



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.)
Britton & Rose (Cactaceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

HILDA CONSUELO ZAMORA MALDONADO

TUTOR: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



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

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

"Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae)"

realizado por **Zamora Maldonado Hilda Consuelo**, con número de cuenta **095002428** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

Tutor(a)
Propietario Dra. Ana Laura López Escamilla

Suplente Biól. Laura Patricia Olgún Santos

Suplente Dra. Margarita Collazo Ortega

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 25 de octubre del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ana Laura López Escamilla en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del Taller titulado “Biología del Desarrollo y Función de las Estructuras Reproductoras en Cactáceas”

Dedicada

A mis padres Juanita y Fernando por el apoyo, cariño y confianza que en todo momento me han brindado y por su esfuerzo en los cuidados y desvelos que necesité cuando nací, los cuales me hicieron aferrarme a la vida.

A mis hermanos: Heriberto por ser mi cómplice y rescatarme siempre que lo necesito y a Robertito por brillar en nuestras vidas. Los quiero!

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la invaluable formación académica que recibí desde la secundaria.

Al proyecto CONACYT-CONAFOR-2003-C03-9951 “Propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas y/o en peligro de extinción del estado de Coahuila” por la beca otorgada al participar como asistente en el proyecto.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por facilitar sus instalaciones y equipo necesario para la realización de este proyecto

A las profesoras Biól. Laura Patricia Olgún Santos, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana y M. en C. Karina Jiménez Durán del Taller “Biología del Desarrollo y Función de las Estructuras Reproductoras en Cactáceas”, por sus comentarios y sugerencias.

A la Biól. Laura Patricia Olgún Santos, técnico académico de la Unidad de Ambientes Controlados, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las cámaras y el invernadero para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* y *ex vitro*.

A los sinodales Biól. Laura Patricia Olgún Santos, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y Dra. Helia Reyna Osuna Fernández por sus sugerencias.

A la tutora Dra. Ana Laura López Escamilla por su apoyo, dedicación y sugerencias que permitieron el desarrollo de esta tesis. Mil gracias.

Personales

A mi familia y amigos por sus palabras de aliento y motivación en todo momento. Muchas gracias.

A Ana Laura y Paty por todo el tiempo y apoyo que siempre me brindaron a lo largo de la elaboración de esta tesis y por los momentos tan amenos que se logran con su presencia.

A Edmundo por motivarme e inspirarme a tomar retos en mi vida y por ser tan decidido en todo lo que se propone. Gracias por haberme deslumbrado con tu forma de ser, nunca cambies.

A Nax, Viri, Adrianita, Christian, Roberto, Liz y Ale por su valiosa amistad y porque hicieron los momentos de estudio más amenos. Gracias.

A mis amigas de toda la vida Penélope y Jenny por todos los momentos de alegría que hemos compartido.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Características de la familia Cactaceae	2
2. Problemática de conservación de las cactáceas	3
3. Distribución y hábitat del género <i>Thelocactus</i>	4
4. Distribución y estatus de conservación de <i>Thelocactus bicolor</i>	4
5. Comercio de cactáceas	5
6. Estrategias de conservación	6
7. Micropropagación	6
7.1. Ventajas de la micropropagación	8
7.2. Desventajas de la micropropagación	8
8. Respuestas morfogénicas	10
9. Reguladores del crecimiento	10
9.1. Citocininas	11
9.2. Auxinas	11
10. Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas	11
III. JUSTIFICACION	16
IV. OBJETIVOS	16
1. General	16
2. Particulares	16
V. MATERIAL Y MÉTODO	17
1. Escarificación y desinfección de semillas	17
2. Germinación <i>in vitro</i>	17
3. Obtención y siembra de explantes	18
4. Repetición de los mejores tratamientos	18
5. Individualización y enraizamiento de brotes	19
6. Aclimatización y establecimiento <i>ex vitro</i>	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1. Escarificación y desinfección de semillas	20
2. Germinación <i>in vitro</i>	20
3. Respuestas morfogénicas	22
3.1. Formación de callo	23
3.2. Rizogénesis	25
3.3. Organogénesis	26
3.4. Regeneración apical	32
4. Individualización y enraizamiento de brotes	34
5. Aclimatización y sobrevivencia <i>ex vitro</i>	35
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. ANEXO I Ubicación taxonómica y descripción botánica de la especie	38
IX. ANEXO II Formulación medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962	39
X. BIBLIOGRAFÍA	40

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Benciladenina
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
2, 4-D	Ácido 2, 4-Dicloro fenoxiacético
2iP	N-6 dimetil alil aminopurina
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales)
K	Kinetina
Z	Zeatina

RESUMEN

Thelocactus bicolor (Cactaceae) se distribuye desde el sur de Texas hasta los estados de Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí y se encuentra en el Apéndice II de la CITES, al igual que la gran mayoría de los miembros de la familia Cactaceae. *T. bicolor* es una planta de gran valor ornamental e interés comercial y frecuentemente es anunciada para su venta en internet. El presente trabajo propone la propagación *in vitro* como una estrategia para su conservación. Explantes longitudinales de plántulas entre 0.5 y 1 cm de longitud, germinadas *in vitro*, se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) en concentraciones de 0, 1, y 2 mg L⁻¹ y la auxina ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹. Los explantes en medio adicionado con BA/ANA 2/0.5 mg L⁻¹ presentaron la mayor producción de brotes, seguidos de los tratamientos 0/0.5 y 0/0 (control); sin embargo, el tratamiento con presencia de BA desarrolló el 67% de brotes hiperhidratados. Se determinó que el tratamiento con ANA en una concentración de 0.5 mg L⁻¹ fue el más adecuado, al obtener un promedio de 2.87 brotes por explante. Los brotes obtenidos fueron enraizados en medio MS adicionado con carbón activado 1.5 g L⁻¹. Posteriormente fueron trasplantados a un sustrato esterilizado compuesto por tepojal y tierra negra en proporción 1:1. La aclimatización se llevó a cabo en charolas de plástico mantenidas a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-35 μmol m⁻² s⁻¹ durante 4 semanas antes de ser transferidas a un invernadero. Finalmente fue posible establecer los brotes enraizados obtenidos *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Características de la familia Cactaceae	2
2. Problemática de conservación de las cactáceas	3
3. Distribución y hábitat del género <i>Thelocactus</i>	4
4. Distribución y estatus de conservación de <i>Thelocactus bicolor</i>	4
5. Comercio de cactáceas	5
6. Estrategias de conservación	6
7. Micropropagación	6
7.1. Ventajas de la micropropagación	8
7.2. Desventajas de la micropropagación	8
8. Respuestas morfogénicas	10
9. Reguladores del crecimiento	10
9.1. Citocininas	11
9.2. Auxinas	11
10. Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas	11
III. JUSTIFICACION	16
IV. OBJETIVOS	16
1. General	16
2. Particulares	16
V. MATERIAL Y MÉTODO	17
1. Escarificación y desinfección de semillas	17
2. Germinación <i>in vitro</i>	17
3. Obtención y siembra de explantes	18
4. Repetición de los mejores tratamientos	18
5. Individualización y enraizamiento de brotes	19
6. Aclimatización y establecimiento <i>ex vitro</i>	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
1. Escarificación y desinfección de semillas	20
2. Germinación <i>in vitro</i>	20
3. Respuestas morfogénicas	22
3.1. Formación de callo	23
3.2. Rizogénesis	25
3.3. Organogénesis	26
3.4. Regeneración apical	32
4. Individualización y enraizamiento de brotes	34
5. Aclimatización y sobrevivencia <i>ex vitro</i>	35
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. ANEXO I Ubicación taxonómica y descripción botánica de la especie	38
IX. ANEXO II Formulación medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962	39
X. BIBLIOGRAFÍA	40

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Benciladenina
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres)
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
2, 4-D	Ácido 2, 4-Dicloro fenoxiacético
2iP	N-6 dimetil alil aminopurina
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales)
K	Kinetina
Z	Zeatina

RESUMEN

Thelocactus bicolor (Cactaceae) se distribuye desde el sur de Texas hasta los estados de Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí y se encuentra en el Apéndice II de la CITES, al igual que la gran mayoría de los miembros de la familia Cactaceae. *T. bicolor* es una planta de gran valor ornamental e interés comercial y frecuentemente es anunciada para su venta en internet. El presente trabajo propone la propagación *in vitro* como una estrategia para su conservación. Explantes longitudinales de plántulas entre 0.5 y 1 cm de longitud, germinadas *in vitro*, se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con la citocinina 6-bencilaminopurina (BA) en concentraciones de 0, 1, y 2 mg L⁻¹ y la auxina ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg L⁻¹. Los explantes en medio adicionado con BA/ANA 2/0.5 mg L⁻¹ presentaron la mayor producción de brotes, seguidos de los tratamientos 0/0.5 y 0/0 (control); sin embargo, el tratamiento con presencia de BA desarrolló el 67% de brotes hiperhidratados. Se determinó que el tratamiento con ANA en una concentración de 0.5 mg L⁻¹ fue el más adecuado, al obtener un promedio de 2.87 brotes por explante. Los brotes obtenidos fueron enraizados en medio MS adicionado con carbón activado 1.5 g L⁻¹. Posteriormente fueron trasplantados a un sustrato esterilizado compuesto por tepojal y tierra negra en proporción 1:1. La aclimatización se llevó a cabo en charolas de plástico mantenidas a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-35 μmol m⁻² s⁻¹ durante 4 semanas antes de ser transferidas a un invernadero. Finalmente fue posible establecer los brotes enraizados obtenidos *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con mayor diversidad biológica a nivel mundial no sólo por el número de especies descritas de casi 65 000 (con una cifra estimada de más de 200 000), sino también por su diversidad genética y de ecosistemas (Mittermeier *et al.*, 1997). Sin embargo, al igual que en muchas partes del mundo, en México existe una fuerte presión sobre la biodiversidad y a pesar de que la extinción de especies es un proceso natural, durante los últimos años la tasa de extinción a nivel mundial es más de mil veces mayor que la estimada con el registro fósil. Las principales amenazas son la conversión de los ecosistemas naturales a sistemas productivos (agrícolas o ganaderos), la contaminación, el cambio climático, la extensión de la mancha urbana, la introducción de especies exóticas y las actividades ilegales como el tráfico de especies. En México se ha registrado el 5.2% de las extinciones del mundo en los últimos 400 años (Gentry, 1996).

De acuerdo con la información del Inventario Nacional Forestal (2000), las zonas áridas son las más importantes por su extensión, ya que cubren cerca del 29% del territorio nacional. Este es uno de los principales factores que permiten que la mayor parte del territorio mexicano cuente con vegetación crasicale, siendo en éstas zonas en las que se encuentran la mayoría de las especies de la familia Cactaceae que, de acuerdo con Guzmán *et al.* (2003), cuenta con 913 taxones de los que se reconocen 669 especies y 244 subespecies, agrupadas en 63 géneros, de los cuales son endémicos de México 518 especies y 206 subespecies.

Debido a la situación de riesgo en que se encuentran las cactáceas, se ha despertado el interés en desarrollar investigaciones que permitan la recuperación de las especies afectadas de manera rápida e incrementar el número de individuos para su venta y así disminuir la presión de colecta a la que están sometidas. El cultivo *in vitro* es una técnica que se ha utilizado principalmente para la propagación de especies de interés económico como lo son las hortalizas y especies ornamentales. De igual forma se ha aplicado exitosamente en la propagación de cactáceas y otras especies en peligro de extinción. Algunas de las ventajas que presenta ésta técnica de propagación son que permite el desarrollo de plántulas libres de enfermedades y una masiva y rápida multiplicación (Gratton y Fay, 1990; Fay, 1993). Por esta razón, en el presente trabajo se aplicaron las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación y como una herramienta de conservación de *Thelocactus bicolor*, cactácea de alto interés ornamental que si bien no está incluida en la NOM-059-ECOL-2001, su comercio se encuentra regulado por la CITES en el Apéndice II.

II. ANTECEDENTES

México es una nación megadiversa. Cuenta con más de 26 000 especies de plantas con un nivel de endemismo superior al 40%. Destacan la familia Orchidaceae con 920 especies, el género *Pinus* con 48 especies y la familia Cactaceae con 850 especies. La extraordinaria biodiversidad del país se explica principalmente por la complejidad de su topografía, la variedad de climas y la convergencia de dos zonas biogeográficas: la Neártica y la Neotropical. Los climas con los que cuenta el país van desde el tropical subhúmedo hasta el clima árido seco (CONABIO, 1998).

1. Características de la familia Cactaceae

Las especies de la familia Cactaceae son muy diversas, el género *Pereskia* es el único que presenta hojas, en el resto de la familia las hojas están ausentes o transformadas en espinas y la función fotosintética la ha adoptado el tallo, que puede adquirir formas diversas como: las arborescentes, columnares, globosas o cilíndricas. Estas plantas también tienen distintos hábitos de crecimiento y pueden ser candelabroformes, solitarias, cespitosas o epífitas, éstas últimas crecen en ambientes muy húmedos. Sus tallos son suculentos y presentan proyecciones que pueden ser tubérculos o costillas. La característica más representativa de la familia Cactaceae es la presencia de aréolas, ubicadas en el ápice de los tubérculos o en los márgenes de las costillas y se encuentran cubiertas por numerosos tricomas (lana) y espinas en número variable. Las aréolas son estructuras meristemáticas, equivalentes a las yemas axilares del resto de las angiospermas, y tienen la capacidad de formar tricomas, espinas, flores, frutos y nuevos tallos, éstos últimos como consecuencia de estímulos tales como la pérdida del ápice de la planta o lesiones provocadas en los tejidos (Bravo-Hollis, 1978; Gibson y Nobel, 1986).

La distribución natural de esta familia es exclusiva del continente Americano (a excepción del género *Rhipsalis*) y se extiende desde Canadá hasta la Patagonia en Argentina, desde el nivel del mar hasta los 5100 m de altitud en Perú. Estas plantas se encuentran principalmente en zonas áridas y semiáridas, pero también en zonas tropicales y subtropicales (Bravo-Hollis, 1978; Mauseth, 1990).

2. Problemática de conservación de las cactáceas

Los miembros de esta familia han alcanzado un valor muy importante como plantas de ornato tanto en el mercado nacional como en el internacional, esto ha provocado que las plantas sean extraídas de su hábitat natural para formar parte de colecciones privadas en todo el mundo. A pesar de que en la actualidad las medidas de protección de los ambientes silvestres son más eficientes, el saqueo ilegal se sigue llevando a cabo, principalmente para satisfacer el mercado internacional. Esta práctica ha provocando la disminución de las poblaciones naturales de cactáceas, sin embargo, no es lo único que las coloca en una situación de riesgo, también se añade la conversión de terrenos para uso agrícola o pecuario y el crecimiento de la mancha urbana que invade los ambientes en donde crecen (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Becerra, 2000; Benítez y Dávila, 2002).

Actualmente existen instituciones que se encargan de generar listados donde indican en qué categoría de riesgo se encuentran las especies. A nivel nacional está la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001), listado que señala cuáles son las especies de flora y fauna silvestres de México que se encuentran en alguna de las siguientes categorías: probablemente extintas en el medio silvestre, en peligro de extinción, amenazadas, sujetas a protección especial, además de señalar aquellas que son endémicas (SEMARNAT, 2002). A nivel internacional, se encuentra la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) encargada de señalar cuales son las especies de flora y fauna extintas en estado silvestre, en peligro de extinción, vulnerables y las que se encuentran en menor riesgo (IUCN, 1994).

Otra organización es la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Silvestres de Fauna y Flora Amenazadas (CITES) que cumple con la función de regular el comercio y explotación de especies de flora y fauna, catalogándolas en apéndices. En el Apéndice I se incluyen todas las especies en peligro de extinción que están sometidas a comercio internacional; su comercio está prácticamente prohibido salvo en casos excepcionales, tales como el intercambio científico o de ejemplares propagados artificialmente en viveros registrados ante la Secretaría de la CITES. En el Apéndice II se encuentran aquellas especies que no necesariamente están en peligro de extinción pero si no se controla su comercio podrían llegar a estarlo (CITES, 2003).

3. Distribución y hábitat del género *Thelocactus*

El género *Thelocactus* fue descrito por Britton y Rose (1922, 1923 citado en Ramírez, 2000) e incluye 20 especies. Presenta una distribución entre los 20° a 32° latitud norte en el Desierto Chihuahuense y hacia el sur de Estados Unidos de Norte América (Fig.1). La mayoría de las especies del género habitan en suelos de tipo calcáreo y derivados de éstos, los cuales varían en textura. En cuanto a las características del hábitat, *Thelocactus* se encuentra en elevaciones que van desde 12 msnm hasta 2300 msnm, con precipitación pluvial desde 156.9 a 847.2 mm anuales, temperaturas máximas de 29.1 °C a 37.8 °C y mínimas que van de 1.7 °C a 14.2 °C (Anderson, 1987).

4. Distribución y estatus de conservación de *Thelocactus bicolor*

Thelocactus bicolor (Fig. 1) (Anexo I) tiene una distribución muy amplia, desde el sur de Texas en los Estados Unidos hasta los estados de Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas en México (Fig. 2) (Bravo-Hollis, 1978, Guzmán *et al.*, 2003). Actualmente se le ubica dentro del Apéndice II de la CITES, es decir que esta especie no necesariamente se encuentra en peligro de extinción pero si no se controla su comercio podría llegar a estarlo (CITES, 2003).



Fig 1. Planta silvestre de *Thelocactus bicolor*.

De las cuatro subespecies solo están incluidas en la NOM-059-ECOL-2001 la subespecie *bolaensis* (Amenazada) y la subespecie *schwarzii* (sujeta a protección especial) (SEMARNAT, 2002; Guzmán *et al.*, 2003).

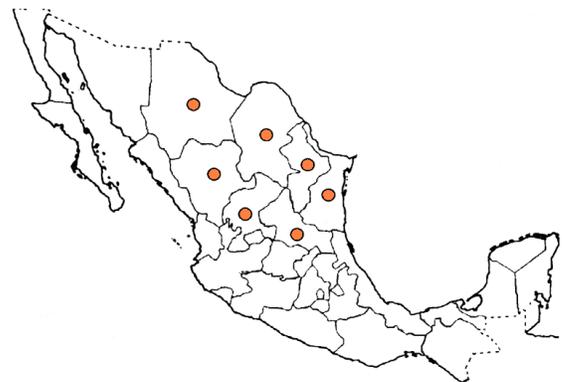


Fig. 2. Mapa de distribución de *Thelocactus bicolor* en México. Tomado de Guzmán *et al.*, 2003.

5. Comercio de cactáceas

Se sabe que el comercio de cactáceas inició poco después de la conquista de América. Muestrarios de plantas entre las que figuran las cactáceas que fueron llevados a España, demuestran que estas plantas causaron sorpresa y admiración en Europa por lo exótico de su aspecto (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Pero no fue sino hasta el siglo XX cuando su demanda se extendió en muchos países europeos, en Japón y en Estados Unidos de Norteamérica donde las especies de mayor importancia ornamental llegaron principalmente por medio de la extracción ilegal de su hábitat natural (Arias, 1991).

Actualmente existe un mercado muy amplio de cactáceas debido a la gran demanda de estas plantas. A través de una búsqueda en internet realizada por un grupo de científicos mexicanos en el año 2002, se comprobó la existencia de 19 proveedores internacionales de 8 países en los que se anuncian cactáceas mexicanas para su venta. Entre las especies anunciadas con mayor frecuencia, se encuentra *Thelocactus bicolor* en el décimo lugar con una frecuencia de 42 (número de registros de venta encontrados en internet). La alta demanda de esta especie se debe principalmente a la belleza de sus flores ya que son muy grandes (de 5-6 cm de longitud y 5-6 cm de diámetro) y de color rosa púrpura (Benítez y Dávila, 2002).

En una búsqueda realizada vía internet (2007), fue posible encontrar que diversos sitios cuentan con ejemplares de *Thelocactus bicolor* a la venta (Tabla 1) y con precios que van desde \$30 hasta \$100 pesos mexicanos. En ninguno de los sitios de internet aquí expuestos se menciona el origen de las plantas.

Tabla 1. Venta de ejemplares de *Thelocactus bicolor* en sitios de internet.

Precio en internet	Equivalencia en pesos mexicanos	Tamaño del ejemplar	Referencia
3.50 €	\$ 52.5	3-4 cm	http://www.kakteen-haage.com (12 de junio de 2007).
US\$ 5.0	\$ 55.0	ne	http://cgi.ebay.com (12 de junio de 2007).
US\$ 9.99	\$ 109.0	ne	http://cgi.ebay.com (12 de junio de 2007).

€: precio en Euros, US\$: precio en dólares Estadounidenses, \$: precio en Pesos Mexicanos, ne: no especificado

6. Estrategias de conservación

Es importante tomar medidas preventivas antes de que las especies lleguen a formar parte de las listas de especies en peligro de extinción (Cox, 1997). En el caso de las cactáceas, se han hecho varios esfuerzos para protegerlas, dentro de los que se destaca el trabajo realizado por los jardines botánicos, así como la creación de centros de propagación y distribución de cactáceas como una medida que ayude a disminuir la presión de colecta sobre las poblaciones naturales (Becerra, 2000).

La conservación de las especies puede realizarse dentro (*in situ*) o fuera (*ex situ*) de sus respectivos entornos naturales en los que se han desarrollado (Cox, 1997). En el ámbito de las plantas cultivadas, donde no existe propiamente un ecosistema natural, se implementan métodos de conservación *ex situ*, dentro de los cuales se encuentra el cultivo *in vitro*. Este método de propagación es una alternativa para las especies que no producen semillas o que producen muy pocas, e incluso para las plantas que pueden ser propagadas por semilla pero sus ciclos de vida son muy largos y producen semillas hasta alcanzar la madurez lo cual implica varios años, como es el caso de las cactáceas (González, 2001).

7. Micropropagación

Dentro de los usos del cultivo de tejidos vegetales (CTV) se encuentra la micropropagación, que se refiere a la generación de brotes a partir de ápices, yemas o meristemas, y la consecuente regeneración de una planta. El CTV es un conjunto de técnicas utilizadas para el establecimiento y mantenimiento de órganos, células y protoplastos vegetales en cultivos de manera aséptica (*in vitro*) y bajo el control de factores físico-químicos (reguladores de crecimiento, nutrimentos, temperatura, luz y fotoperiodo) que permiten la regeneración de nuevas plantas (Hurtado y Merino, 1987; Hartman *et al.*, 1997).

Históricamente el cultivo de tejidos se inicia en el año 1756 con los experimentos de Duhamel, quien obtuvo la formación de callo en plantas de olmo. Sin embargo, fue hasta 1902 cuando Gottlieb Haberlandt desarrolló por primera vez el cultivo de células vegetales en una solución nutritiva (Razdan, 2003). Los fundamentos de esta técnica se encuentran en la teoría celular realizada por Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann a principios del siglo XIX y en el principio de la totipotencialidad celular ya que se describe que las células tienen la

habilidad de dividirse y la información necesaria para regenerar a un organismo completo, por lo que a partir de un segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre (Lebowitz, 1995).

La micropropagación consta de 5 etapas o fases (George y Sherrington, 1984; Fay, 1993; Hartman *et al.*, 1997; Lynch, 1999; Razdam, 2003):

Fase 0 ó preparativa. La calidad de las plantas donadoras desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético, es importante para que el desarrollo de la Micropropagación sea eficiente y repetible. Esta fase permite seleccionar la planta madre o donante que se encuentre en las mejores condiciones para evitar contaminación en la siguiente. Con la finalidad de reducir los riesgos de contaminación de los cultivos y maximizar la diversidad genética de las plantas producidas se puede optar por la utilización de plantas cuyas semillas han germinado *in vitro*.

Fase 1 ó establecimiento. Consiste en la selección y desinfección del explante y el establecimiento aséptico en el medio de cultivo. Generalmente los explantes se toman de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas ya que mientras más joven y menos diferenciado sea el tejido mejor será la respuesta *in vitro*. Para la eliminación de microorganismos contaminantes, que pueden ser hongos, levaduras o bacterias, los explantes son desinfectados superficialmente. Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaOCl), alcohol (OH), hipoclorito de calcio (CaOCl) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween (agente surfactante) con la finalidad de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas de aire que se forman en la superficie y cavidades del explante para que los agentes desinfectantes pueden eliminar la mayor parte de los contaminantes.

Fase 2 ó multiplicación. Consiste en colocar los explantes en un medio de multiplicación, es decir con reguladores de crecimiento. El medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) es el que se reporta con mayor frecuencia para la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas. En esta etapa es necesario un balance entre auxinas y citocininas en el medio de cultivo. Este balance está determinado por las concentraciones de citocininas y auxinas endógenas que dependerán del tipo de explante seleccionado y de la especie que se trabajará. Algunas son cultivadas sin la adición de reguladores externos y generan brotes, probablemente debido a que presentan cantidades endógenas suficientes de reguladores del crecimiento.

Fase 3 ó enraizamiento. En esta etapa los brotes obtenidos en la fase dos, son transferidos a medio sin reguladores de crecimiento o a medio con auxinas para inducir la formación de raíces. El desarrollo de raíces es importante ya que les permitirán comenzar la absorción de nutrimentos al transplantarse sobre un sustrato en condiciones *ex vitro*.

Fase 4 ó aclimatización. Aquí se da el cambio de una planta heterotrófica o mixotrófica a una autotrófica y el paso gradual a condiciones *ex vitro*. Las plantas pueden parecer normales, sin embargo, a menudo presentan modificaciones en su estructura o metabolismo tales como tasas reducidas en la fotosíntesis, una cutícula delgada y una apertura estomática anormal, lo que las hace susceptibles a la deshidratación. Por esta razón es importante realizar el cambio gradual de un ambiente húmedo a otro más seco.

7.1. Ventajas de la micropropagación

A partir de pequeños fragmentos de tejido es posible obtener plantas libres de patógenos. La producción de plantas puede extenderse todo el año ya que los cultivos no dependen de los ciclos de vida o de cambios de estación y se requiere de poco espacio para mantener los cultivos. Ya que se expresa la totipotencialidad de las células, esta técnica ofrece un alto potencial para la rápida multiplicación en tasas muy elevadas (Hurtado y Merino, 1987; Fay, 1993; González, 2001).

7.2. Desventajas de la micropropagación

El desarrollo de esta técnica es relativamente más costoso en comparación con otros métodos de propagación. El mayor componente del costo es la labor manual, realizada por personal especializado, siendo esta mayor en las últimas etapas donde se manipula cada brote individualmente. Sin embargo en ciertos casos, los costos de propagación son mínimos o se compensan con la cantidad de ejemplares obtenidos *in vitro* (Pérez Ponce, 1998). Algunos de los factores que con mayor frecuencia obstaculizan el desarrollo de los tejidos cultivados *in vitro* se mencionan a continuación.

- **Hiperhidratación**

De acuerdo con Debergh *et al.* (1992), la hiperhidratación de los tejidos se observa con mucha frecuencia en plantas propagadas *in vitro*. Estas plantas presentan irregularidades

morfológicas, anatómicas y fisiológicas. Algunas de las irregularidades observadas son la presencia de espacios intercelulares muy grandes en mesófilo y parénquima, presencia de cloroplastos con organización anormal en grana y estroma, bajo contenido de clorofila, cutícula delgada, el peso seco del tejido es muy bajo y alto el contenido de agua. Su aspecto es translúcido debido a la gran acumulación de agua en sus tejidos (Wetzstein y Sommer, 1982; Paques y Boxus, 1987, citados por Debergh *et al.*, 1992).

Son varios los factores que pueden inducir la hiperhidratación, tales como un porcentaje de humedad muy alto, el exceso de carbohidratos y minerales en el medio de cultivo o la baja intensidad luminosa, así como la cantidad y el tipo de citocinina empleada. La susceptibilidad a la hiperhidratación varía dependiendo de la especie (Leshem *et al.*, 1988, citado por Debergh *et al.*, 1992).

- **Variación somaclonal**

Se refiere a las anomalías morfológicas que presentan las plantas y que son el resultado de una variación genética producida durante el cultivo *in vitro*. A ese tipo de variación fenotípica se le ha encontrado asociada en mayor frecuencia con el desarrollo de plantas obtenidas a partir de callo (Gómez, 1998).

El incremento de la variación genética en especies propagadas con fines ornamentales podría ser desventajoso cuando el fenotipo obtenido es una forma no deseable. Sobre todo cuando la micropropagación se emplea en especies amenazadas es muy importante mantener una estabilidad genética que permita la conservación de las características propias de la especie (Pérez Ponce, 1998).

- **Oxidación fenólica**

Se manifiesta como un ennegrecimiento del explante en la zona expuesta al medio de cultivo que puede extenderse en todo el tejido e incluso en el medio afectando el crecimiento y en algunas ocasiones provoca la muerte del explante. Por lo tanto la oxidación fenólica puede ser un serio problema para el establecimiento y supervivencia de los cultivos *in vitro* (Jiménez, 1998).

Generalmente se presenta cuando se dañan los tejidos durante la preparación del explante, ya sea al seccionarlo o durante la desinfección superficial, en ese momento los compuestos

fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plástidos y otros organelos que contienen polifenoloxidasas, enzimas de naturaleza oxidoreductasa, las cuales provocan la aparición de la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación y son estos compuestos oxidados los que inhiben la actividad enzimática que puede desencadenar el obscurecimiento y muerte de los explantes (Hu y Wang, 1983).

8. Respuestas morfogénicas

Los tejidos vegetales al ser cultivados en un medio con reguladores de crecimiento pueden desarrollar órganos de manera directa, por ejemplo raíces e incluso nuevos tallos (brotes); a este proceso se le conoce como **organogénesis directa**. En cambio, algunos otros pasan por una etapa en que las células están formando una masa de células desorganizadas y desdiferenciadas llamada callo, que más tarde puede desarrollar brotes y dar lugar a nuevas plantas, a este proceso se le conoce como **organogénesis indirecta**. El otro tipo de respuesta es la **embriogénesis somática**, en donde se presenta la formación de embriones, pero éstos no son producto de fusión gamética y pueden desarrollarse de manera directa a partir del explante o de manera indirecta a partir de callo (Hu y Wang, 1983; Smith, 1992; Hartmann *et al.*, 1997; Pérez Ponce, 1998; Razdam, 2003).

Cada una de las respuestas morfogénicas están determinadas por la interacción, combinación y concentración de los reguladores de crecimiento, aunque no siempre es necesario proveer reguladores de crecimiento externos para obtener una respuesta, ya que al parecer los factores físicos como la intensidad luminosa o químicos como los macronutrientes o micronutrientes, afectan la movilización o producción de reguladores endógenos (Hu y Wang, 1983; Bonga y von Aderkas, 1992; Gaspar *et al.*, 1996).

9. Reguladores del crecimiento

Las citocininas y auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más utilizados en el CTV. El crecimiento de las plantas *in vitro* y su morfogénesis son regulados por la interacción de los reguladores adicionados al medio (exógenos) y los producidos de manera endógena (Bonga y von Aderkas, 1992; Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003).

9.1. Citocininas

De manera endógena, las citocininas se sintetizan en zonas meristemáticas de raíces y en los embriones. Promueven la división y la expansión celular, rompen la dominancia apical y contrarrestan el letargo. En CTV son utilizadas para romper la latencia de los meristemos laterales y para promover la formación de raíces adventicias. Promueven la formación de brotes al adicionar al medio auxinas/citocininas y pueden desarrollar callo debido a que inducen la división celular. Las que se utilizan con mayor frecuencia son la BA (benciladenina), K (kinetina), 2iP (N-6 dimetil alil aminopurina) y Z (zeatina) (Hu y Wang, 1983; Gaspar *et al.*, 1996; Haberer y Kieber, 2002).

9.2. Auxinas

Se sintetizan en las yemas, en las hojas jóvenes, los frutos así como en el embrión. Promueven el crecimiento, la división y la expansión celular, mantienen la dominancia apical, estimulan la formación y el alargamiento de las raíces así como la síntesis de pared celular. Se emplean básicamente como promotores de la proliferación celular y la inducción de la morfogénesis. En CTV, las auxinas se usan junto con las citocininas para controlar la diferenciación y la morfogénesis. Las auxinas más empleadas son el 2, 4-D (ácido 2, 4-dicloro fenoxiacético), AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico) y el ANA (ácido naftalenacético). La concentración de estos reguladores es un factor crítico que varía dependiendo de la especie. Altas concentraciones pueden causar anomalías en el desarrollo o su completa inhibición (Hu y Wang, 1983; Bonga y von Aderkas, 1992; Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003).

10. Cultivo de Tejidos Vegetales en Cactáceas

En especies de la familia Cactaceae las técnicas *in vitro* se han utilizado desde hace más de 30 años con la finalidad de propagarlas para su venta comercial, sin embargo, también se han aplicado exitosamente en algunas especies con problemas de germinación de lento crecimiento, o que producen pocos hijuelos o semillas, lo que las ha puesto en riesgo de extinción. Es por esto que el cultivo de tejidos vegetales puede ser utilizado en cactáceas como una herramienta de propagación masiva y contribuir así a la conservación de las especies cubriendo la demanda

comercial, evitando así el saqueo de individuos silvestres y por ende manteniendo el equilibrio de los ecosistemas donde habitan (Fay y Gratton, 1992; Fay, 1993).

En la tabla 2 se muestran algunos de los trabajos que reportan la propagación *in vitro* de cactáceas, en ella se puede observar que el medio de cultivo más utilizado para la proliferación ha sido el MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado de la citocinina BA en un rango de concentraciones de 0.25 a 10 mg·L⁻¹, ya sea sola, o en combinación de bajas concentraciones de auxinas, principalmente ANA y 2, 4-D (0.01 a 2.0 mg·L⁻¹). También se reportan buenos resultados con las citocininas 2iP y K (Garay y Rubluo, 1992; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). Dentro de los géneros más reportados están *Mammillaria*, *Ferocactus*, *Turbincarpus*, *Coryphabtha* y *Astrophytum* sin embargo, los reportes para las especies del género *Thelocactus* son muy escasos, solo fue encontrado uno para *T. hexaedophorus* donde fue posible la formación de brotes (13.6 brotes/explante) a partir de explantes obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* y cultivados en medio MS más 2iP 6.0 mg·L⁻¹ (Castro-Gallo *et al.*, 2002). Para *T. bicolor* no se encontró ningún reporte previo de su propagación *in vitro*.

Tabla 2. Cultivo de tejidos vegetales en algunas cactáceas.

Especie	Explantante	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento (mg L ⁻¹)	Respuesta morfológica	Brotos por explante	Referencia
<i>Opuntia polyacantha</i>	Aréolas	MS	BA(10)+ANA(0, 0.1, 0.01) BA(10)+GA(50)+ANA(0, 0.1, 0.01)	Brotos	ne	Mauseth y Halperin, 1975
<i>Mammillaria woodii</i>	Médula	MS	AIA(2) + K(2)	Callo y brotes		Kolář <i>et al.</i> , 1976
<i>Coryphantha vivipara</i> <i>Echinocereus pectinatus</i> <i>Epiphyllum irbid</i> <i>Hatiria salicomoides</i> <i>Lobivia binghamiana</i> <i>L. lateritia</i> <i>Notocactus scopa</i> <i>Opuntia basilaris</i> <i>Pachycereus pringlei</i> <i>Rhipsalis aculeata</i> <i>Selenicereus grandiflorus</i>	ne	MS	BA (1) + ANA(10) BA(10) + ANA(0.25)	Callo	-----	Mauseth, 1977
<i>Epiphyllum hybrid</i> <i>Chamacereus sylvestrii</i> <i>Hatiora salicornoides</i> <i>Lobivia binghamiana</i> <i>Mammillaria elongata</i> <i>Opuntia basilaris</i> <i>Opuntia poliacantha</i> <i>Pachycereus pringlei</i> <i>Pereskia aculeata</i> <i>Selenicereus grandiflorus</i> <i>Mammillaria elongata</i>	Aréolas	Lim y Staba	BA(1 - 10)	Brotos	ne	Mauseth, 1979
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Tubérculos	MS	2iP(10) + AIA(1.01)	Callo, raíz y brotes	ne	Johnson y Ermino, 1979
<i>Ferocactus acanthodes</i>	Secciones longitudinales	Fossard	2,4-D(0.5) K(5)	Callo, brotes a partir de callo	ne	Anaya, 1986
<i>Sulcorebutia alba</i>	Ápices	MS	K(10) + ANA(1)	Callo y brotes		Ault y Blackmon, 1987
	Segmentos de tallo	MS	BA(0.25-1)	Callo y brotes	ne	Dabeekausen <i>et al.</i> , 1991

Tabla 2. Continuación.....

Especie	Explantante	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento (mg L ⁻¹)	Respuesta morfológica		Brotos por explante	Referencia
				Brotos	Embriones somáticos a partir de callo		
<i>Aztekium ritteri</i>	Costillas, plántulas sin seccionar, secciones axilares y basales	MS	BA(1) + ANA(0.01) K(2) + 2,4-D(2)	Brotos	ne		Garay y Rubhuo, 1992
<i>Astrophytum myrtilloides</i> <i>Cephalocereus senilis</i> <i>Coryphantha durangensis</i> <i>Echinocereus dubis</i> <i>E. pectinatus</i> <i>Ferocactus histrix</i> <i>Mammillaria sp. hancei</i>			BA(1) + ANA(0.01)	Brotos	9.23 2.82 4.37 4.87 3.86 5.62 17.50		
<i>Ferocactus hamatacanthus</i> <i>F. latispinus</i> <i>F. pilosus</i> <i>Mammillaria formosa</i> <i>M. obscura</i>	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> y de plantas de invernadero	MS	BA(1) + ANA(0.01)	Brotos	5.83 5.33 5.12 4.42 4.78		Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Coryphantha clavata</i> <i>C. radians</i> <i>Echinocactus platyacanthus</i> <i>Echinofossulocactus sp.</i> <i>Mammillaria canitida</i> <i>M. craigii</i> <i>M. uncinata</i> <i>Stenocactus coptonogonus</i>			BA(1)	Brotos	4.73 4.15 9.00 12.05 13.25 4.65 5.25 16.75		
<i>Nyctocereus serpentinus</i>			BA(2)	Brotos	2.15		
<i>Cephalocereus senilis</i>	Fragmentos apicales y laterales	MS	BA(10)	Brotos	ne		Flores y Ortiz, 2000
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	Apices				13.2		
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	Secciones transversales de tallo	MS	BA(0.198)	Brotos	12.4		Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2001

Tabla 2. Continuación.....

Especie	Explant	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento (mg L ⁻¹)	Respuesta morfológica	Brotos por explante	Referencia
<i>Acharagma aguirrea</i>			BA(1)		7	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astrophytum ornatum</i>			BA(2)		11	
<i>Coryphantha elephantidens</i>			BA(4) + ANA(0.1)		2.9	
<i>Ferocactus flavovirens</i>			2iP(4)		7.5	
<i>Mammillaria bocasana</i>			BA(2)	Brotos	4.8	
<i>Mammillaria oteroi</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS	2iP(4)		4.8	
<i>Pachocereus schottii</i>			BA(3)		4.3	
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>			BA(2)		9.6	
<i>Stenocereus stellatus</i>			BA(1)		7	
<i>Thelocactus hexaedrophorus</i>			2iP(6)		13.6	
<i>Carnegiea gigantea</i>	Apical, lateral, transversal	MS	BA(2)		5.3	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<i>Pachocereus pringlei</i>			BA(1)	Brotos	3.8	
<i>Stenocereus thurberi</i>			BA(1)		4.3	
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	Tubérculos	MS	BA(3) + ANA(1)	Brotos		Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
			BA(2-5) + ANA(0.01,1)	Embriones somáticos	6.3	
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Cladodios	MS	BA(0.1)	Brotos	13.3	García-Saucedo <i>et al.</i> , 2005
<i>Turbinicarpus laui</i>					14	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005
<i>T. lophophoroides</i>					14	
<i>T. pseudopectinatus</i>					19.7	
<i>T. schmedickeanus</i> subsp. <i>flaviflorus</i>					13.8	
<i>T. schmedickeanus</i> subsp. <i>klinkertanus</i>	Apicales, laterales, longitudinales y transversales	MS	BA(0.7-1.1)	Brotos	13.8	
<i>T. schmedickeanus</i> subsp. <i>schmedickeanus</i>			2iP(4-5)		9	
<i>T. subterraneanus</i>					13	
<i>T. valdezianus</i>					7.8	

MS = medio Murashige y Skoog, K = kinetina, BA = benciladenina, ANA = ácido naftalenacético, 2iP = N-6 dimetil alil aminopurina, 2, 4-D = ácido 2, 4-Dicloro fenoxiacético, AIA = ácido indol-3-acético, ne: no específica.

III. JUSTIFICACIÓN

Thelocactus bicolor es una de las especies de cactáceas frecuentemente anunciadas para su venta en internet, lo cual implica una demanda comercial muy alta. Esta demanda sugiere que las poblaciones naturales podrían estar sujetas al saqueo ilegal por lo que es importante tomar medidas dirigidas a su conservación antes de que llegue a estatus críticos como muchas de las especies de esta familia. Una alternativa para este propósito es la propagación *in vitro* que será utilizada como una estrategia de propagación para su conservación.

IV. OBJETIVOS

1. General

- ♣ Establecer las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose.

2. Particulares

- ♣ Determinar la combinación de citocinina/auxina que induzca la mayor formación de brotes.
- ♣ Establecer en condiciones *ex vitro* los brotes enraizados de *Thelocactus bicolor*.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Escarificación y desinfección de semillas

Se utilizaron semillas de *Thelocactus bicolor* colectadas el 20 de Julio de 2004 en la localidad Camino a “El Tejocote”, Municipio General. Cepeda, Coahuila (Carretera estatal Gral. Cepeda-Parras, Km 763 N: 25° 19' 29.1”; W: 101 ° 37' 1.2”), se colocaron en bolsas de papel encerado y fueron almacenadas en refrigeración dentro de un recipiente de vidrio cerrado que contenía silica gel con indicador de humedad (Merck®).

Después de tres meses de su colecta y previo a la desinfección, las semillas fueron sometidas a un proceso de escarificación en ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado durante 4 minutos. Enseguida, las semillas se sometieron al siguiente proceso de desinfección:

Se lavaron en una solución de detergente comercial (Dawn®) 3 gotas/50 mL de agua destilada (20 min) y después con una solución bactericida de Microdyn® 3 gotas/50 mL agua destilada (30 min). Posteriormente fueron desinfectadas en 50 mL de alcohol al 70% (2 min) y por último, en 50 mL de hipoclorito de sodio al 30% (NaOCL, 6% cloro activo) más 3 gotas de Tween 80 (30 min). Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua. Bajo condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces durante 1 min con agua destilada esterilizada.

2. Germinación *in vitro*

La siembra se realizó en frascos de vidrio (tipo Gerber®) con 30 mL de medio MS al 50% de macronutrientes y micronutrientes, sacarosa 15 g L⁻¹, pH 5.7-5.8 y agar bacteriológico Bioxon® 8 g L⁻¹ (Anexo II). El medio fue esterilizado durante 18 min en un autoclave a 121 °C y a una presión de 1.5 kg cm⁻². Se realizaron tres siembras de 30 semillas cada una y se colocaron cinco por frasco. La incubación se realizó en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 2 °C, fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-35 μmol m⁻² s⁻¹.

La evaluación de la germinación se realizó diariamente para determinar su porcentaje. Se consideró que las semillas habían germinado cuando emergió la radícula.

3. Obtención y siembra de explantes

Las plántulas obtenidas de las semillas germinadas, con tallos de entre 0.5 a 1 cm de longitud fueron seccionadas longitudinalmente para obtener dos explantes; las raíces fueron eliminadas. Como medio de inducción de brotes se utilizó el MS adicionado con la citocinina BA (0, 1 y 2 mg L⁻¹) en combinación con la auxina ANA (0, 0.5 y 1 mg L⁻¹) haciendo un total de nueve tratamientos incluido el control (Tabla 3). Por cada tratamiento se sembraron seis explantes longitudinales (2 explantes por frasco).

Tabla 3. Combinaciones de BA/ANA para el cultivo *in vitro* de *Thelocactus bicolor*.

ANA (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
0	0/0	1/0	2/0
0.5	0/0.5	1/0.5	2/0.5
1	0/1	1/1	2/1

Los cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales utilizadas para la germinación. Después de tres meses, los explantes fueron subcultivados en medio MS basal adicionado con carbón activado 1.5 g L⁻¹ para promover la proliferación y la elongación de los brotes. Las respuestas morfogénicas evaluadas fueron la formación de callo, el número de brotes por explante el número de brotes por tratamiento y el desarrollo de raíces. La evaluación se realizó cada semana.

4. Repetición de los mejores tratamientos

Para cada uno de los cuatro tratamientos donde anteriormente se obtuvo el mayor número de brotes se realizaron dos repeticiones con 20 explantes. El conteo de los brotes generados por cada explante se realizó cada semana durante tres meses. Una vez transcurrido este tiempo, los explantes fueron subcultivados en medio MS adicionado con carbón activado 1.5 g L⁻¹. En este medio permanecieron cuatro meses más donde continuó el conteo de brotes y posteriormente se llevó a cabo la individualización de los mismos.

5. Individualización y enraizamiento de brotes

Dentro de la campana de flujo laminar los brotes con longitud entre 1 y 2 cm fueron separados del tejido que les dio origen con la ayuda de un bisturí. Para promover la formación de raíces, estos fueron subcultivados en medio MS basal adicionado con carbón activado 1.5 g L⁻¹. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-35 μmol m⁻² s⁻¹. El conteo de las raíces se realizó una vez por semana durante dos meses.

6. Aclimatización y establecimiento *ex vitro*.

Los brotes enraizados se sacaron de los frascos y las raíces se lavaron cuidadosamente con agua corriente para retirar los residuos del medio de cultivo. A todos los brotes enraizados se les aplicó un enraizador comercial (Radix 1500[®]). Los brotes se sembraron en pequeñas macetas de plástico, en un sustrato compuesto por tepojal y tierra negra en proporción 1:1, previamente esterilizado en una autoclave durante 18 minutos a 121 °C y a una presión de 1.5 kg cm⁻². Las macetas se colocaron en charolas de plástico con tapas transparentes para conservar la humedad y se mantuvieron a 25 ± 2 °C, fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-35 μmol m⁻² s⁻¹ durante cuatro semanas. Posteriormente, las charolas se transfirieron a condiciones de invernadero, donde después de dos semanas se retiraron completamente las tapas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Escarificación y desinfección de semillas

La germinación de las semillas solo fue posible escarificándolas. Después de varios ensayos preliminares se determinó que cuatro minutos en H₂SO₄ concentrado fue el mejor tiempo para lograr el mayor porcentaje de germinación.

El proceso de desinfección fue exitoso obteniéndose el 0% de contaminación.

2. Germinación *in vitro*

Se calculó el promedio del porcentaje de germinación de las tres siembras. La germinación inició a partir del día 10 posterior a la siembra y se obtuvo un porcentaje de germinación acumulada del 96.66 % en medio MS al 50% a los 19 días (Fig. 3).

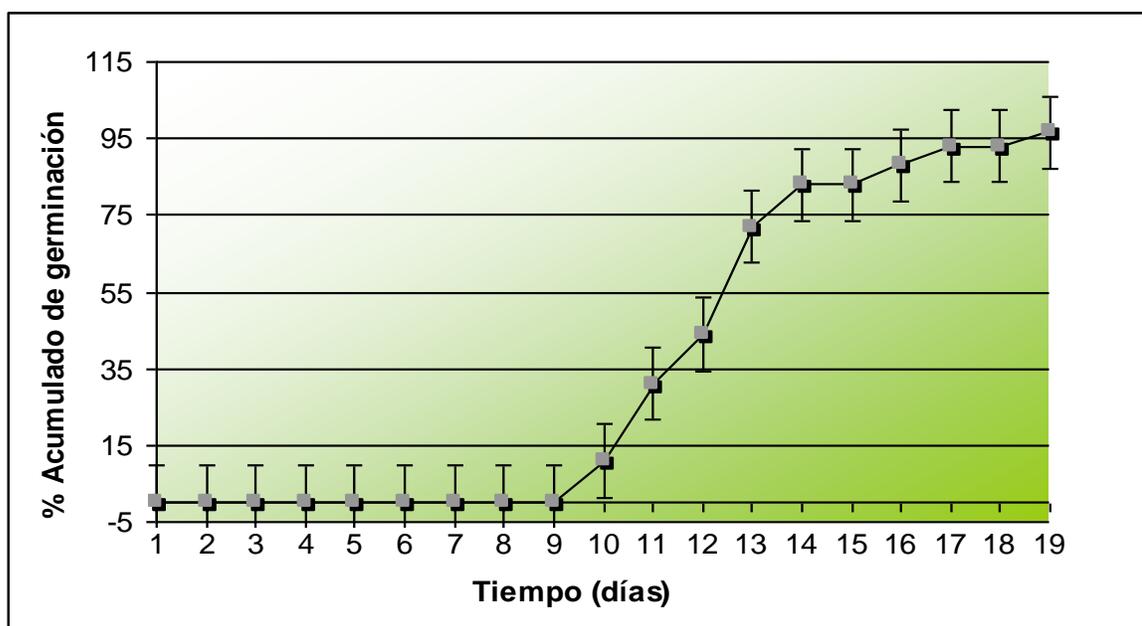


Fig. 3 Germinación acumulada *in vitro* de semillas de *Thelocactus bicolor* en medio MS al 50%.

En distintos reportes realizados sobre la germinación *in vitro* de semillas de cactáceas es posible señalar que el medio más empleado para este fin es el MS al 50%, en algunos casos se especifica que fue modificado reduciendo a la mitad de los macronutrientes, micronutrientes y la sacarosa.

Olguín (1994) realizó ensayos de germinación con *Ariocarpus retusus* en tres medios diferentes: MS, MS al 50% de todos sus componentes ambos con 30 g L⁻¹ de sacarosa, así como en MS al 50% y 15g L⁻¹ de sacarosa. Se encontraron mayores porcentajes de germinación en los medios MS (66%) y MS al 50% 15g L⁻¹ de sacarosa (63%) ambos después de 50 días.

Por otro lado, Rodríguez (2006) reporta que la germinación de semillas de *Echinocactus grusonii* es más lenta en el medio MS en comparación con los medios MS al 50% y agua+agar, siendo el MS al 50% el óptimo para la germinación y el desarrollo de las plántulas. Esto debido a que en el medio MS existe una mayor cantidad de solutos disueltos, lo que provoca una disminución en el potencial hídrico y restringe la disponibilidad de las semillas a tomar el agua.

Resultados similares encontraron Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en semillas de *Echinocactus platyacanthus* que alcanzaron un mayor porcentaje de germinación en menor tiempo en agua+agar (100% en 19 días) en comparación con aquellas semillas que germinaron en medio MS al 50% que alcanzaron un porcentaje del 88% en 34 días. Sin embargo, también menciona que el agua+agar sólo aceleró la germinación y no el crecimiento de las plántulas, debido a la carencia de nutrientes en el medio, mientras que aquellas plántulas que se desarrollaron en medio MS al 50% presentaron un óptimo desarrollo porque la disponibilidad de nutrientes fue mayor.

Castro-Gallo *et al.* (2002), reportan que emplearon plántulas germinadas *in vitro* de *Thelocactus hexaedophorus* sin embargo, no incluyen datos sobre germinación de las semillas.

Debido a que se ha encontrado que una mayor disponibilidad de agua y un alto potencial hídrico son importantes para la germinación, y tomando en cuenta que los nutrientes presentes en el medio juegan un papel muy importante en el desarrollo de las plántulas, en el presente trabajo se decidió utilizar el medio MS al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa.

El porcentaje promedio de germinación *in vitro* obtenido en *Thelocactus bicolor* (96.66 %) fue similar al registrado por Rodríguez (2006) con *Echinocactus grusonii*, logrando un 95% de germinación en agua+agar y un 94% en medio MS al 50% ambos en 19 días y fue mayor y en menor tiempo en comparación con *Ariocarpus retusus* (Olguín,1994), *Echinocactus*

platyacanthus (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004), *Pelecyphora aselliformis* (Santos-Díaz *et al.*, 2003) y *Cephalocereus senilis* (Tapia, 2006) que alcanzaron porcentajes del 63% en 50 días, 88% en 34 días, 55% y 22% en 45 días respectivamente en medio MS al 50%.

En las semillas de *Thelocactus bicolor* el rompimiento de la cubierta seminal inició a los cuatro días posteriores a la siembra, mientras que la radícula comenzó a emerger en un promedio de 10 días. Después de 12 días emergió el hipocótilo y posteriormente el epicótilo. A los 20 días se desarrollaron los tubérculos que presentaron una longitud de 0.1 cm y en su extremo distal se formaron las espinas (Fig. 4). Las plántulas alcanzaron una longitud de 0.5 cm después de cinco semanas.

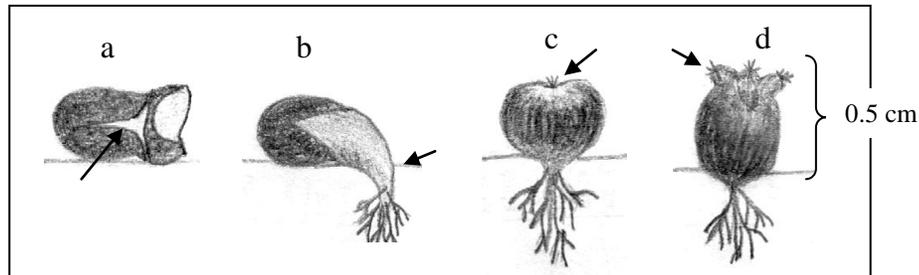


Fig. 4. Esquema de las etapas de la germinación *in vitro* de *Thelocactus bicolor*. a) rompimiento de la testa; b) surgimiento de la radícula; c) inicia el desarrollo del epicótilo; d) plántula con tubérculos.

1. Respuestas morfogénicas

Después de 5 días en el medio de inducción todos los explantes desarrollaron una coloración rojiza en la zona del corte que estuvo en contacto con el medio de cultivo, debido probablemente al daño generado por el corte y sólo prevaleció en el 10% de los explantes. Lo anterior también lo reportó Tapia (2006) para *Cephalocereus senilis* en todos los tratamientos. Después de 30 días se comenzaron a observar las siguientes respuestas morfogénicas:

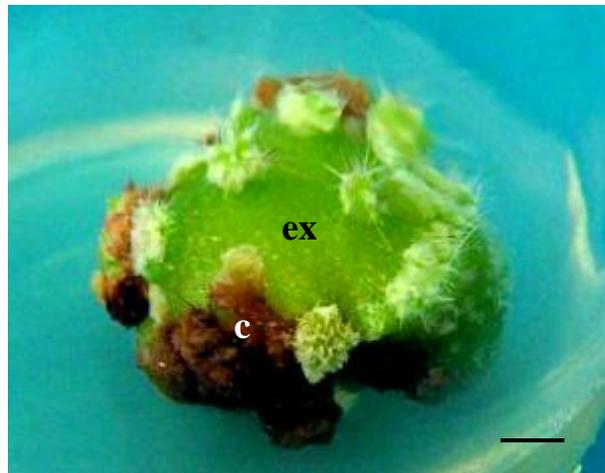


Fig. 5. Desarrollo de callo color marrón en explantes de *Thelocactus bicolor* en BA/ANA 1/0.5 mg L⁻¹ después de 30 días de cultivo. c: callo color marrón, ex: explante. Barra 0.5cm.

3.1. Formación de callo

Después de 30 días en medio de inducción se formó callo compacto y de color marrón en la base de los explantes en siete de los nueve tratamientos (Fig. 5). Giusti *et al.*, (2002) y Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) reportaron el desarrollo de callo en la zona del corte, el primero en explantes de *Pelecypora aselliformis* y *Escobaria minima*, y el segundo en un estudio realizado con 21 especies de cactáceas. Por otro lado, Hu y Wang (1983) observaron que la coloración marrón o café de

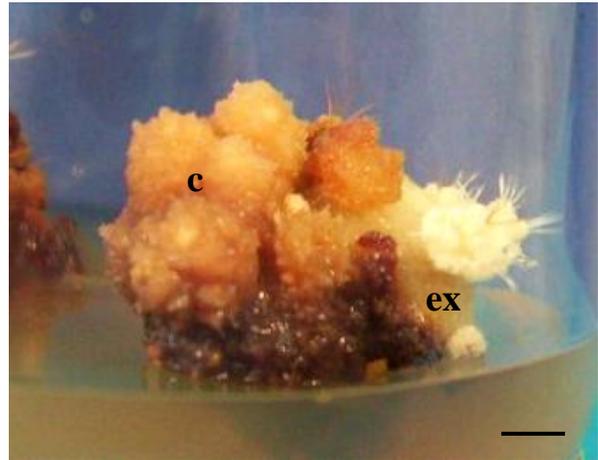


Fig. 6. Callo compacto color marrón en explantes de *Thelocactus bicolor* con BA/ANA 2/0 mg L⁻¹ después de 60 días de cultivo. c, callo; ex, explante. Barra 0.5 cm.

los tejidos puede estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos que muchas veces provocan la oxidación y muerte de los explantes. Para contrarrestar los efectos de la oxidación Jiménez (1998) reportó que usualmente los explantes son enjuagados con soluciones antioxidantes, en otras ocasiones se adicionan antioxidantes al medio de cultivo o se realizan varios subcultivos, también menciona que la disminución de la intensidad luminosa, los cambios en la concentración de sacarosa, la modificación del pH y la regulación de la temperatura, son factores que se modifican para disminuir la incidencia de la oxidación en los cultivos *in vitro*.

En este caso aunque el 48% de los explantes que desarrollaron callo se oxidó (Fig. 6), sólo el 18% continuó con esta tendencia por lo que no se consideró necesario el uso de antioxidantes o la modificación de alguna otra variable para contrarrestar este efecto.

Después de 35 días se observó la formación de callo compacto y de color blanco en la superficie de los explantes (Fig. 7).

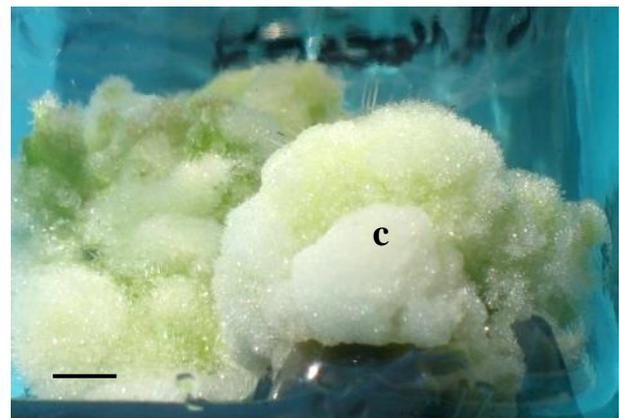


Fig. 7. Desarrollo de callo compacto de color blanco a partir de explantes de *Thelocactus bicolor* en BA/ANA 1/1 mg L⁻¹ después de 35 días de cultivo. c, callo. Barra 0.5 cm.

La presencia de callo en esa zona también lo reportaron Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en explantes de ocho especies y subespecies de *Turbinicarpus*. Al mismo tiempo se observó el desarrollo de callo verde desmenuzable. Los dos tipos de callo se formaron de manera aleatoria en todos los tratamientos, excepto en el control (sin reguladores de crecimiento), y se desarrolló rápidamente cubriendo a los brotes formados lo que interfirió en el desarrollo e individualización de los mismos (Fig. 8). Este tipo de respuesta también la reportó Tapia (2006) para *Cephalocereus senilis*.

Rubluo (1997) mencionó que usualmente la presencia de auxinas induce la producción de callo. En un estudio realizado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) con 21 especies de cactáceas, encuentran que la presencia de auxinas exógenas promueve el desarrollo de callo.

En *Thelocactus bicolor* la formación de callo se presentó en todos los tratamientos excepto el control. Sin embargo, en la repetición realizada con los mejores cuatro tratamientos incluido el control, también se observó en este último el desarrollo de callo tal como lo reportaron Flores-León y Ortíz-Montiel (2000) en explantes de *Cephalocereus senilis*. Esto se puede atribuir a la presencia de auxinas endógenas en el tejido que promueven este tipo de respuesta.

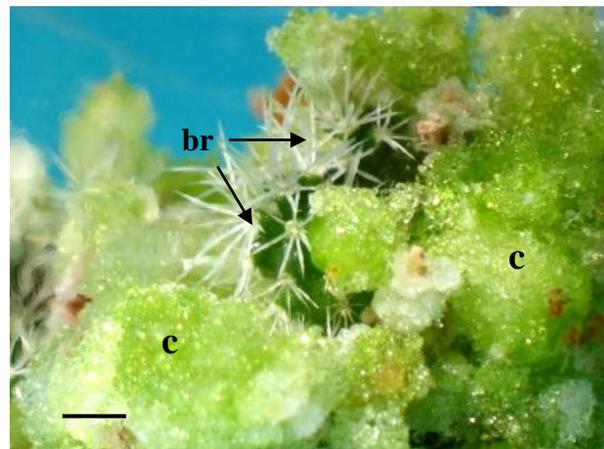


Fig. 8. Desarrollo de callo desmenuzable color verde a partir de explantes de *Thelocactus bicolor* en medio con BA/ANA 0/0.5 mg L⁻¹. Se observa que el callo cubre a los brotes. c, callo; br, brotes. Barra 0.5 cm.

3.2. Rizogénesis

Después de 20 días en el medio de inducción en dos tratamientos (0/0.5 y 1/0) y el control (0/0) se observó el desarrollo de pequeñas raíces en la parte basal de los explantes que estaba en contacto con el medio (Fig. 9). El mayor número de raíces por tratamiento (10, 1.6 raíces por explante) se obtuvo en ANA 0.5 mg L⁻¹ en ausencia de BA, no obstante que las auxinas son las principales inductoras de la rizogénesis, esta respuesta también fue observada en presencia de BA 1 mg L⁻¹ (4 raíces por tratamiento, 0.6 raíces por explante) o en ausencia de ambos reguladores de crecimiento (2 raíces por tratamiento, 0.3 raíces por explante).

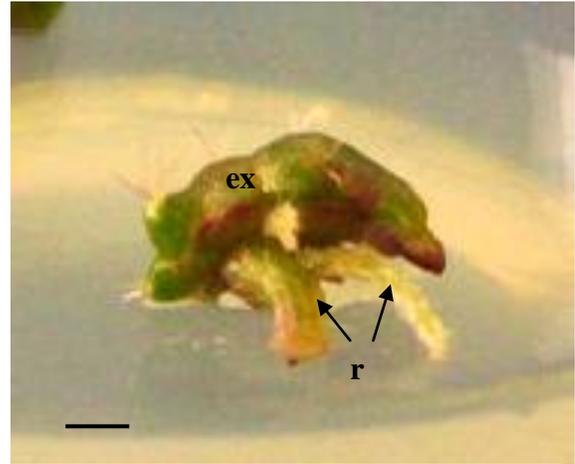


Fig. 9. Formación de raíces en explantes de *Thelocactus bicolor* en BA/ANA 1/0 mg L⁻¹ después de 30 días de cultivo. r, raíz; ex, explante. Barra 0.5 cm.

En la repetición de los mejores tratamientos se encontró que un mayor número de explantes desarrollaron raíces de manera espontánea en el tratamiento con ANA 1mg L⁻¹ (Tabla 4) lo cual podría estar relacionado con el papel que desempeñan las auxinas como promotores de la proliferación celular estimulando la formación y alargamiento de raíces (Evans *et al.*, 2003).

Tabla. 4. Porcentaje de explantes de *Thelocactus bicolor* que desarrollaron raíces en la repetición de los cuatro mejores tratamientos.

BA/ANA mg L ⁻¹	Número de explantes con raíces y %
0/0	13/40 (32.5)
0/0.5	18/40 (45)
0/1	19/40 (47.5)
2/0.5	4/40 (10)

3.3. Organogénesis

Lo brotes se desarrollaron vía directa por activación areolar después de 30 días de inducción. La organogénesis se presentó en ocho de los nueve tratamientos. Durante la primera semana de cultivo, los explantes comenzaron a incrementar su tamaño y las aréolas se observaron muy blancas debido al desarrollo de tricomas.

Después de 35 días se comenzaron a observar pequeñas protuberancias verdes que surgían del ápice de las aréolas (Fig. 10). A las cuatro semanas, los diminutos brotes habían alcanzado 1-2 mm de altura e inició el desarrollo de espinas y tricomas (Figs. 11 y 12).

Los tratamientos que presentaron el mayor número de brotes por tratamiento fueron aquellos en ausencia de la citocinina (Tabla 5).

Estos resultados difieren de lo publicado para la gran mayoría de las cactáceas propagadas *in vitro*, donde la presencia de las citocininas fue indispensable para promover la inducción de brotes, mientras que las auxinas podrán estar ausentes o en bajas concentraciones (Tabla 2). Un buen ejemplo fue reportado por Pérez-Molphe-Balch *et al.*

(1998) para 21 especies de cactáceas, donde la formación de los brotes ocurrió en concentraciones de BA 1 y 2 mg L⁻¹, con (0.01 mg L⁻¹) o sin la auxina ANA, en especies de diversos géneros como *Mammillaria*, *Astrophytum*, *Ferocactus* y *Cephalocereus*, entre otras. En un trabajo más reciente Castro-Gallo *et al.* (2002) trabajaron con 10 especies de diferentes géneros y obtuvieron resultados similares en relación a la proporción citocinina/auxina requerida

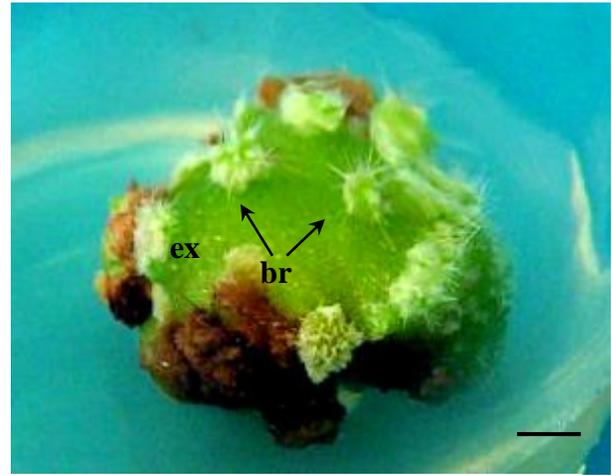


Fig. 10. Desarrollo de brotes en explantes de *Thelocactus bicolor* en BA/ANA 0/0.5 mg L⁻¹ después de 35 días de cultivo. br, brotes de 2 mm de altura; ex, explante. Barra 0.5 cm.

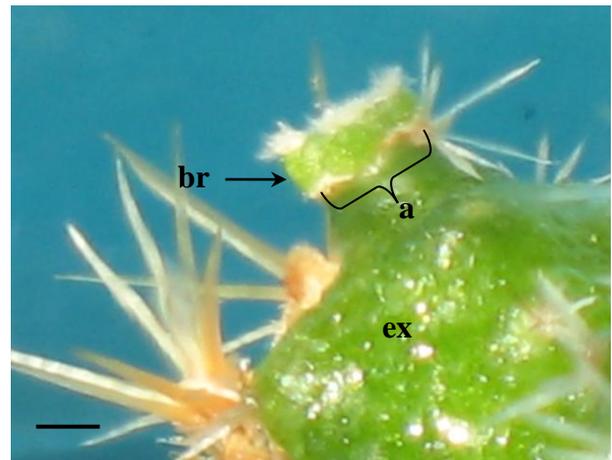


Fig. 11. Formación de brotes a partir de la activación de aréolas en explantes de *Thelocactus bicolor* en BA/ANA 0/0.5 mg L⁻¹ después de 30 días de cultivo. br, brote; ex, explante; a, aréola. Barra 0.2 cm.

para la proliferación de brotes, sin embargo, las concentraciones de citocininas fueron mayores (BA 1, 2, 3 y 4 mg L⁻¹; 2iP 4 y 6 mg L⁻¹) que en el primer caso (BA 1 y 2 mg L⁻¹), sólo para *Corypantha elephantides* fue necesaria la auxina (ANA 0.1 mg L⁻¹) (Tabla 2). Estos trabajos confirman lo señalado por Hubstenberger *et al.* (1992, citado por Rubluo *et al.*, 2002) quienes mencionan que las citocininas exógenas son esenciales para la formación *in vitro* de brotes en la familia de las cactáceas, mientras que las auxinas no son requeridas necesariamente.

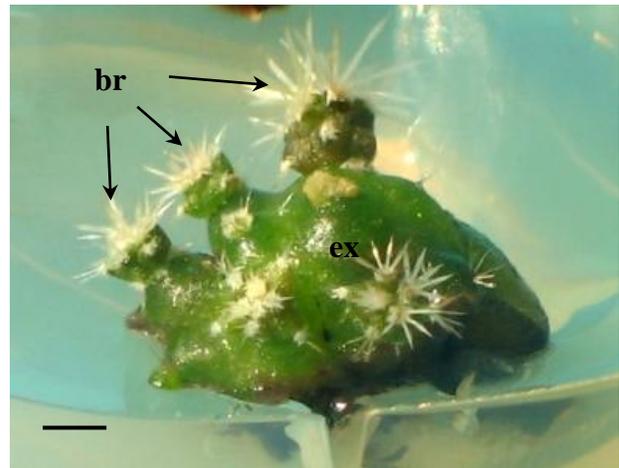


Fig. 12. Brotes diferenciados que surgen a partir de las aréolas de los explantes de *Thelocactus bicolor* después de 60 días de cultivo en el tratamiento control. br, brotes; ex, explante. Barra 0.2 cm.

Existen pocos trabajos en cactáceas donde la sola presencia de auxinas haya promovido la formación de brotes. Rubluo *et al.* (2002) analizaron la influencia de las auxinas como única fuente de regulador del crecimiento exógeno en las respuestas morfológicas de explantes de *Mammillaria san-angelensis* obtenidos de brotes previamente regenerados, mantenidos y subcultivados *in vitro* por siete años. Las auxinas utilizadas fueron AIA, AIB, ANA, y 2, 4-D en concentraciones para cada una de 2, 4 y 6 mg L⁻¹. AIA, AIB y ANA mostraron correlación lineal positiva entre la concentración de auxina y el número de brotes por explante, mientras que con la citocinina 2, 4-D la relación fue negativa.

En la tabla 5 se observa que, para los explantes de *Thelocactus bicolor*, la interacción entre ambos fitoreguladores no resultó tan favorable para la inducción de brotes e incluso el número obtenido de brotes por tratamiento (1/0.5: 5 brotes, 1/1: 4 brotes, 2/0.5: 8 brotes y 2/1: 3 brotes) fue menor que en el tratamiento control (0/0: 9 brotes).

La concentración BA 2 mg L⁻¹ se reporta como una de las más utilizadas exitosamente para la inducción de brotes como en *Nyctocereus serpentinus*, *Carnegie gigantea* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; 2002); *Astrophytum ornatum*, *Mammillaria bocasana* y *Pilosocereus chrysacanthus* (Castro-Gallo *et al.*, 2002), sin embargo en *T. bicolor* la respuesta fue nula. Los mejores tratamientos fueron aquellos en los que la citocinina BA estuvo ausente; siendo el mejor

ANA 0.5 mgL⁻¹ (16 brotes), seguido de ANA 1 mg L⁻¹ (12 brotes) y finalmente el control (9 brotes).

Tabla 5. Número de brotes por tratamiento obtenidos en explantes cultivados *in vitro* de *Thelocactus bicolor* en los distintos tratamientos de BA/ANA.

BA/ANA mg L ⁻¹	Número de explantes con raíces y %	No. de brotes por tratamiento
0/0	3/6 (50)	9
0/0.5	2/6 (33.3)	16
0/1	5/6 (83.3)	12
1/0	1/6 (16.6)	3
1/0.5	1/6 (16.6)	5
1/1	1/6 (16.6)	4
2/0	0	0
2/0.5	2/6 (33.3)	8
2/1	1/6 (16.6)	3

Después de 12 semanas en medio de inducción, algunos brotes presentaron ciertas anomalías comparados con el resto de los brotes, es decir, mostraron tubérculos muy grandes, aréolas con numerosos tricomas de color marrón y aparentemente sin espinas. Estos brotes se desarrollaron aglomerados y la parte basal presentaron una superficie de contacto muy grande con el explante que los originó, lo que imposibilitó posteriormente su individualización (Figs. 13 y 14).

Esta característica se presentó también en *Echinocactus platyacanthus* en donde, los brotes provenientes de tratamientos con BA, mostraron características similares que no permitieron su individualización (Saby *et al.*, 2004). Giusti *et al.* (2002) obtuvieron en *Peleciphora aselliformis* y

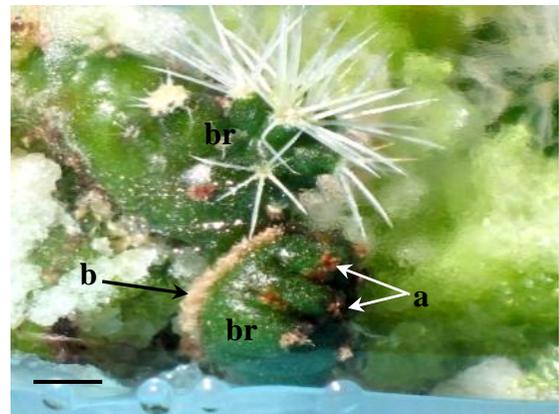


Fig. 13. Brotes de *Thelocactus bicolor* (BA/ANA 2/0.5 mg L⁻¹). El de la parte superior presenta aspecto normal; el de la parte inferior aréolas con tricomas de color marrón (a), la base es muy amplia (b). br: brote. Barra 0.5 cm.

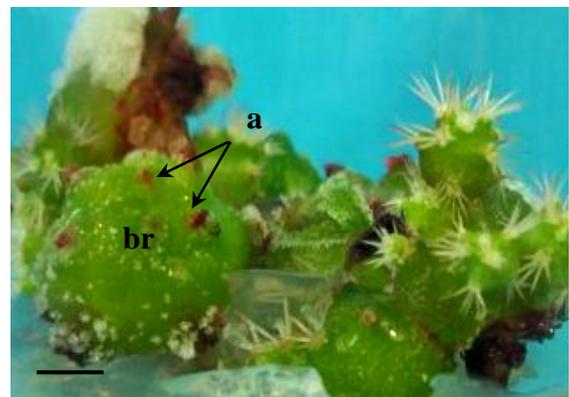


Fig. 14. Brote de *Thelocactus bicolor* (BA/ANA 2/0.5 mg L⁻¹) de aspecto distinto, en donde se aprecian las aréolas de color marrón y aparentemente sin espinas. br: brote, a: aréolas. Barra 0.5 cm.

Mammillaria pectinifera la formación de brotes con características morfológicas distintas a las de estas especies en proporciones de 0.5 y 1%. Por su parte, Rodríguez (2006) reportó el desarrollo de brotes a los que denominó como brotes de apariencia anormal en un 50.25% en los tratamientos con BA. Para *Thelocactus bicolor* se obtuvieron resultados muy similares ya que los brotes de apariencia anormal sólo se observaron en presencia de BA en un 35%.

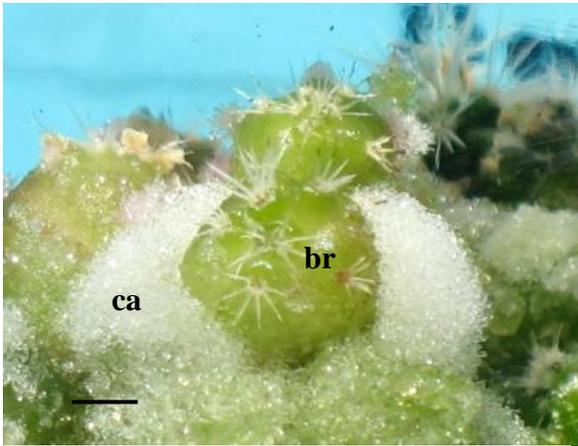


Fig. 15. Brote de *Thelocactus bicolor* con señales de hiperhidratación y rodeado por callo en BA/ANA 1/0.5 mg L⁻¹. br, brote; ca, callo. Barra 0.5 cm.

Simultáneamente a la aparición de los brotes anormales también se presentaron problemas de hiperhidratación. Los brotes hiperhidratados se caracterizaron por presentar color verde más claro que el del explante que los originó, los tejidos se observaron traslúcidos y desarrollaron tubérculos más grandes con espinas más cortas en comparación con el resto de los brotes (Fig.15).

A las 15 semanas de cultivo, ya en el medio basal, los brotes hiperhidratados aumentaron su turgencia y comenzaron a presentar fisuras, después el tejido se desorganizó formando callo verde claro desmenuzable que no fue organogénico (Fig. 16).

Esto concuerda con lo observado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) en varias especies de cactáceas quienes obtuvieron brotes de apariencia traslúcida, con un número reducido de espinas los cuales no fue posible establecer en suelo.

En *Thelocactus bicolor* la hiperhidratación se observó de manera azarosa en siete de los nueve tratamientos (control, 0/0.5, 0/1, 1/0.5, 1/1, 2/0.5, 2/1) en un porcentaje de 26.6%, mayor en comparación con lo que reportó Rodríguez (2006)

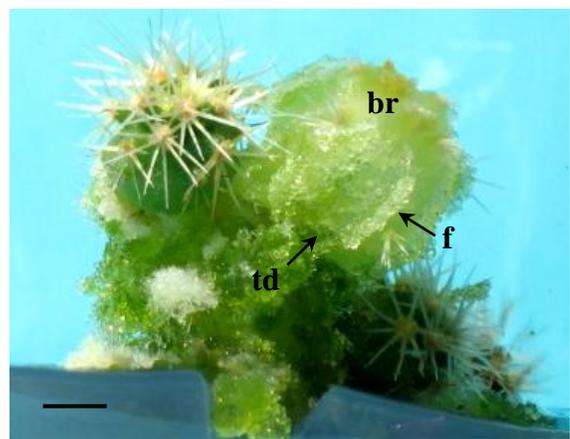


Fig. 16. Brote hiperhidratado de *Thelocactus bicolor*. br, brote; f, fisura; td, tejido desorganizado. Barra 0.5 cm.

para *Echinocactus grusonii* con un 3.6%. Giusti *et al.* (2002) obtuvieron un porcentaje de hiperhidratación del 62% para *Mammillaria pectinífera* y un 63.7% en *Pelecyphora aselliformis*, éstos porcentajes fueron mayores de acuerdo a lo observado para *Thelocactus bicolor*. Castro-Gallo *et al.* (2002) no mencionaron problemas de hiperhidratación para *Thelocactus hexaedophorus*.

Este tipo de respuesta pudo deberse a las condiciones *in vitro*. Dillen y Buysens, (1989 citado por Debergh *et al.*, 1992), señalan que un alto contenido de agua en el medio, el tipo de material y la tapa del contenedor pueden afectar el intercambio gaseoso y permitir que se concentre el vapor de agua, lo que provoca que en los cultivos exista una mayor disponibilidad de agua desencadenando su acumulación en los tejidos. La temperatura, la intensidad luminosa y la calidad del aire en el contenedor también pueden influir en el desarrollo de la planta en cultivo (Brainered y Fichigami, 1981 citado por Debergh *et al.*, 1992; Phan y Hegedus, 1986; Ziv, 1991).

La susceptibilidad a la hiperhidratación varía dependiendo de la especie (Debergh *et al.*, 1992). Rubluo (1997) mencionó que el factor genético juega un papel muy importante en la expresión morfogénica de los cultivos *in vitro*. En algunos reportes como el de Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) se menciona que fue posible contrarrestar la hiperhidratación elevando la concentración de agar de 8 a 10 g L⁻¹ y hasta 12 g L⁻¹. Pan y van Staden (1998) señalan que la adición de carbón activado en el medio de cultivo también contrarresta la hiperhidratación de los tejidos.

En la repetición realizada con los cuatro mejores tratamientos (BA/ANA mg L⁻¹: 0/0, 0/0.5, 0/1 y 2/0.5) se observó el mayor número de brotes por explante (7 brotes) se generó en la última combinación (Tabla 6), cantidad que fue menor a la reportada por Castro-Gallo *et al.* (2002) para *Thelocactus hexaedophorus* donde obtuvieron 13.6 brotes por explante. No obstante en este tratamiento se obtuvo el mayor número de brotes y también se registró el mayor porcentaje de respuesta de los explantes (75%), 25% de los brotes presentaron características morfológicas diferentes y el 67% hiperhidratación. En ambos casos no fue posible individualizarlos por lo que sólo el 8 % de los brotes obtenidos llegó hasta la etapa de enraizamiento.

El promedio de número de brotes por explante en los otros tres tratamientos fue en orden decreciente 0/0.5 (2.87 brotes), 0/0 (2.15 brotes) y 0/1 (1.7 brotes). La respuesta inusual de proliferación de brotes en la sola presencia de la auxina indica que esta especie probablemente posee altas concentraciones de citocininas que promovieron la formación de brotes aún en el tratamiento control así como en combinación con la auxina exógena. Al aumentar la concentración de ésta (1 mg L^{-1}) el número de brotes por explante disminuyó casi en un 50%, sin embargo, fue en este tratamiento donde se obtuvo el menor porcentaje de brotes hiperhidratados (3.2%).

Tabla 6. Evaluación de los cuatro mejores tratamientos para la formación de brotes de *Thelocactus bicolor* después de tres meses en medio de inducción y tres meses en medio sin reguladores de crecimiento.

BA/ANA (mg L^{-1})	Número de explantes con raíces y %	Promedio de brotes por explante	No. de brotes por tratamiento	Brotes hiperhidratados (%)
0/0	12/20 (60)	2.15	43	16.27
0/0.5	13/20 (65)	2.87	57	40
0/1	8/20 (40)	1.7	34	3.2
2/0.5	15/20 (75)	7	70	67

3.4. Regeneración apical

La regeneración apical se observó cuando uno de los explantes conservó el meristemo apical provocado por un corte longitudinal inexacto de la plántula.

Esta respuesta sólo se presentó en tres tratamientos. Después de 20 días en medio de inducción, la zona del corte en contacto con el medio cicatrizó mientras que el ápice se elongó (Fig. 17). Esto se observó sólo en los tratamientos con ANA y en ausencia de BA, siendo el tratamiento 0/0.5 el que presentó el

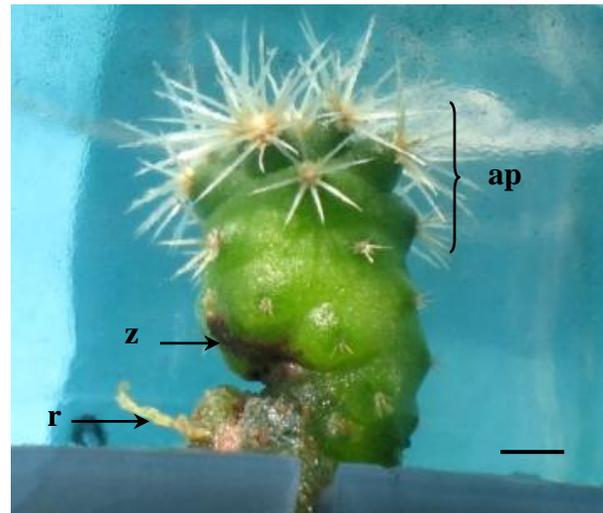


Fig. 17. Regeneración apical de un explante de *Thelocactus bicolor* (BA/ANA 0/0.5). ap, ápice elongado; z, zona de cicatrización; r, raíz. Barra 0.5 cm.

mayor porcentaje (50%), seguidos del tratamiento control y 1 mg L⁻¹ ambos con 33.3%. En la repetición de los cuatro mejores tratamientos, la regeneración apical se presentó nuevamente sólo en presencia de ANA y en ausencia de BA. En la combinación 2/0.5 no hubo respuesta, el mayor porcentaje se observó en el tratamiento control (35%) (Tabla 8).

Tabla 8. Regeneración apical en la repetición de los cuatro tratamientos en *Thelocactus bicolor* después de tres meses en medio de inducción y tres meses en medio sin reguladores de crecimiento.

BA/ANA mg L ⁻¹	Número de explantes con raíces y %
0/0	14/40 (35)
0/0.5	12/40 (30)
0/1	9/40 (22.5)
2/0.5	--

Resultados similares los reportó Tapia (2006) para *Cephalocereus senilis* en donde observó esta respuesta principalmente en presencia de ANA y en ausencia de BA, encontrando el mayor porcentaje (65%) en el tratamiento control. Rodríguez (2006) en *Echinocactus grusonii* reportó 54.44% en presencia de K y 52.22% en el tratamiento control. Probablemente la regeneración apical se presenta en los tratamientos sin reguladores de crecimiento debido a la presencia de reguladores endógenos, en el meristemo apical especialmente auxinas, ya que estas mantienen la dominancia apical y promueven el crecimiento, división y expansión celular (Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003). En el trabajo realizado por Castro-Gallo *et al.* (2002) con *Thelocactus hexaedophorus* no reportaron una respuesta similar.

Los explantes de *Thelocactus bicolor* que presentaron regeneración apical fueron subcultivados en medio sin reguladores de crecimiento y después de ocho días en incubación comenzaron a desarrollar raíces en la parte basal, observándose como una planta completa después de 14 semanas.

2. Individualización y enraizamiento de brotes

El 70% de los brotes desarrollados se diferenciaron del explante que los originó después de tres meses de cultivo por lo que se consideraron aptos para ser individualizados, ya que de esta manera la zona del corte es menor y cicatriza en menor tiempo (Fig. 18). Estos brotes fueron sembrados en medio MS con carbón activado (1.5 g L^{-1}) (Fig. 19) ya que Pan y van Staden (1998) señalan que el carbón activado se ha utilizado de manera satisfactoria para promover el desarrollo de raíces y la elongación de los brotes obtenidos *in vitro*. De igual forma Castro-Gallo *et al.* (2002) en *Pilosocereus chrysacanthus* demuestran que los brotes individualizados que se desarrollaron en medio con carbón activado alcanzaron un mayor tamaño que aquellos sembrados en medio que no lo contenía.



Fig. 18. Brotes de *Thelocactus bicolor* después de tres meses de subcultivo en MS con carbón activado 1.5 g L^{-1} listos para ser individualizados. z, zona de contacto brote- explante reducida; ex, explante. Barra 0.3 cm.

Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* reportaron que además de observar un mayor tamaño de los brotes en medio con carbón activado, éstos también presentaron una mayor eficiencia en el enraizamiento, 87% y 89% respectivamente. Hemphill *et al.* (1998 citado por Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002) mencionan que la reducción de niveles de BA endógenos incrementa el enraizamiento ya que se ha observado en otras plantas que los brotes en etapa de elongación el medio con carbón activado reduce los niveles endógenos de este regulador de crecimiento promoviendo la generación de raíces.

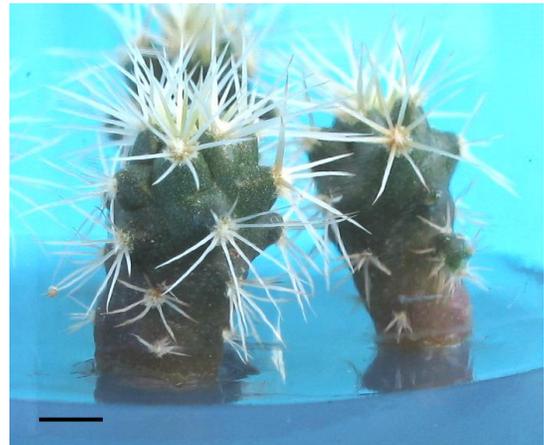


Fig. 19. Brotes de *Thelocactus bicolor* individualizados después de 30 días en medio MS + carbón activado 1.5 g L^{-1} . Barra 0.3 cm.

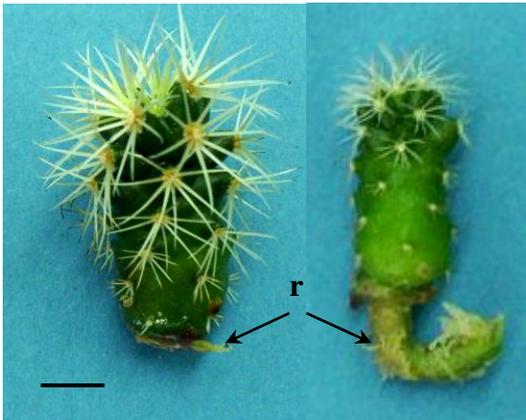


Fig. 20. Brotes enraizados de *Thelocactus bicolor* en medio MS adicionado con carbón activado 1.5 gL⁻¹. r, raíz. Barra 0.5 cm.

Giusti *et al.* 2002 reportaron un alto porcentaje de enraizamiento en medio MS sin reguladores de crecimiento para *Mammillaria pectinifera* (92.5%), *Escobaría minima* (83.5%) y *Peleciphora aselliformis* (76.3%). En varias especies de *Mammillaria* se ha reportado el desarrollo de raíces de manera espontánea sin la necesidad de auxinas (Rubluo, 1997). Sin embargo, existen algunas especies como *Stenocereus thurberi*, *Carnegia gigantea* y *Pachycereus pringlei* en las cuales se encontró que los porcentajes más altos de enraizamiento se lograron en medio adicionado con AIB: 88, 92 y 96% respectivamente (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) e incluso para *Mammillaria huitzilopochtli* Rubluo *et al.* (1993) encontraron que la formación de raíces sólo fue posible en presencia de auxinas (AIA 0.01 mg L⁻¹).

El enraizamiento de los brotes individualizados generados de *Thelocactus bicolor* ocurrió de manera espontánea en un 45% en medio sin reguladores de crecimiento (Fig. 20), este porcentaje fue menor en comparación con lo que reportaron Castro-Gallo *et al.* (2002) para *T. hexaedophorus* donde obtuvieron el 67% de brotes enraizados *in vitro* en medio MS adicionado con AIB 1 mg L⁻¹.

3. Aclimatización y sobrevivencia *ex vitro*

La transferencia de los brotes enraizados generados *in vitro* a condiciones *ex vitro* se considera como la etapa más importante ya que la sobrevivencia de éstas determina el éxito de la micropropagación (Kadleček *et al.*, 2001). Debido a las condiciones especiales en las que crecen las plantas *in vitro*, éstas tienden a presentar deficiencias morfológicas, anatómicas, y fisiológicas como tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares, una gran cantidad de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad así como crecimiento heterotrófico o mixotrófico (Deng y Donnelly, 1993 citado por Pospíšilová *et al.*, 1999), por lo que durante las primeras semanas del trasplante a condiciones *ex vitro* es necesario controlar los

factores ambientales para evitar el exceso de transpiración de las plantas hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y de la cutícula, manteniendo una alta humedad relativa hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones (Hu y Wang, 1983, Kadleček *et al.*, 2001).



Fig 21. Plantas de *Thelocactus bicolor* después de 12 meses en condiciones de invernadero.

El porcentaje de sobrevivencia en suelo de los brotes enraizados *in vitro* de *Thelocactus bicolor* fue de 81% de un total de 113 brotes (Fig. 21), este porcentaje fue menor en comparación a lo reportado por Castro-Gallo *et al.* (2002) para *T. hexaedophorus* quienes obtuvieron un 90% de sobrevivencia, sin embargo, no mencionan el número de brotes que lograron transferir a condiciones *ex vitro*.

En *Thelocactus bicolor* la principal causa de mortandad durante la etapa de aclimatización fue la excesiva pérdida de agua en los tejidos de las plantas. Fila *et al.* (1998, citado por Pospíšilová *et al.*, 1999) mencionan que en los cultivos *in vitro* la desecación de los tejidos es la principal causa de muerte debido a que en esta etapa muchas de estas plantas no logran un desarrollo adecuado de raíces presentando una baja capacidad en el transporte de agua, y ya que en condiciones de invernadero la incidencia luminosa es mucho más alta y la humedad relativa es menor, la pérdida de agua de las plantas es mucho mayor lo que provoca su muerte.

Es importante señalar que el presente trabajo es el único que reporta la propagación *in vitro* de *Thelocactus bicolor* y el segundo para el género.

VII. CONCLUSIONES

- La escarificación con ácido sulfúrico (H_2SO_4) fue esencial para promover la germinación de las semillas de *Thelocactus bicolor*.
- El proceso de desinfección empleado para las semillas de *T. bicolor* permitió su establecimiento *in vitro* en condiciones asépticas.
- El desarrollo de callo se presentó en todos los tratamientos incluyendo el tratamiento control.
- La presencia de ANA estimuló el desarrollo de un mayor número de raíces adventicias en los explantes.
- El mayor número de brotes por explante se observó en el tratamiento BA/ANA 2/0.5 (7) $mg L^{-1}$, pero un 35% de los brotes generados se desarrollaron con anomalías morfológicas que no permitieron su individualización y se manifestó el mayor porcentaje de hiperhidratación en un 67%.
- Los mejores tratamientos para la propagación *in vitro* de *T. bicolor* fueron en orden decreciente ANA 0.5 $mg L^{-1}$, el tratamiento control y ANA 1 $mg L^{-1}$, obteniéndose un promedio de 2.87, 2.5 y 1.7 brotes por explante respectivamente.
- Los brotes regenerados desarrollaron raíces en MS 50% con carbón activado 1.5 $g L^{-1}$ sin la necesidad de utilizar reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.
- El porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de los brotes enraizados de *T. bicolor* fue del 81% (92/113), siendo este el primer reporte de micropropagación para esta especie

VIII. ANEXO I

Ubicación taxonómica de la especie *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton y Rose (Bravo-Hollis, 1978, Guzmán *et al.*, 2003).

Reino	Vegetal
Subreino	Embriophyta
División	Traqueophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledonea
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cactoideae
Tribu	Cactoideae
Subtribu	Cacteeae
Género	<i>Thelocactus</i>
Especie	<i>bicolor</i>
Subespecie	<i>bicolor</i> <i>bolaensis</i> <i>flavidispinus</i> <i>schwarzii</i>

Descripción botánica (Bravo-Hollis, 1978)

Plantas en su mayoría simples, los *tallos* son de ovoides hasta cilíndricos de 7 a 20 cm y en ocasiones hasta 35 cm de altura y de 5 a 15 cm de diámetro de color verde glauco, sus *tubérculos* se encuentran dispuestos en costillas. El número de *costillas* es de 8 a 13, redondeadas, rectas o un poco espiraladas; sus *aréolas* son circulares o algo alargadas, las *espinas* son radiales numerosas, 7 a 18 y hasta 25, delgadas, 1 a 3 superiores hasta de 75 mm de longitud. Centrales generalmente de 1 a 4 de 2.5 a 3 cm de longitud; sus *flores* se encuentran dispuestas en el ápice de la planta, de 5 a 6.5 cm de longitud y 5 a 6 cm de diámetro; el pericarpelo es globoso, verdoso, provisto de escamas, segmentos exteriores del perianto de color rosa púrpura; segmentos interiores del perianto de color rosa purpúreo, con la base más oscura y rojiza. *Semillas* de 2.5 mm de longitud, de 1.75 mm de ancho y 1.25 mm de espesor; hilo basal circular; testa reticulado-papilosa, negra. *Fruto* pequeño de cerca de 12 mm de longitud y 9 a 12 mm de diámetro, provisto de escamas, de color castaño rojizo. Esta especie consta de cuatro variedades var. *bicolor*, var. *flavidispinus*, var. *bolaensis* y var. *Schwarzii*.

IX. ANEXO II

Formulación medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), 1962

	(g L ⁻¹)
• Macronutrientos	
NH ₄ NO ₃	1.65
KNO ₃	1.90
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.37
KH ₂ PO ₄	0.17
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.44
• Micronutrientos	
KI	0.00083
H ₃ BO ₃	0.0062
MnSO ₄ · H ₂ O	0.01689
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0086
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.000025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.000025

COMPUESTOS ORGÁNICOS

• Solución de Fierro-EDTA	
Na ₂ EDTA	0.0373
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0278
• Vitaminas	
Ácido nicotínico	0.0005
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.0005
Tiamina-HCl (B ₁)	0.0001
• Aminoácidos	
Inositol	0.10
Glicina	0.002
• Sacarosa	
	30

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anaya, A. 1986. Optimización en la proliferación de callo e inducción de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* var. *potosina*. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 116 pp.
- Anderson, E. 1987. A revision of the genus *Thelocactus* B. y R. (Cactaceae). *Bradleya* 5:49-76.
- Arias, S. 1991. Riqueza y conservación: Algunas observaciones sobre las cactáceas en México. Reporte interno. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. 25 pp.
- Ault, R. J. y J. W. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes*. *HortScience* 22:26-27.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* 32: 2-5.
- Benítez, H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 4:8-11.
- Bonga, J. y P. von Aderkas. 1992. *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 236 pp.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. UNAM. México, D. F. 743 pp.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México 233 pp.
- Castro-Gallo, I., E. Meza-Rangel, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2002. Propagación *in vitro* de 10 Especies de Cactáceas Mexicanas. *Scientia Naturae* 4(2):5-24.
- CITES. 2003. Check list of species CITES. WCM-PNUMA. 339 pp.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País. CONABIO, México.
- Cox, G. 1997. Conservation Biology. McGraw Hill Company, Inc. E. U. A. 362 pp.
- Dabekaussen, M. A., Z. Pierick, J. Vander y H. Sporans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba*. Rausch. *Sci Hort.* 46:283-294.
- Dávila-Figueroa, C., Ma. De la Rosa-Carrillo, E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:540-545.

- Debergh, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman y M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30:135-140.
- Evans, D. E., J. O. Coleman y A. Kears. 2003. *Plant cell culture*. Scientific Publishers. E. U. A. 194 pp.
- Fay, M. F. 1993. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. 3:176-183.
- Fay, M. F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents. A literature review and report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Flores-León, R. y M. Ortíz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* Pfeiffer through areole activation of etiolated plant. *Haseltonia*. Year book of the cactus and succulents of America. 7:92-96.
- Garay, R. B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri*. *Cactus and Succulent Journal* 64:116-119.
- García-Saucedo, P. A., M. Valdez-Morales, M. Valverde, A. Cruz-Hernández y O. Paredes-López. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80:215-219.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32:272-289.
- Gentry, A. 1996. Species extirpations and the current extinction rates: A review of the evidence. En: CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). *La diversidad biológica de México: Estudio de País*, CONABIO, México.
- George, E. F. y P. D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Hand book and Directory of Commercial Laboratories*. Gran Bretaña. 690 pp.
- Gibson, A. y P. Nobel. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press. Londres. 285 pp.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 1-14 pp.
- Gómez, K. R. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. 57-79 pp.

- González, F. 2001. Conservación y caracterización de recursos fitogénicos. Publicaciones I. N. E. A. Valladolid. 279 pp.
- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM-CONABIO. México. 315 pp.
- Gratton, J. y M. F. Fay. 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. En: Pollard J. W. y J. M. Walter (eds.). Methods in molecular Biology, vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 219-225.
- Haberer, G., J. Kieber. Cytokinins. 2002. New insights into a classic Phytohormone. Plant Physiology 128:354-362.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester; F. T. Davies y R. L. Geneve. 1997. Plant propagation: Principles and Practices. Prentice Hall. E. U. A. 770 pp.
- Hu, C.V. y J. P. Wang. 1983. Meristem Shoot tip and bud cultures. En: Evans, D. A., P. V. Ammirato y Y. Yameda (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. McMillan Publishing, New York. 177-227 pp.
- Hurtado, D. y M. Merino. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México. 232 pp.
- Inventario Nacional Forestal 2000. <http://132.248.14.16/forestal/resultados.html> (02 de Diciembre de 2006)
- IUCN. 1994. IUCN Red List Categories. IUCN, Gland Suiza.
- Jiménez, G. E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba 13-24 pp.
- Johnson, J. L y E. R Emino. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. Cactus and Succulent Journal 51:275-277.
- Kadleček, P., I. Tichá, D. Haisel, V. Čapková y C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. Plant Science 161: 695-701.
- Kolár, Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig. through tissue cultures. Experientia 32: 668-669.
- Lebowitz, R. 1995. Plant Biotechnology and Laboratory Manual. WCB. U.S.A. 114 pp.
- Lynch, P. 1999. Tissue culture techniques *in vitro* plant conservation. En: Benson E. (Ed.). Plant Conservation Biotechnology. Taylor and Francis. Reino Unido. 41-62 pp.

- Mauseth, J. D. y W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 62: 869-877.
- Mauseth, J. D. 1977. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal U.S.A.* 49:80-81.
- Mauseth, J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal* 51:186-187.
- Mauseth, J. D. 1990. Continental Drift, Climate and the Evolution of Cacti. *Cactus and Succulent Journal E. U. A.* 62:302-308.
- Mittermeier, R. A., C. Goettsh y P. Robles. 1997. Megadiversidad: Los países biológicamente más ricos del mundo. Cemex. México.
- Moebius-Goldammer, K., M. Mata-Rosas y V. Chávez-Ávila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39:388-393.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:173-479.
- Olguín, S. L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 85 pp.
- Pan, M. J. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation.* 26:155-163.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. Pérez-Reyes, C. Dávila-Figueroa, E. Villalobos-Amador, E. Meza, L. Morones y H. Lizal. 1998. *In vitro* culture of 21 species of mexican cacti. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E. y C. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. Pérez-Reyes, C. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cactus from the Sonoran Desert. *HortScience* 37:693-696.
- Pérez Ponce, J. N. 1998. Variación somaclonal. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.* Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. 105-121 pp.

- Phan, C. T. y P. Hegedus. 1986. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called “vitreous plants”. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83-94.
- Pospíšilová, J., Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzánková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497.
- Ramírez, C. 2000. Estudio de la variación genética en poblaciones naturales de dos especies endémicas y amenazadas de *Thelocactus spp* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 76 pp.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, inc. E. U. A.
- Rodríguez, G.M. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 77 pp.
- Rosas-López, U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Gross.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto. fa. *Grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *International Journal of Experimental Botany* 213-220.
- Rubluo, A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En: Y. P. S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. Alemania. 40: 193-205.
- Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95:341-349.
- Saby, V. L. López-Escamilla A. L. Márquez G. J. 2004. Efecto de las citocininas-auxinas en la formación de brotes adventicios de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). Resúmen XVI Congreso Mexicano de Botánica, Oaxaca, México.
- Santos-Díaz, M., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogénesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39:480-484.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de marzo de 2002, México, D. F.

- Smith, R. 1992. Plant tissue culture, techniques and experiments. Academic Press Inc. California. 171 pp.
- Tapia, D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73 pp.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh P. C. y R. H. Zimmerman (Eds). Micropropagation. Kluwer Academic Publisher. Holanda. 45-49 pp.