cap Sigma) de 8 mm. de diámetro y filtro de polipropileno de $0.02 \mu\text{m}$ para disminuir gradualmente la humedad dentro del frasco, manteniéndose en el cuarto de incubación bajo las mismas condiciones de cultivo antes mencionadas. Después de dos semanas, se destaparon y llevaron a invernadero donde terminó la fase de aclimatización. Las plantas fueron regadas una vez por semana y se cuantificó la sobrevivencia 8 semanas después.

De esta manera se prepararon plantas para ser donadas al Jardín Botánico "Helia Bravo Hollis" en Zapotitlán Salinas, Puebla y otras para probar su reintroducción al hábitat natural bajo vigilancia periódica.

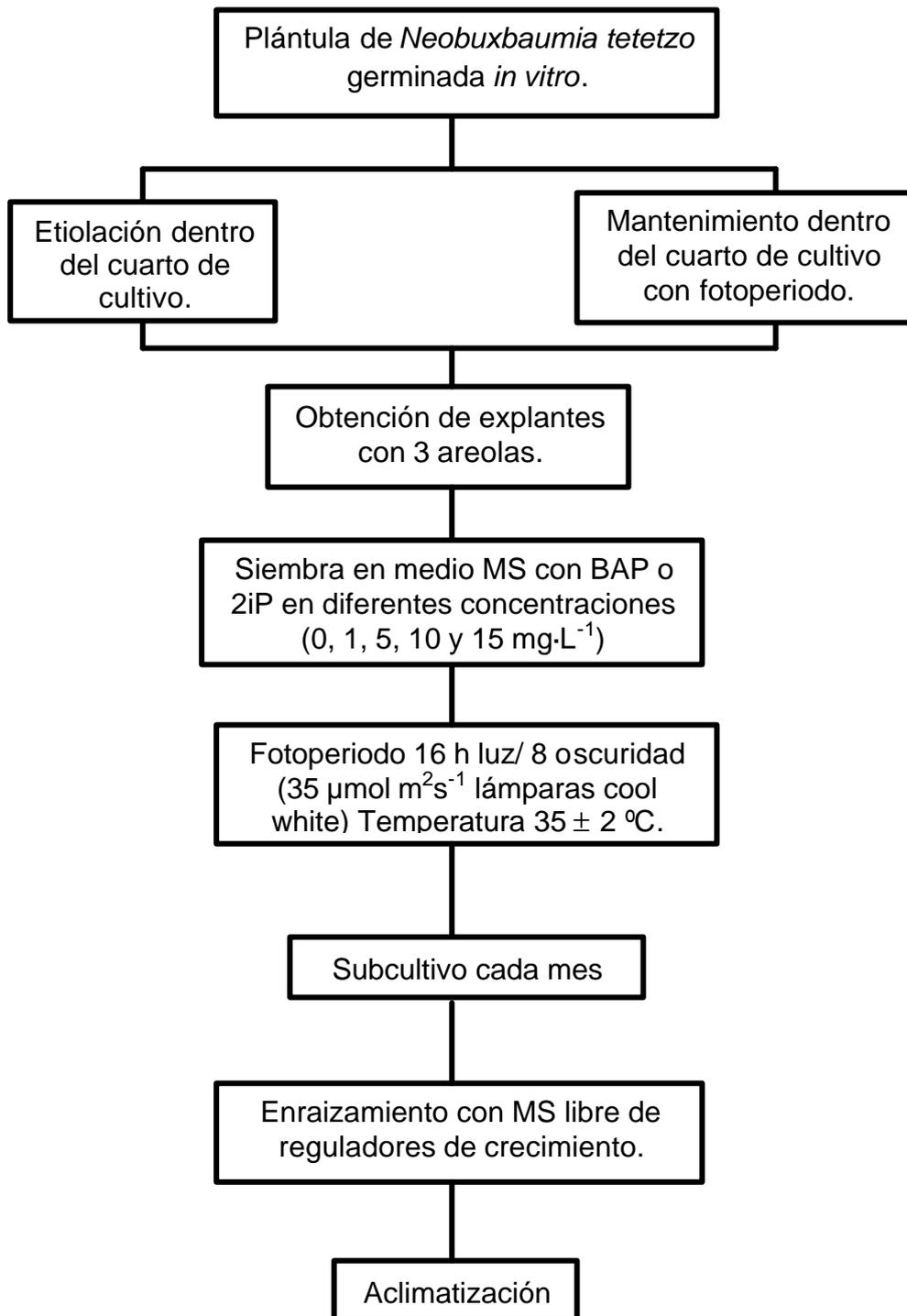


Diagrama del método de micropropagación para *Neobuxbaumia tetetzo*.

7. RESULTADOS.

7.1 Formación de callo.

Ambos tipos de explantes formaron callo en presencia de los dos reguladores de crecimiento. No obstante la frecuencia de aparición fue mayor en 2iP donde solo en una de las concentraciones probadas no hubo respuesta, en cambio para BAP fueron dos casos donde los explantes no formaron callo (Tabla 1).

Tabla 1. Formación de callo en explantes etiolados y no etiolados, cultivados con dos reguladores de crecimiento en distintas concentraciones.

| | [mg·L ⁻¹] | 1 | 5 | 10 | 15 |
|------------------------|-----------------------|---|---|----|----|
| Explantes no etiolados | BAP | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | 2iP | ✓ | ✓ | ✓ | x |
| Explantes etiolados | BAP | ✓ | ✓ | x | ✓ |
| | 2iP | ✓ | x | ✓ | ✓ |

En los explantes no etiolados la frecuencia de formación de callo se mantuvo constante con BAP (20%). No hay diferencia respecto al grupo control salvo con la concentración de 10 mg·L⁻¹ donde la respuesta fue nula (Fig. 2).

En contraste el regulador 2iP tuvo un efecto muy variable, aumentando y disminuyendo la formación de callo con las distintas concentraciones. La frecuencia fue hasta 4 veces mayor respecto al grupo control con la concentración de 1 mg·L⁻¹, y hasta 2 mayor con 10 mg·L⁻¹; sin embargo, con 5 mg·L⁻¹ se inhibió la respuesta (Fig. 2).

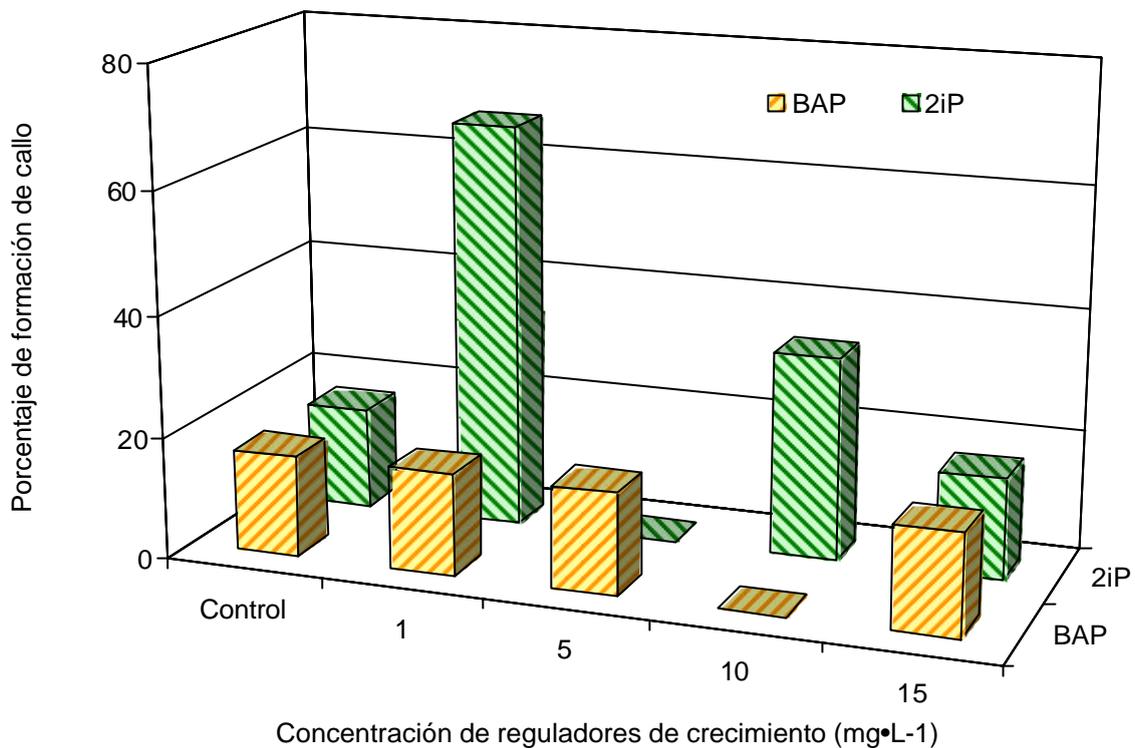


Figura 2. Porcentaje de formación de callo para explantes no etiolados con distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP y 2iP.

El crecimiento de callo se observó sobre la superficie del corte de los explantes en todos los tratamientos. La primera evidencia de formación de éste ocurrió en 2iP (10 mg·L⁻¹) en la tercera semana de incubación de un explante no etiolado; este presentó una apariencia compacta, color verde cristalino, cuyo tamaño alcanzó hasta 2.5 cm. de alto x 3.5 cm. de ancho (Fig. 3). Este regulador no sólo indujo la mayor formación de callo, sino que además requirió menos tiempo para su formación.

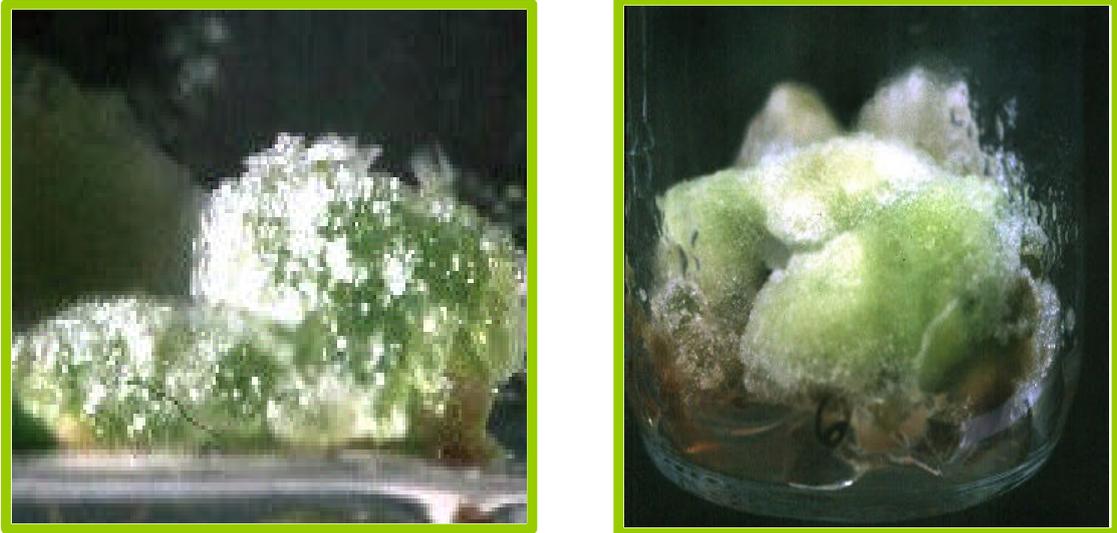


Figura 3. Callos de *N. tetetzo* formados a partir de explantes no etiolados con el regulador de crecimiento 2iP ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

En los explantes etiolados la frecuencia de aparición de callo fue cuantitativamente semejante con ambos reguladores de crecimiento, los valores más altos se presentaron con las concentraciones de $1, 5$ y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ siendo de 1.5 a 2 veces mayor respecto al grupo control; con excepción de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ donde ambos reguladores inhibieron la formación de callo (Fig. 4).

Los callos obtenidos fueron muy sensibles a la manipulación y al ser subcultivados o cortados se oxidaron y murieron aproximadamente dos meses después de su formación (Fig. 5).

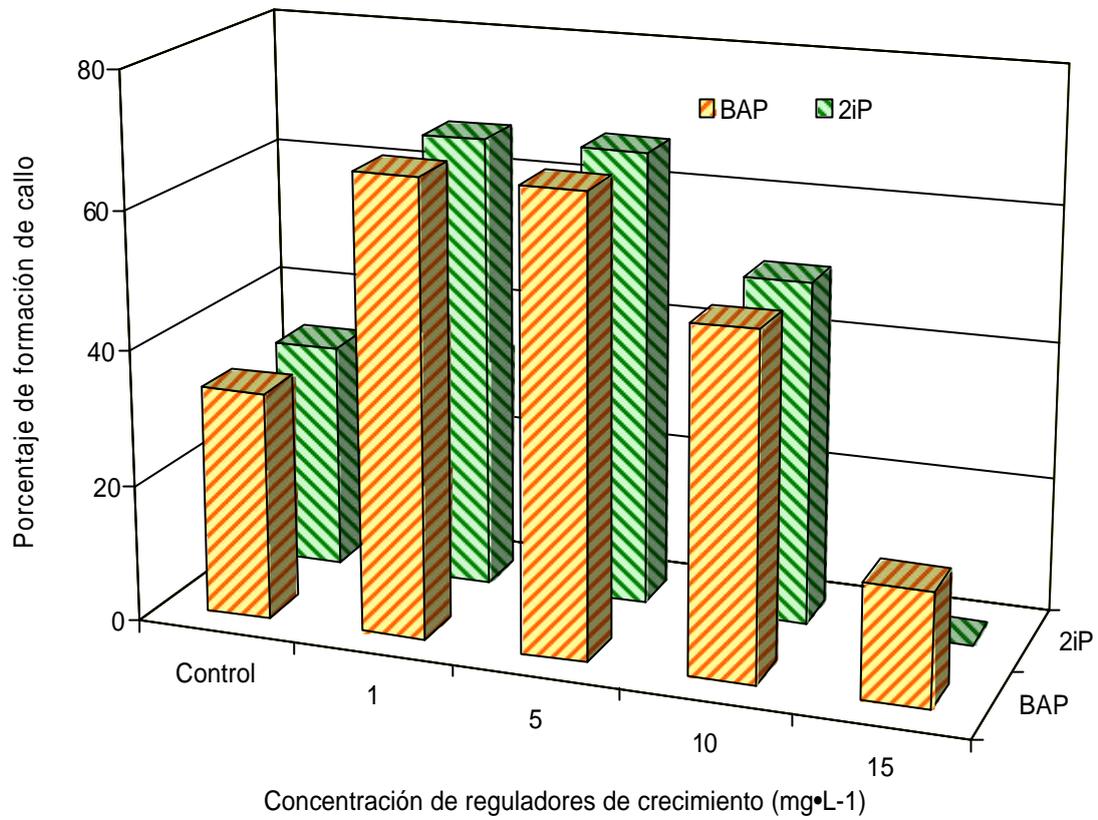


Figura 4. Porcentaje de formación de callo para explantes etiolados con distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP y 2iP.



Figura 5. Callo formado a partir de un explante etiolado y cultivado con BAP (5 mg·L⁻¹) con la parte basal oxidada después del subcultivo.

7.2 Formación de brotes.

En los explantes no etiolados se obtuvo formación de brotes con ambos reguladores de crecimiento y esta respuesta fue directamente proporcional a la concentración de los mismos. La respuesta con ambos reguladores no sólo mostró diferencias en la concentración de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ donde la influencia de 2iP fue superior a la de BAP y la mayor proliferación ocurrió a partir de la cuarta semana de cultivo con el regulador 2iP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) donde se obtuvieron 15 ± 1.75 brotes (Fig. 6).

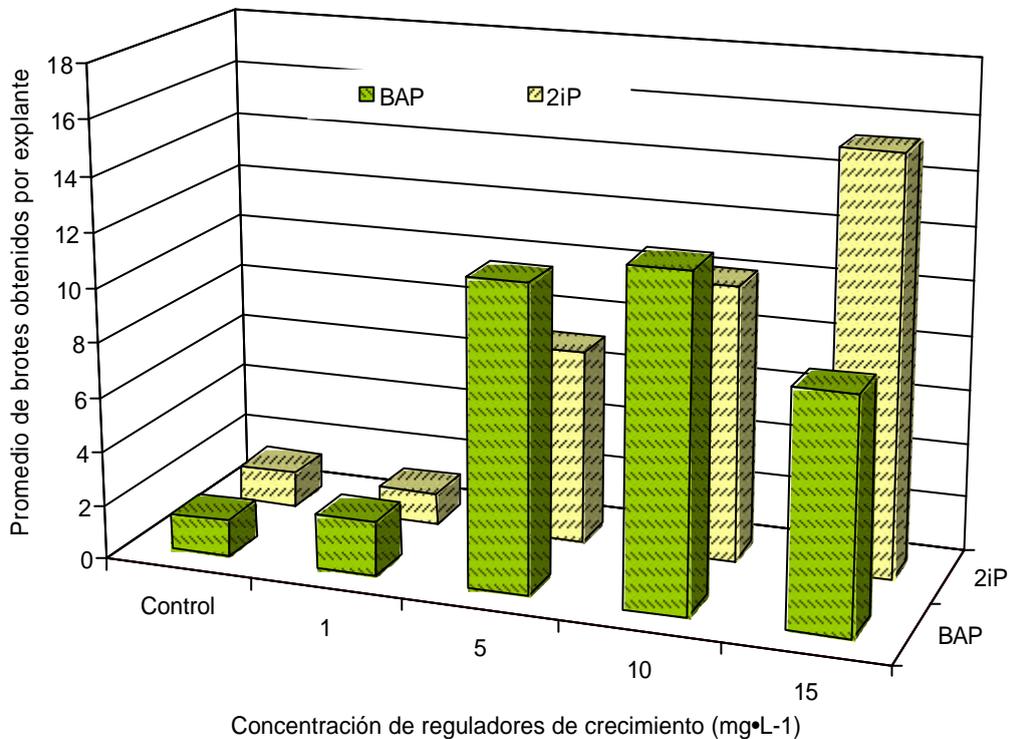


Figura 6. Promedio de brotes formados por explantes no etiolados bajo la influencia de los reguladores de crecimiento BAP y 2iP en distintas concentraciones.

Para los explantes etiolados, la proliferación de brotes comenzó después de la octava semana de cultivo. El regulador de crecimiento 2iP tuvo un efecto relativamente constante en las diferentes concentraciones y aumentó hasta 5

veces con la concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, esto contrasta con BAP donde sólo se observó respuesta con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo hasta 21 veces mayor respecto al grupo control; en el resto de las concentraciones no se formaron brotes (Fig. 7).

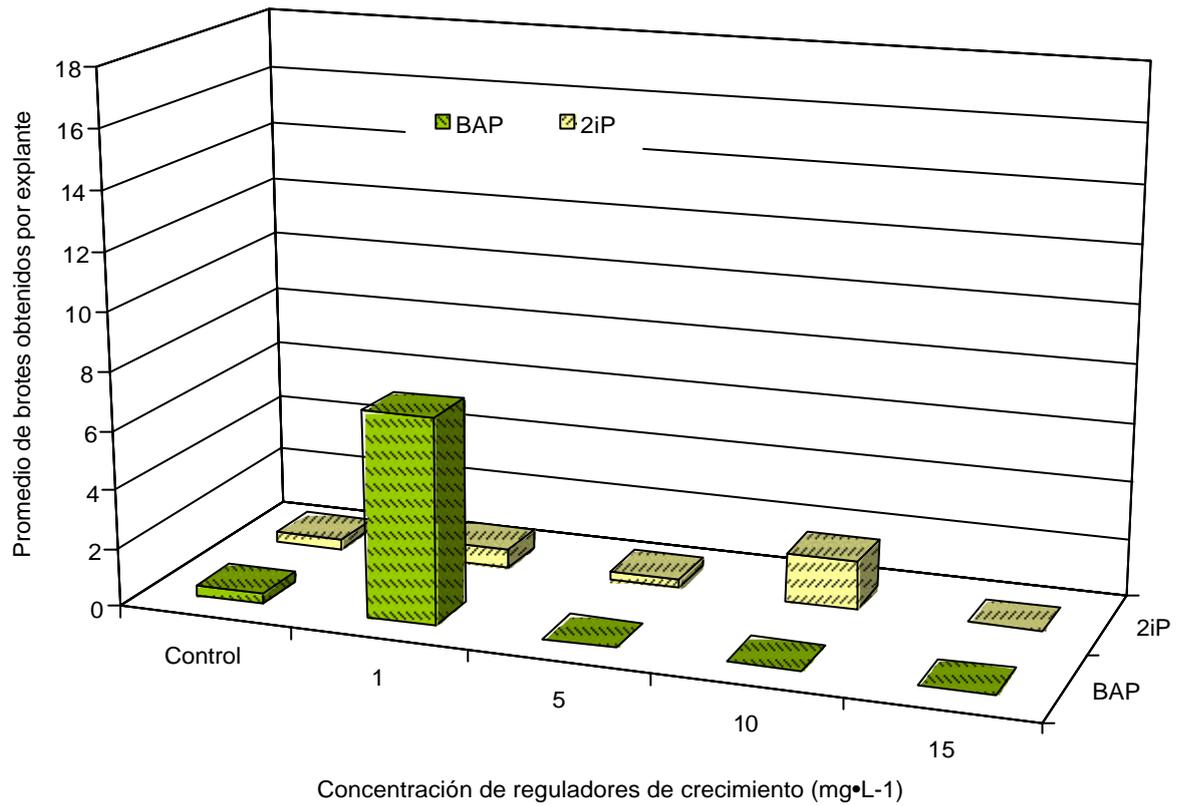


Figura 7. Promedio de brotes formados por explantes etiolados, bajo la influencia de los reguladores de crecimiento BAP y 2iP en distintas concentraciones.

La formación de los brotes estuvo siempre relacionada con zonas circundantes a las areolas y en todos los casos se observó inicialmente un hinchamiento del tejido, una coloración verde-amarillento y la presencia de una pubescencia lanosa rodeando el meristemo, posteriormente de estas zonas fueron creciendo los brotes (Fig. 8).



Figura 8. La proliferación de los brotes ocurrió a partir de las areolas las flechas indican las zonas más activas, caracterizadas por presentar una pubescencia lanosa.

De forma cualitativa cabe señalar que en general los dos reguladores de crecimiento formaron brotes con apariencia sana en la mayoría de los casos (Fig. 9 a). Se presentó hiperhidratación en brotes cultivados con altas concentraciones de los dos reguladores de crecimiento usados (10 y $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y 2iP, Fig. 9 b). De los brotes hiperhidratados se derivó en algunos casos la formación abundante de callo (Fig. 10).



Figura 9. Brotes de *N. tetetzo* formados *in vitro*: a) Brote sano formado en el grupo control, b) Brote hiperhidratado formado a partir de un explante no etiolado cultivado en BAP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

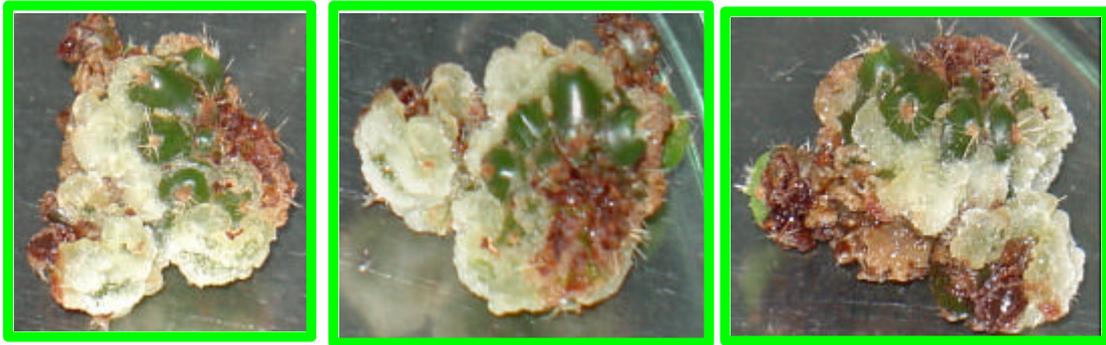


Figura 10. Brote hiperhidratado de *N. tetetzo* con formación de callo y con inicios de oxidación en parte basal y apical.

Se presentó oxidación en el tejido del brote que estaba en contacto con el medio de cultivo, lo que en algunas ocasiones enrojeció el medio. En los subcultivos fue necesario retirar el tejido dañado y enjuagar la superficie de corte con ácido cítrico ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + ácido ascórbico ($1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que ayudó a disminuir este fenómeno (Fig. 11).



Figura 11. Brotes de *N. tetetzo* formados a partir de explantes no etiolados cultivados el primero en BAP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y el segundo y tercero en 2iP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) que presentan oxidación.

Cuando los cultivos se mantuvieron sobre el medio con citocininas, secundariamente ocurrió la proliferación de nuevos brotes formados de areolas de los brotes primarios. Este proceso mantuvo los cultivos en continua proliferación indefinidamente.

7.3 Enraizamiento

La formación de raíces ocurrió en plantas originadas de los dos tipos de explantes bajo la influencia de las citocininas 2iP y BAP a partir de la primera semana de cultivo en medio MS libre de reguladores de crecimiento (Fig. 12).

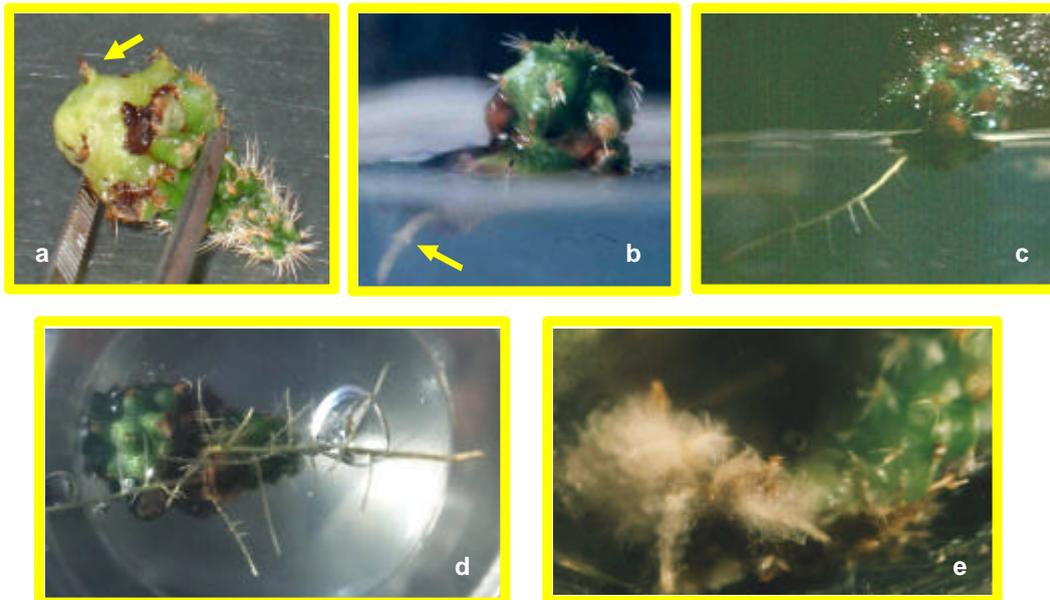


Figura 12. Enraizamiento de de *N. tetetzo*, las flechas indican la raíz. a) primordio radical; b y c) inicio de crecimiento de raíces secundarias; d y e) sistema radicular bien formado.

Las plantas del grupo control originadas de explantes no etiolados tuvieron una frecuencia de enraizamiento menor (de hasta un 20%) en comparación con las plantas del grupo control originadas a partir de explantes etiolados (Fig. 13 y 14).

Con el regulador 2iP la respuesta fue variable, indujo una frecuencia de enraizamiento superior al grupo control (sin significancia estadística) en las concentraciones más bajas (1 y 5 mg·L⁻¹) y esta disminuyó con concentraciones altas (10 y 15 mg·L⁻¹).

En cambio, el regulador BAP redujo la frecuencia de enraizamiento de forma constante con todas las concentraciones probadas respecto al grupo control (Fig. 13).

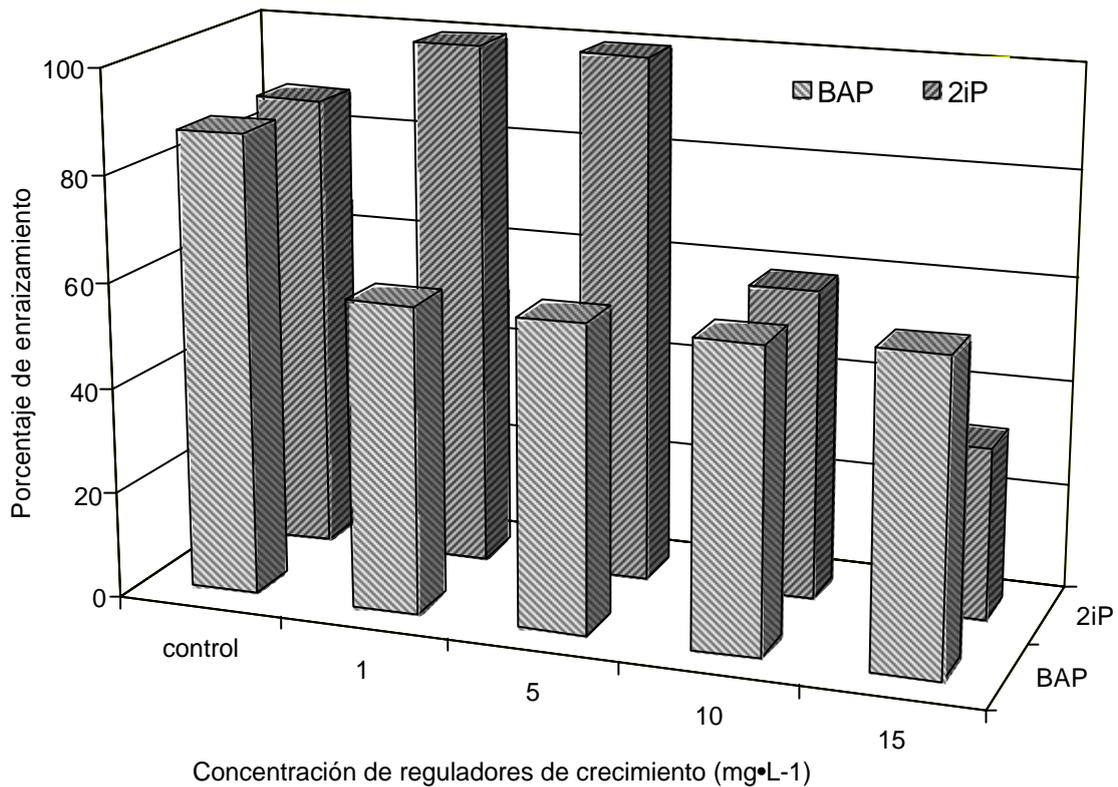


Figura 13. Porcentaje de enraizamiento en MS sin reguladores de crecimiento de plántulas formadas a partir de explantes no etiolados.

El mayor porcentaje de enraizamiento ocurrió en plantas derivadas de tratamiento con 2iP de explantes etiolados. Las plantas formadas en BAP (1 mg·L⁻¹) presentaron una frecuencia de enraizamiento inferior al grupo control. En el resto de concentraciones (5, 10 y 15 mg·L⁻¹) no se presentan datos de enraizamiento debido a que no hubo proliferación de brotes (Fig. 14).

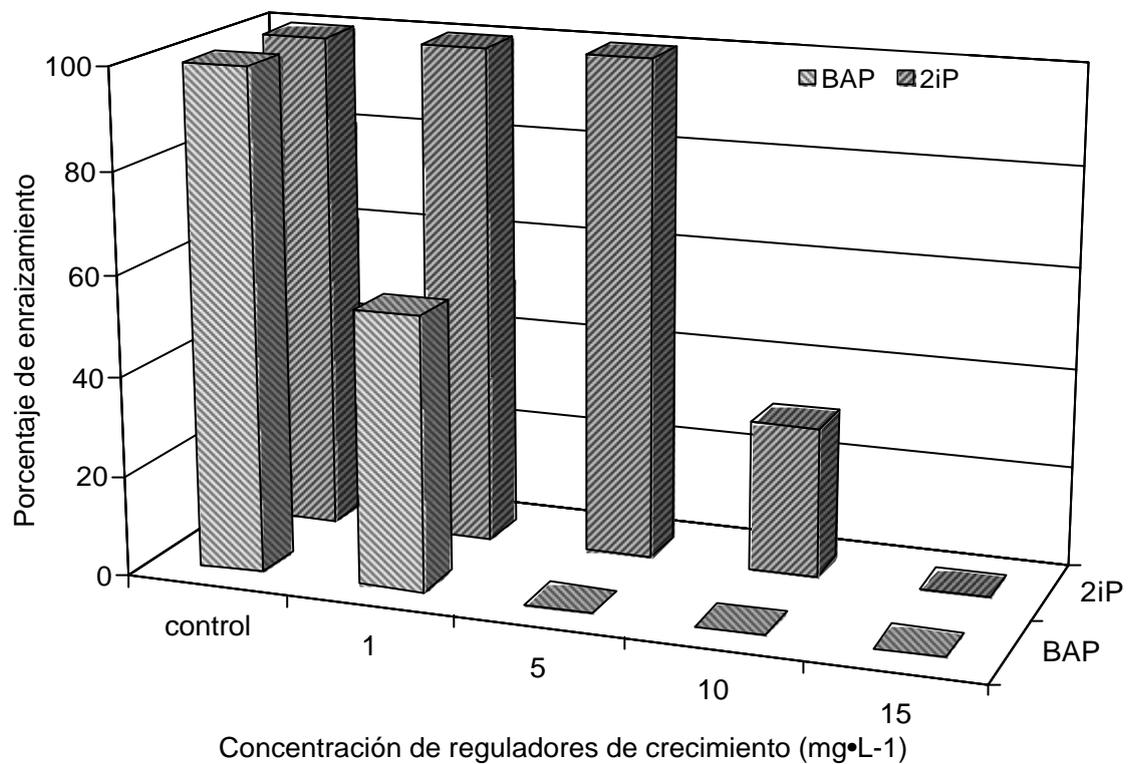


Figura 14. Porcentaje de enraizamiento en MS sin reguladores de crecimiento de plántulas formadas a partir de explantes etiolados.

Después de que emergió la radícula, se mantuvieron las plantas en medio MS sin reguladores de crecimiento, para que se desarrollaran las raíces secundarias, se requirió aproximadamente de un mes de cultivo (Fig. 15).



Figura 15. Plantas de *N. tetetzo* enraizadas *in vitro* formadas a partir de explantes no etiolados con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2iP.

7.4 Aclimatización

Se logró aclimatizar a las plantas formadas con los dos tipos de explante bajo la influencia de ambos reguladores de crecimiento. Posteriormente se establecieron en invernadero (Fig. 18).

En general las plantas formadas de explantes no etiolados con BAP presentaron una sobrevivencia ligeramente mayor que las originadas en 2iP, sin embargo en las plantas derivadas de la concentración con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ambos reguladores de crecimiento la sobrevivencia fue menor respecto al grupo control (Fig. 16).

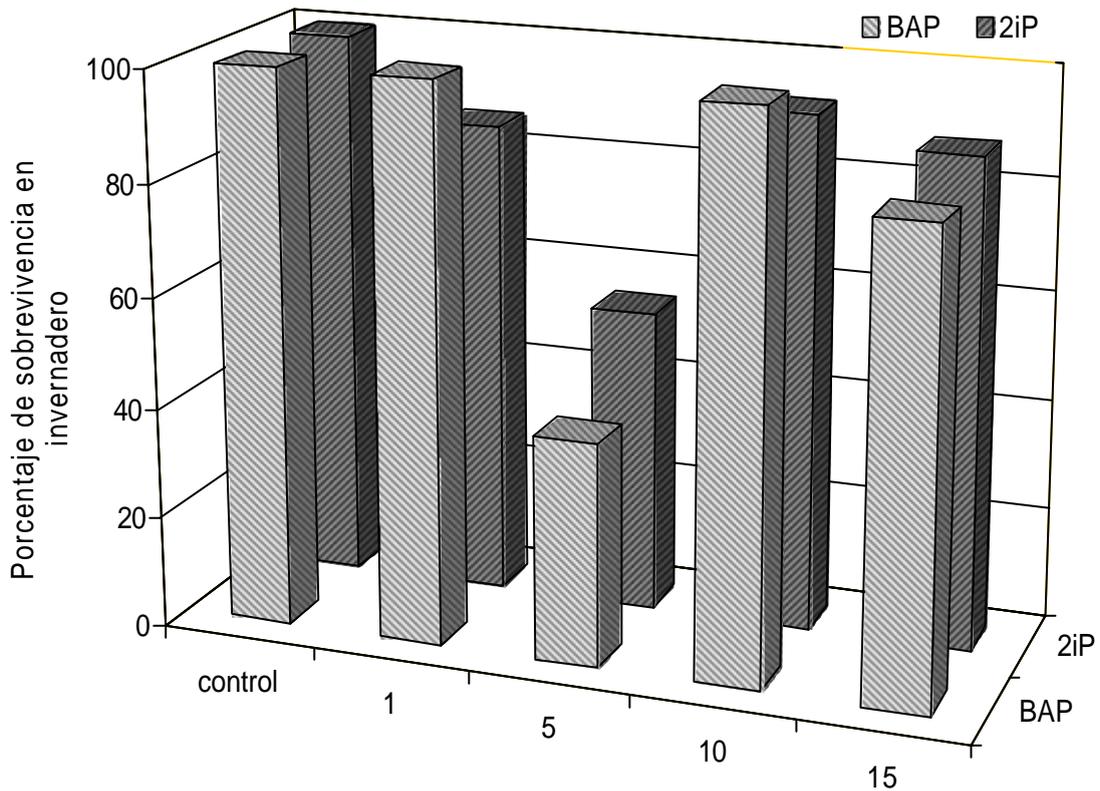


Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas en invernadero originadas a partir de explantes no etiolados.

Las plantas originadas a partir de explantes etiolados tuvieron un 100% de sobrevivencia en invernadero; las barras que muestran cero son porque no se formaron previamente brotes con estas concentraciones (Fig. 17).

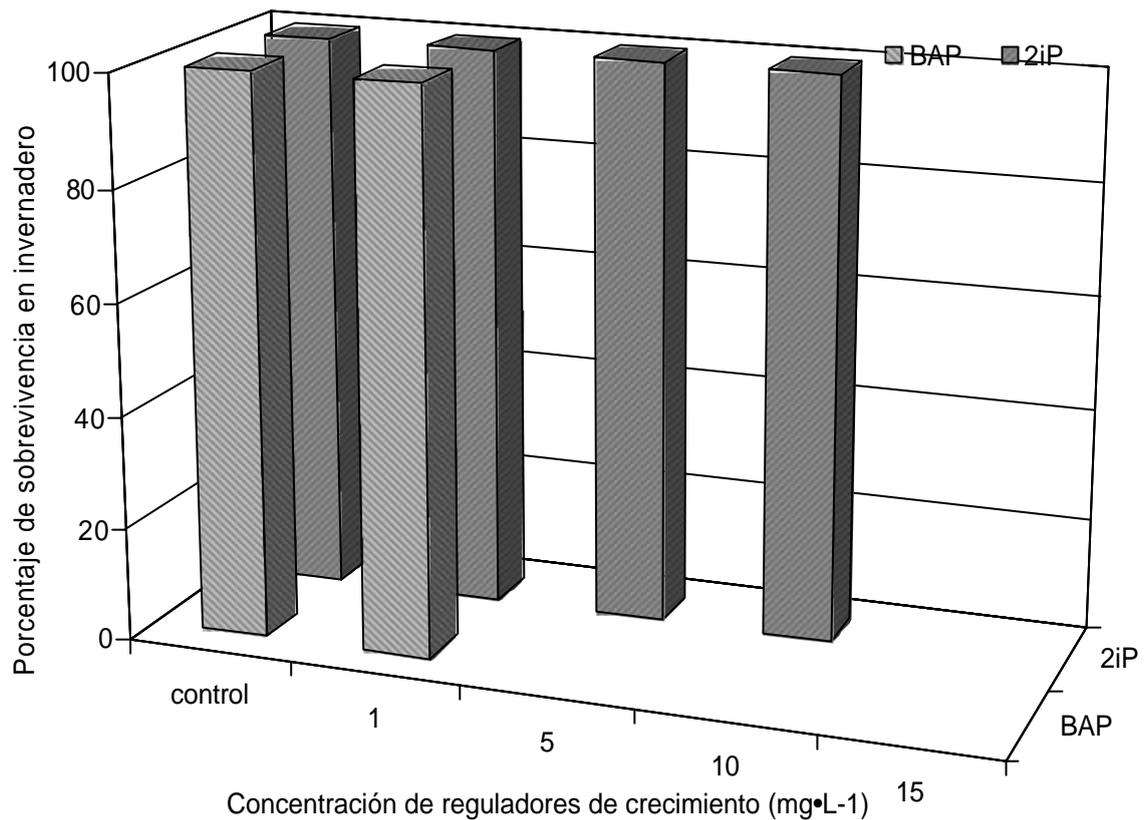


Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas en invernadero originadas a partir de explantes etiolados.

Se estableció un lote de 355 plantas en invernadero, las cuales sobrevivió el 89%. Se eligieron 80 organismos para ser donados al Jardín Botánico “Helia Bravo Hollis” en Zapotitlán Salinas, Puebla. Diez plantas fueron reintroducidas dentro del mismo jardín bajo la copa de plantas nodriza como *Mimosa luisiana*, *Parkinsonia praecoxy* y *Prosopis laevigata*.



Fig. 18. Plantas de *Neobuxbaumia tetetzo* en condiciones de invernadero. a-b Plantas en frasco recién descubiertas de la tapa plástica. c-f plantas en charolas con tierra-arena (1:1).

Tres meses después de la donación y reintroducción de la especie se encontró que todas las plantas donadas han sobrevivido y su crecimiento ha continuado, siendo relativamente más rápido en comparación con plantas cultivadas a partir de semilla en el vivero de la localidad, las cuales son escasamente mayores y tienen 10 años de edad. De las plantas que fueron reintroducidas 8 han sobrevivido, una murió y otra fue depredada. Probablemente estén sometidas a algún estrés, ya que su crecimiento ha sido más lento. En la figura 19 se muestran plantas donadas y reintroducidas en el Jardín Botánico de Zapotitlán Salinas, las cuales tienen una talla aproximada de 10 cm.



Figura 19. *Neobuxbaumia tetetzo*; a-c) Plantas propagadas *in vitro* de dos años de edad donadas al Jardín Botánico “Helia Bravo Hollis” después de tres meses. d-f) plantas propagadas *in vitro* de dos años de edad después de tres meses de ser reintroducidas en su hábitat. g-i) Plantas del Jardín Botánico con diez años de edad propagadas a partir de semilla.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estableció una vía de micropropagación para *Neobuxbaumia tetetzo*, que puede ayudar a su conservación *ex situ*. Para esto se probó el efecto de la etiolación y de reguladores de crecimiento sobre el desarrollo y crecimiento de explantes *in vitro*.

La etiolación es definida como la exclusión parcial o total de luz en las plantas. Esta condición a menudo fuerza el crecimiento de nuevos brotes activando las yemas axilares (Flores-León y Ortiz-Montiel, 1999). En este trabajo la etiolación tuvo un efecto negativo en el desarrollo de los explantes de *Neobuxbaumia tetetzo*, ya que la mayoría murió o formó callo y fue mínima la producción de brotes a diferencia de explantes no etiolados en los cuales se presentó una proliferación de brotes mayor. Estos resultados contrastan con los trabajos realizados con *Rhipsalidopsis rosea* (Garrido, 1998), *Cephalocereus senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 1999) y *Mammillaria conspicua* (Fuentes y Martínez, 2000); donde un periodo de etiolación previo al cultivo de tejidos activó las areolas y se estimuló la formación de brotes múltiples. Esta diferencia con las especies antes mencionadas posiblemente se deba a que *N. tetetzo* en oscuridad produjo un exceso de auxinas endógenas (Clayton y cols. 1999; Hubstemberger y cols. 1992); y se sabe que cuando se adicionan auxinas exógenas en concentraciones mayores a 10 μM se inhibe la organogénesis, estimulándose la producción de callo (Pierik, 1990; Salisbury y Ross, 1992). Otra razón a la que se podría atribuir esta diferencia en los resultados es que dichos autores trabajaron con plantas adultas provenientes del campo como donadoras de explantes y en el presente trabajo se utilizaron plántulas germinadas *in vitro*, las cuales son más sensibles al efecto de los reguladores de crecimiento vegetal. Vískot y Jára (1984) mencionan que la edad del explante influye significativamente en su capacidad regenerativa.

La etiolación produjo la formación de callo en su mayoría de tipo no organogénico (no formó brotes o raíces), esta respuesta parece ser muy común en muchas especies de cactáceas como lo demuestran los trabajos con *Echinocactus grusonii*, *Rhipsalidopsis rosea*, *Sulcorebutia alba*, *Coryphantha*

elefantidens, *Cephalocereus senilis*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia polyacantha* (Anicua y Rivas, 2000; Garrido, 1998; Pierik, 1987a; Bhau y cols. 1999; Corona y Yáñez, 1984; Johnson y Emimo, 1979) y solamente algunas especies como *Mammillaria carmenae*, *M. bocasana* (Anicua y Rivas, 2000) y *Selenicereus magalanthus* (Pelah y cols. 2002) han producido callos de tipo organogénico. Sin embargo, el callo mostró ser sumamente sensible a la manipulación y presentó oxidación después del subcultivo y posteriormente se desarrolló la necrosis del tejido.

En un ensayo aislado se incubó callo en puente de papel con BAP ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dando como resultado la formación de un brote; esto sugiere que se podrían cultivar por esta vía donde no están en contacto directo con el medio, lo cual al parecer es un factor que disminuye la oxidación del callo (Garrido, 1998). Sin embargo, la organogénesis indirecta presenta desventajas en el cultivo de tejidos, ya que puede causar mutaciones en la planta (George, 1993).

Las citocininas favorecieron la proliferación de brotes en ambos tipos de explante, la organogénesis fue directa en la mayoría de los casos y ocurrió a partir de las areolas. El regulador de crecimiento que originó el mayor número de brotes (15 por explante) fue 2iP ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo cual se asemeja a la micropropagación de *M. conspicua* (Fuentes y Martínez, 2000), donde se obtuvo la mejor proliferación de brotes con este mismo regulador de crecimiento con 10 y $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El número de brotes formados fue directamente proporcional a la concentración de los reguladores de crecimiento; Pierik (1987a) menciona que las citocininas son esenciales para la activación areolar, ya que rompen la dominancia apical y activan las yemas axilares promoviendo la citocinesis de las células; además influyen en el crecimiento y desarrollo vegetal (Salisbury y Ross, 1992).

El regulador de crecimiento BAP indujo una producción de brotes menor que 2iP, pero mayor formación de callo; Mauseth (1977) menciona que BAP estimula el crecimiento de callo en cactáceas pero sin diferenciación de brotes, sin embargo, en *N. tetetzo* se presentaron ambos tipos de respuesta y en algunos casos nuevos brotes a partir del callo. BAP es el regulador de

crecimiento que se emplea con mayor frecuencia en el cultivo de tejidos de cactáceas; sin embargo, en esta especie 2iP mostró un efecto superior en la organogénesis.

N. tetetzo en el grupo control formó brotes, aunque estos se formaron con mayor lentitud y en un número muy reducido comparado con los tratamientos con reguladores de crecimiento; probablemente los explantes contenían citocininas endógenas en concentraciones suficientes para la organogénesis (Escobar y cols. 1986) o posiblemente, sólo se debió al efecto estimulador de la herida, el cual se sabe induce la formación de nuevos brotes (Mauseth y Halperin, 1975).

Los brotes formados al ser separados y subcultivados exhibieron oxidación en la superficie del corte, esta respuesta aumentó considerablemente con la concentración de citocinina en el medio de cultivo. Este evento fue disminuido cuando los tejidos fueron inmersos en antioxidante ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico + $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico). En el cultivo de tejidos se ha comprobado que el uso de antioxidantes ayuda a reducir problemas de oxidación (George, 1993).

La oxidación es un problema muy frecuente en el cultivo de tejidos de cactáceas (Vyskot y Jára, 1984; Ault y Blackmon, 1987 y Clayton y cols. 1990), este fenómeno es debido al daño ocasionado a las células cuando son cortados los explantes y en respuesta, éstas liberan sustancias fenólicas al medio de cultivo, las cuales son oxidadas ocasionando senescencia en los tejidos (Corona y Yáñez, 1984). Steinhar (1962) propone que la oxidación se debe a las polifenol oxidasas que en algunos tejidos se encuentran relacionadas con la tirosina y altos niveles de sacarosa; la oxidación en los tejidos también es un indicador de estrés físico por la disección que cada especie presenta (Johnson y Emino, 1979). En el grupo control se presentaron problemas de oxidación ocasionalmente, lo cual sugiere que los reguladores de crecimiento incrementan esta respuesta fisiológica. Otra posible causa es la acumulación de etileno en el frasco de cultivo (Salisbury y Ross, 1992),

utilizando un sistema de cultivo abierto se favorece el intercambio gaseoso y esto podría disminuir la oxidación de los tejidos.

Otro problema que se presentó en la propagación de esta especie fue la hiperhidratación de los brotes cuando se cultivaron con altas concentraciones de citocininas (10 y 15 mg·L⁻¹). Los brotes hiperhidratados se caracterizan por presentar una desorganización de sus tejidos normales, ausencia de ceras epicuticulares y presencia de células hipertrofiadas (Leshem, 1988), la apariencia es vítrea, sus tallos son gruesos y rígidos, presentan un contenido inferior de proteínas y clorofila y un contenido mayor de agua (Böttcher, 1988). Los principales factores que influyen en la hiperhidratación son la disponibilidad de agua en el medio de cultivo, la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento, exceso de carbohidratos y minerales y baja intensidad lumínica (Tran Thann Van, 1981; Dabekaussen y cols. 1991; Ziv, 1991). Las citocininas ablandan la pared celular haciéndola más permeable y permitiendo el paso de agua al interior de la planta (Salisbury y Ross, 1992). Una explicación más de este fenómeno es que el exceso de etileno en la atmósfera de las plantas *in vitro* estresadas inhibe su propia biosíntesis, reduciendo la actividad de las peroxidasas ácidas y esto obstaculiza el proceso de lignificación (Mc Dougall, 1992; Zamorano, 1989). La lignina y la celulosa juegan un papel importante en la formación de la pared celular haciéndola más rígida, por lo que su deficiencia (niveles bajos de peroxidasas) permite una mayor absorción de agua debido a la reducida presión de la pared, ocasionando las malformaciones típicas de una planta hiperhidratada (Kevers, 1984).

Hubstenberger y cols. (1992) reportan que incubando los cultivos a 29 °C con luz ininterrumpida fluorescente e incandescente a 150 μmoles m⁻² s⁻¹ la hiperhidratación es eliminada virtualmente. En este trabajo se utilizó una irradiación de 35 μmoles m⁻² s⁻¹ y 35 °C, sin embargo, algunas plantas de *N. tetetzo* fueron capaces de recuperarse de este fenómeno hiperhídrico, en otros casos se presentó la formación de callo y este posteriormente se perdió por oxidación lo cual es semejante con lo reportado por Ault y Blackmon (1987) quienes obtuvieron en sus cultivos de *Ferocactus acanthodes* brotes normales y anormales. Los segundos crecieron rápidamente, fueron blandos e

invariablemente produjeron callo, por lo que no fueron útiles para propósitos de propagación.

La hiperhidratación es un patrón de crecimiento anormal que presenta un serio problema en el cultivo de tejidos debido a que limita el éxito de muchos sistemas de micropropagación, pues aunque no reduce el número de brotes producidos puede impedir su enraizamiento y sobrevivencia *ex vitro* (Ziv, 1991); sin embargo, las plantas de *N. tetetzo* que se recuperaron de este problema continuaron con su desarrollo normal, enraizando y estableciéndose en invernadero. La hiperhidratación puede ser controlada con el uso de altas concentraciones de agar ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para disminuir la disponibilidad de agua en el medio y disminuyendo la concentración de reguladores de crecimiento.

Una vez que terminó la fase de proliferación, los brotes comenzaron a enraizar, algunos lo hicieron sobre el medio que contenía citocininas, pero en la mayoría de los casos fue necesario realizar un subcultivo a MS libre de reguladores de crecimiento. Se obtuvo un 75% de enraizamiento y no fue necesaria la adición de auxinas exógenas para inducir esta respuesta; esto coincide con otras cactáceas como *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon, 1987), *Opuntia polyacantha* y *Astrophytum myriostigma* (Jiménez y cols. 2001) donde el enraizamiento ocurrió de manera espontánea al cultivarse sobre MS sin hormonas. Esto puede deberse a que muchas cactáceas aparentemente tienen la capacidad de producir altas concentraciones de auxinas *in vitro* y este hecho favorece la inducción de la raíz.

Altas concentraciones de citocininas usadas para la proliferación de brotes afectan la inducción de raíz (Rubluo y cols. 2002), esto se observó con los brotes de *N. tetetzo* producidos en 10 y $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de citocininas, los cuales tardaron más tiempo en enraizar, incluso en algunos casos sólo se originaron raíces cuando la planta se cultivo en medio MS libre de reguladores de crecimiento.

La formación de raíz se origina porque durante el periodo de estrés hídrico, la mayoría de las cactáceas propagadas *in vitro* son capaces de producir raíces

adventicias a partir del tejido vascular. Las concentraciones de sales, sacarosa y agar pueden ocasionar este estrés hídrico (Mauseth y Halperin, 1975) y probablemente este fenómeno se presentó en los brotes de *N. tetetzo*.

Diversas investigaciones sobre micropropagación de cactáceas se encuentran en la literatura, pero la fase de aclimatización de las plantas obtenidas, como la propone Debergh (1991), no siempre se reporta, y en algunos casos esta puede ser crítica. Sin embargo, para propósitos de conservación es crucial que las plantas micropropagadas sean reestablecidas en campo y completen su ciclo de vida (Rubluo y cols. 1993).

Durante la transferencia a suelo existe la posibilidad de pérdida de plantas debido a que estas se enfrentan a condiciones difíciles como mayor irradiación lumínica y menor aporte nutricional y humedad relativa. Además se sabe que las plantas obtenidas por cultivo de tejidos presentan características diferentes a aquellas de campo, las cuales dificultan su establecimiento en invernadero. Una de las principales carencias de plantas derivadas *in vitro* es su bajo contenido de ceras epicuticulares, lo cual es la principal causa para su desecación (Malda y cols. 1999a). Sin embargo, debido al metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) las cactáceas cierran sus estomas durante el día para evitar la pérdida de agua por evaporación y solo los abren por la noche para captar dióxido de carbono; esto es un factor importante que les permite aclimatizarse *ex vitro*.

Para ciertas especies de cactáceas, la aclimatización parece no ser una etapa crítica, esto lo han demostrado diversos autores como Vyskot y Jára (1984), Ault y Blackmon (1987), Rubluo y cols. (1993), Anicua y Rivas (1998), Balch y cols. (1998), Bhau (1999), Malda y cols. (1999a), Malda y cols. (1999b), Flores-León y Ortiz-Montiel (1999), Papafotiou y cols. (2001), Jiménez y cols. (2001), Rubluo y cols. (2002), Giusti y cols. (2002), Pérez-Molphe-Balch y cols. (2002), Pelah y cols. (2002) quienes han obtenido porcentajes de sobrevivencia en invernadero superiores al 80%, lo cual es muy similar a lo observado con *N. tetetzo* quien presentó un 89 % de sobrevivencia después de 5 meses de

cultivo en invernadero, las plantas fueron tomando una coloración verde más intensa y se observó un engrosamiento en el tallo.

En relación con el establecimiento de la especie en invernadero se logró establecer un lote de 300 plantas de *N. tetetzo* en el invernadero de la FES Iztacala, de las cuales se donaron 80 al Jardín Botánico “Helia Bravo Hollis” de Zapotitlán Salinas, Puebla. Además se realizó la reintroducción de 10 ejemplares a su hábitat natural, buscando la asociación con *Prosopis laevigata*, *Mimosa luisiana* y *Parkinsonia praecox*, ya que estas plantas actúan como nodrizas generando un microclima con menor intensidad lumínica y mayor humedad que favorecen la sobrevivencia de la cactácea. Después de tres meses las plantas han sobrevivido, lo cual hace pensar que es posible su reintroducción a gran escala.

Algunas alternativas que podrían probarse para mejorar la micropropagación de esta especie son el probar otros reguladores de crecimiento en la fase de proliferación, como la cinetina que ha sido probada para otras especies como *Sulcorebutia alba* (Pierik, 1987a) y *Lophophora williamsii* (Ortíz-Montiel y Alcántara, 1997) dando buenos resultados; el cultivo de callos es una opción que falta por estudiar, en este trabajo se probó la incubación sobre puente de papel y se obtuvo la formación de un brote, lo cual indica una posible ruta para el cultivo de callos que pueden formar un mayor número de brotes para una propagación masiva de la especie. También podrían hacerse algunas modificaciones al cultivo para evitar problemas como la oxidación y la hiperhidratación, estas modificaciones pueden ser aumento de la intensidad lumínica, aumentar la concentración de agar en el medio de cultivo, utilizar tapas con filtros que permitan el intercambio gaseoso.

La propagación *in vitro* de *N. tetetzo* es factible y puede contribuir en su conservación *ex situ*, manteniéndose colecciones en jardines botánicos con fines de educación e investigación, así como realizarse la reintroducción de la especie, ya que es clave en las comunidades donde habita. Además localmente se vende como planta de ornato, y esto representa un ingreso económico para la comunidad de Zapotitlán Salinas.

9. CONCLUSIONES

La etiolación no favorece la proliferación de brotes en la micropropagación de *Neobuxbaumia tetetzo* bajo las condiciones de cultivo probadas.

Las citocininas 2iP y BAP inducen la formación de brotes y ésta es directamente proporcional a su concentración en el medio de cultivo.

La citocinina que formó el mayor número de brotes fue 2iP en la concentración de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se presentó la formación de raíz cuando los brotes se subcultivaron sobre medio MS libre de reguladores de crecimiento.

La aclimatización no fue una fase crítica para la especie, ya que posteriormente a esta etapa logró establecerse exitosamente en invernadero.

La micropropagación de *N. tetetzo* bajo las condiciones hasta ahora probadas es factible a gran escala y resulta una herramienta de gran utilidad en proyectos de restauración para la reintroducción de la especie al hábitat natural.

10. REFERENCIAS

- Anderson, E. F. 2001. **The Cactus Family**. Timber Press inc. USA. pp. 476 – 479.
- Anicua, F. J. y Rivas, B. R. V., 2000. **Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*)**. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM.
- Ault, J. R. y Blackmon, W. J. 1987. ***In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae)**. Hort Science 22(1): 126 – 127.
- Bhau, B. S. 1999. **Regeneration of *Coryphantha elephantides* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants**. Scientia Horticulturae 81: 337 – 344.
- Böttcher, K., Zoglauer, K. y Göring, H. 1988. **Induction and revision of vitrification of plants cultured *in vitro***. Physiol. Plant. 72: 560 – 564.
- Casas, A. 2002. **Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas**. Biodiversitas 40: 18 – 22.
- Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips, G. C. y Butler-Nance, S. A. 1990. **Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae**. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 (2): 337 – 343.
- CONABIO, 1997. **Suculentas mexicanas. Cactáceas**. Publicaciones S. A. de C: V.; México pp.10.
- Corona, N. E. V. y Yáñez, L. 1984. **Propagación de *Cephalocereus seniles* mediante cultivo de tejidos**. Cactáceas y Suculentas Mexicanas XXIX: 3 – 7.

- Corona, N. E. V. y Chávez-Ávila, V. M. 1982. **Cultivo de Cactáceas en Medios Asépticos**. Cactáceas y Suculentas Mexicanas XXVII: 17 – 23.
- Dabekaussen, M. A. A., Pierik, R. L. M., Van der Laken, J. D. y Hoek Spaans, J. 1991. **Factors affecting areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Raush**. Scientia Horticulturae 46: 283 – 294.
- Dávila, A. P., Villaseñor, R. J., Medina, L., Ramírez, R., Salinas, T., Sánchez-Ken, J. y Tenorio, L. 1993. **Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán**. Listados florísticos de México. Instituto de Biología, UNAM.
- Debergh, P. C. 1991. **Aclimatization techniques of plants *in vitro***. Acta Horticulturae. Plant Biotechnology. 289: 291 – 300.
- Escobar, H. A., Villalobos, V. M. y Villegas, A. 1986. ***Opuntia* micropropagation by axillary proliferation**. Plant cell, tissue and organ culture. 7: 269 – 277.
- Esparza, O. L. y Valverde, V. M. T. 2001. **Demografía comparativa de tres especies de cactáceas columnares (*Neobuxbaumia*) con diferentes niveles de rareza**. XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Flores-León, R. y Ortiz-Montiel, G. 1999. ***In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) (Pfeiffer) through areole activation of etiolated plants**. Haseltonia 7: 1 – 5.
- Fuentes, M. y Martínez, M. N. M. 2001. **Micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de areolas activadas *in vivo* por etiolación**. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM.
- García-Suárez, J. A., Lechuga-Corchado y Serrano, H. 1995. **Propagación de cactáceas por cultivo de tejidos**. II Simposio Productos Naturales: Un

enfoque Biotecnológico. Biotecnología Vegetal, UAM Iztapalapa. México, D. F. 179 – 183.

Garrido, G. M. I. 1998. **Evaluación del metabolismo ácido de las crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatación a suelo.** Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala, UNAM.

George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture.** 2nd Edition. Exegetics Lmtd. Great Britain.

Giusti, P. D., Vitti, F., Fiocchetti, G., Colla, F. y Saccardo, M. T. 2002. **In vitro propagation of three endangered cactus species.** Scientia Horticulturae 95: 319 – 332.

Glass, C. y Foster, R. 1979. ***Neobuxbaumia* Backeberg emend. Dawson & Buxbaum in Krainz.** Cactus & Succulent Journal 51: 288 – 289.

Godínez-Álvarez, H., Valiente-Banuet, A. y Valiente, B. L. 1999. **Biotic interactions and the population dynamics of the long-lived columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* in the Tehuacán Valley, Mexico.** Can. J. Bot. 77: 203 – 208.

Godínez-Álvarez, H. y Valiente-Banuet, A. 1998. **Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth.** Journal of Arid Enviroments 39: 21 – 31.

Hartman, H. T. 1975. **Propagación de Plantas. Principios y Prácticas.** Prentice-Hall. México.

Hubstenberger, J. F., Clayton, P. W. y Phillips, G. C. 1992. **Micropropagation of Cacti (Cactaceae).** Biotechnology in Agriculture and Forestry 20: 49 – 67.

- Jiménez, R. J. A., Mata, R. M. y Chávez, A. V. M. 2001. **Micropropagación de *Astrophytum myriostigma* Lem.** XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Johnson, J. L. y Emino, E. R. 1979. **Tissue culture propagation in the Cactaceae.** Cactus & Succulent Journal. 51: 275 – 277.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Guillès, M.-F. y Gaspar, Th. 1984. **Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro.** Physiol. Plant. 61: 69 – 74.
- Leshem, M., Shaley, D. P. y Izhar, S. 1988. **Citokinin as an Inducer of Vitrification in Melon.** Annals of Botany 61: 255 – 260.
- Malda, G., Suzán, H. y Backhaus, R. 1999a. **In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism.** Scientia Horticulturae 81: 71 – 87.
- Malda, G., Backhaus, A. R y Martin, C. 1999b. **Alterations in growth and crassulacean metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 1 – 9.
- Mauseth, J. D. 1979. **A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds.** Cactus & Succulent Journal 51: 186 – 187.
- Mauseth, J. D. 1977. **Cactus tissue culture: A potential method of propagation.** Cactus and Succulent Journal (U. S.) 49: 80 – 81.
- Mauseth, J. D. y Halperin, W. 1975. **Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae).** Amer. J. Bot. 62 (8): 869 – 877.
- Mc Dougall, 1992. **Changes in Cell-Wall-Associated peroxidase during the lignification of flax fibers.** Phytochemistry. 31 (10): 3385 – 3389.

- Ortíz-Montiel, J. G. y Alcántara, G. R. 1997. **Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter).** Cactáceas y Suculentas Mexicanas XLII 3 – 6.
- Papafotiou, M., Balotis, G. N., Panayiotou, T. L. y Chronopoulos, J. 2001. ***In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 163 – 167.
- Pelah, D., Kaushik, R. A., Mizrahi, Y. y Sitrit, Y. 2002. **Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 81 – 84.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M. E., Dávila-Figueroa, C. A. y Villalobos-Amador, E. (2002). ***In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert.** Hort Science 37 (4): 693 – 696.
- Pérez, M. B. E., Pérez, R. M. E., Villalobos, A., Meza, R., Morenes, R. y Lizalde, V. H. 1998. **Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation.** In Vitro Cell. Dev. Biol. 34: 131 – 135.
- Pierik, R. L. M. 1990. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** 3ª. Edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España.
- Pierik, R. L. M., Dessens, J. T. y Van Der Zeeuw, E. J. 1987a. **Activation of *in vitro* cultured areoles of the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch.** Acta Botánica Neerl. 36: 334.
- Ramírez, P. C. A. y Valverde, V. M. T. 2001. **Germinación de semillas de tres especies de *Neobuxbaumia* que difieren en su nivel de rareza.** XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Rojas-Aréchiga, M. y Vázquez-Yanes, C. 2000 **Cactus seed germination: a review.** Journal of Arid Enviroments 44: 85 – 104.

- Rojas-Aréchiga, M., Orozco-Segovia, A. y Vázquez-Yanes, C. 1997 **Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México.** Journal of Arid Enviroments 36: 571 – 578.
- Rubluo, A., Marín-Hernández, T., Duval, K., Vargas, A. y Márquez-Guzmán, J. 2002. **Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae).** Scientia Horticulturae 95: 341 – 349.
- Rubluo, A., Chávez, V., Martínez, A. P. y Martínez Vázquez, O. 1993. **Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture.** Biological Conservation 63: 163 – 169.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 1992. **Fisiología Vegetal.** Grupo Editorial Iberoamericana. México, D. F.
- SEMARNAT, 2003. **Especies con usos no maderables en bosques tropicales y subtropicales en los Estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.** [en línea][2003, 22 octubre] disponible en: http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/neobuxbaumia_tetetzo.
- Steinhart, C. R. 1962. **Tissue culture of a cactus.** Science. 137 (3529): 545 – 546.
- Tran Thanh Van, M. K. 1981. **Control of morphogenesis in *in vitro* cultures.** Ann. Rev. Plant. Physiol. 32: 291 – 311.
- UBIPRO, 2001. **Informe Anual del Proyecto General: Evaluación del Deterioro Ambiental, Restauración, Conservación Ecológica y Manejo Sustentable de Recursos Naturales en la Subcuenca Baja de Zapotitlán de las Salinas, Puebla.** Reunión de Asesores Académicos y Profesores; Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos. Manuscrito. FES-Iztacala, UNAM; pp. 55.

- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M., Villaseñor J. L. y Ortega, R. J. 2000. **La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.** Boletín de la Sociedad Botánica de México 67: 24 – 74.
- Valiente-Banuet, A. y Ezcurra, E. 1991. **Shade as cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisiana* in the Tehuacán Valley, México.** Journal of Ecology 79: 961 – 971.
- Vite, F., Portilla, E., Zavala-Hurtado, J. A., Valverde, P. L. y Díaz-Solis, A. 1996. **A natural hybrid population between *Neobuxbaumia tetetzo* and *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae).** Journal of Arid Environments 32: 395 – 405.
- Vyskot, B. B. y Jára, Z. 1984. **Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro.** Journal of Horticultural Science 59: 449 – 452.
- Zamorano, M. J. 1989. **Vitrificación de brotes de nube (*Gypsophyla paniculata* L.) en el proceso de micropropagación.** Tesis de Licenciatura. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.
- Ziv, M. 1991. **Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants.** En Debergh, P. C. y Zimmerman, R. H. **Micropropagation. Technology and Application.** Kluwer Academic Publishers. pp. 45 – 70.

11. APÉNDICE

Antecedentes Históricos

Algunos estudios enfocados a *Neobuxbaumia tetetzo* que han aportado datos sobre su taxonomía, biología y ecología se citan enseguida:

Backeberg en 1938 propuso separar al nuevo género *Neobuxbaumia*, nombrado en honor de Franz Buxbaum, incluyendo varias especies que previamente habían sido consideradas *Cephalocereus* (*Pilocereus*), *Lemaireocereus* y *Pachycereus*. Este nuevo género agrupa nueve especies (Glass, 1979 y Anderson, 2001).

Valiente-Banuet y Ezcurra (1991) analizaron la germinación y sobrevivencia de *N. tetetzo* bajo diferentes condiciones ambientales para determinar los principales mecanismos de asociación y establecimiento de las plántulas bajo la copa de *Mimosa luisiana*. Ellos encontraron que el efecto de planta-nodrizza entre la cactácea y el arbusto es el resultado de una diferencia de la sobrevivencia en los micrositos sombreados con menor radiación solar.

Vite y colaboradores (1996) propusieron un posible híbrido natural entre *N. tetetzo* y *Cephalocereus columna-trajani* en el Valle de Zapotitlán Salinas. En su análisis concluyen que la ocurrencia híbrida es apoyada por criterios morfométricos, y reforzada por el hecho de que los híbridos solo se encuentran en un área restringida donde las especies parentales pueden llegar a ser simpátricas.

Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet (1998) analizaron los efectos de la temperatura, imbibición y escarificación ácida y mecánica sobre la germinación de ocho especies de cactáceas, entre ellas *N. tetetzo*, simulando las diferencias de temperatura presentes bajo arbustos y en espacios abiertos, así como el efecto de la ingestión de semillas por aves o murciélagos. Los autores observaron que la germinación de *N. tetetzo* no es afectada por la ingestión de

semillas, por lo tanto el papel principal de los consumidores es la dispersión de estas. Lo anterior sugiere que la humedad del suelo y las modificaciones microambientales producidas por la planta nodriza juegan papeles primarios en la germinación y establecimiento de la cactácea.

Rojas-Aréchiga y colaboradores (1997) compararon la germinación de siete especies de cactáceas con cuatro tratamientos de luz y observaron que las cactáceas globosas como *Ferocactus robustus* requieren condiciones de luz para su germinación, por lo que tienen un fotoblastismo positivo; en cambio las cactáceas columnares como *N. tetetzo* presentan indiferencia a la luz, ya que puede germinar en presencia de luz o en oscuridad total.

Ramírez y Valverde (2001) estudiaron la germinación de *N. macrocephala*, *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis*, observando que las características germinativas de estas especies actúan como limitantes en su distribución y abundancia.

Esparza y Valverde (2001) realizaron un estudio demográfico comparativo de las tres especies de *Neobuxbaumia* presentes en el Valle de Tehuacán. Los resultados sugieren que posiblemente, a nivel de germinación, existen limitaciones por restricción de hábitat.

Godínez-Álvarez y colaboradores (1999) elaboraron un análisis de elasticidad para determinar las interacciones bióticas y las dinámicas de población de *N. tetetzo*. Reportan en este trabajo que esta cactácea presenta una alta mortalidad en las categorías juveniles, y decrece en las etapas adultas. Durante las fases iniciales del ciclo de vida su asociación a plantas nodriza enfatiza el papel de aves y murciélagos en la dispersión de semillas así como el papel de las interacciones positivas sobre la dinámica poblacional de las cactáceas.

Abreviaturas Utilizadas

| | |
|------------|-------------------------------------------------------------|
| ANA..... | Ácido naftalenacético |
| AIA..... | Ácido indolacético |
| BAP..... | Bencilaminopurina |
| CAM..... | Metabolismo ácido de las crasuláceas. |
| 2,4-D..... | Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético |
| 2iP..... | 6- (γ , γ – dimetilalilamino) purina |
| IBA..... | Ácido indolbutírico |
| KIN..... | Cinetina |
| MS..... | Medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog en 1962 |
| TDZ..... | Thidiazuron |

Glosario

Aclimatización: Es el término que propone Debergh (1991) para definir el proceso de adaptación *ex vitro* de las plantas micropropagadas. La diferencia entre aclimatación y aclimatización, es que el primero denota el proceso mediante el cual, las plantas u otros organismos se ajustan o adaptan a un nuevo clima o situación como resultado de un proceso natural. La aclimatización implica la intervención del humano, guiando el proceso de ajustamiento.

Adventicio: Desarrollo de órganos (raíces, yemas, vástagos, flores, etc.) o embriones, a partir de zonas poco usuales, incluyendo callo. Si los órganos se originan a partir de las células iniciales, primordios de los órganos, o los embriones se originan a partir de cigotos, el término adventicio no puede ser usado.

Agar: Producto de origen vegetal (obtenido a partir de algas), que se utiliza para melificar medios nutritivos.

Agua destilada: Agua producida por destilación, que no contiene compuestos orgánicos o inorgánicos.

Antioxidantes: Grupo de sustancias químicas que impiden la oxidación, por ejemplo el ácido cítrico.

Areola: Yema axilar que da origen a espinas, cerdas, pelos y en algunos casos flores.

Autoclave: Aparato en el cual se esterilizan, por medio de vapor a presión, los medios nutritivos, instrumental, etc.

Auxinas: Grupo De hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación celular, y en algunos casos división celular; frecuentemente inducen la aparición de raíces adventicias e inhiben el desarrollo de yemas adventicias.

Callo: Tejido no organizado, formado por células diferenciadas y no diferenciadas, que se dividen de forma activa y que generalmente se originan en zonas dañadas (por heridas), o en cultivo de tejidos.

Citocininas: Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias. En la mayor parte de los casos bien la formación de raíces adventicias. Las citocininas disminuyen la dominancia apical.

Cultivo de tejidos: Cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas *in vitro*.

Cultivo en suspensión: Cultivo en que las células aisladas y/o agregados celulares crecen y se multiplican, suspendidos en un medio líquido.

Dominancia apical: Fenómeno por el que la yema terminal de una planta impide el crecimiento de las yemas axilares.

Explante: Porción de tejido cortado, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo.

Habitación: Fenómeno por el que, después de un número de subcultivos, las células pueden crecer sin la adición de hormonas, aunque estas eran necesarias al principio.

Hiperhidratación: Trastorno fisiológico donde las plantas tienen una apariencia vítrea, células hinchadas, etc.

Hormona: Sustancia orgánica que se produce en la planta y que a bajas concentraciones promueve el crecimiento, lo inhibe o lo modifica cuantitativamente, generalmente en un lugar diferente de donde se origina.

Inducción: Iniciación de un proceso particular, con el resultado del desarrollo de órganos (p. e. raíces, brotes, flores, etc.)

In vitro: Literalmente “en vidrio”, en tubo de ensayo, matraz, etc.

Medio nutritivo: Mezcla de sustancias sobre las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agar.