



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN *in vitro* DE  
BROTOS DE *Echinocactus grusonii* (CACTACEAE)  
UTILIZANDO MEDIO LÍQUIDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIOLÓGA**

P R E S E N T A:

**CLARA DOLORES SOTO CORTES**

DIRECTORA DE TESIS:

**M. EN C. LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS**



México D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México

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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Soto  
Cortes  
Clara Dolores  
44443708  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305174378

### 2. Datos del tutor

M. en. C.  
Laura Patricia  
Olguín  
Santos

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Manuel  
Chávez  
Ávila

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Ana Laura  
López  
Escamilla

### 6. Datos del sinodal 4

Biól.  
Alma Yadira  
Martínez  
Rendón

### 7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la regeneración *in vitro* de brotes de *Echinocactus grusonii* (Cactaceae) utilizando medio líquido.  
75p  
2013

El presente estudio se realizó bajo la dirección de la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller titulado “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Institucionales**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios y así estudiar esta carrera maravillosa.
- Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, por facilitar sus instalaciones y equipo necesario para el desarrollo de este proyecto.
- Al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por la donación de semillas.
- A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, Técnico Académica de la Unidad de Ambientes Controlados por la asesoría técnica y por facilitar el uso de cámaras de ambientes controlados e invernadero.
- A la M. en C. María Eugenia Muñoz Díaz de León, Técnico Académica, Biología de Plantas, Taller de plantas I y II, por la asesoría técnica y facilitar el uso de instalaciones y equipos necesarios para la realización de este proyecto.
- A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos y la Dra. Ana Laura López Escamilla por todo el apoyo y paciencia para dirigir este proyecto, y compartir conmigo sus conocimientos y consejos, por enseñarme que el cultivo de tejidos vegetales es más que una técnica, muchas gracias.
- A las profesoras del taller “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”; Patricia Olguín, Ana Laura López, Margarita Collazo, Judith Márquez, Sonia Vázquez y Karina Jiménez, por darme las bases para desarrollar y defender un proyecto.
- A todos mis profesores que contribuyeron en mi formación como Bióloga, al ser una fuente de aprendizaje y enseñarme el maravillosa mundo de las plantas, especialmente a Beatriz González Hidalgo, Aurora Zlotnik Espinosa, Citlati Yuriria Núñez Mariel y Octavio González Caballero.
- Y por último a la Dra. Judith Márquez Guzmán, al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, a la M. en C. Laura Patricia Olguín, a la Dra. Ana Laura López Escamilla y a la Biól. Alma Yadira Martínez Rendón por la revisión de este trabajo.

## **Dedicatoria**

### **A Dios:**

*Por darme la vida y esta maravillosa familia.*

### **A mis padres:**

*Ceferina Cortes Hernández y José de Jesús Ávila Salazar por apoyarme en todo momento de la vida, por sus regaños, por sus consejos, por su paciencia, por que hicieron todo lo posible para que yo lograra este sueño, pero sobre todo por su amor...los amo y gracias por todo.*

### **A mis hermanos:**

*Valentina, Ana y Franco, por estar conmigo siempre, por brindarme su apoyo en todos los sentidos, por su cariño, por confiar en mí y ayudar a cumplir este sueño, los quiero mucho.*

### **A mis amigas (os):**

*Nancy Vizuet y Gustavo Giles por esas pláticas enriquecedoras, por ser parte de mi vida, los quiero.*

*Al laboratorio de invertebrados, especialmente a M. en C. Pilar Torres, Biól. Erika Palacios, Diego Cortés, Omar Millán, Guadalupe Romero, Guadalupe García, Abraham Sánchez, Daniela Mejía...por su valiosa amistad, apoyo y por las maravillosas experiencias vividas a lo largo de la carrera, los quiero.*

*A mis amigas (os) del UNIVERSUM especialmente a Luis Meza, Brenda Morales, Janet Palma, Ariana Martínez, Alejandra Piña, Verónica Granados, Alicia Lovera, Jessica Peña, Fátima García, Luis Romario y Raquel...por las risas, las bromas, su conocimiento, pero sobre todo por su amistad.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Desarrollo en Plantas, especialmente a Lorena, Alejandra Isidoro y Nancy Cándido.*

*A Miguel Herrera...por tu cariño y amistad.*

*A Fernando Cuéllar...por tu apoyo y amistad.*

## **ABREVIATURAS**

<b>2, 4-D</b>	Ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético
<b>2iP</b>	N <sup>o</sup> - 2, Isopentenil adenina
<b>AIA</b>	Ácido Indol-3-acético
<b>AIB</b>	Ácido Indol-3-butírico
<b>ANA</b>	Ácido $\alpha$ Naftalenacético
<b>BA</b>	N <sup>o</sup> Benciladenina
<b>CTV</b>	Cultivo de Tejidos Vegetales
<b>K</b>	Kinetina
<b>MS</b>	Medio Murashige y Skoog, 1962
<b>MS 50%</b>	Medio Murashige y Skoog al 50% de sus componentes
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana-059-SEMARNAT-2010
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>Z</b>	Zeatina

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>ÍNDICE</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	6
2.1 Generalidades de las cactáceas.....	6
2.2 Descripción general del género <i>Echinocactus</i> .....	9
2.3 Descripción general de <i>Echinocactus grusonii</i> Hildmann.....	9
2.4 Distribución geográfica de <i>Echinocactus grusonii</i> .....	11
2.5 Problemática de <i>Echinocactus grusonii</i> .....	12
2.6 Conservación de cactáceas.....	13
2.7 Cultivo de tejidos vegetales .....	14
2.7.1 Micropropagación.....	16
2.7.2 Reguladores de crecimiento.....	20
2.7.3 Problemas frecuentes en el cultivo <i>in vitro</i> .....	21
2.7.4 Medio de cultivo sólido .....	22
2.7.5 Cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas empleando medio sólido .....	25
2.7.6 Medio de cultivo líquido.....	26
2.7.7 Estudios realizados <i>in vitro</i> empleando medio líquido .....	27
2.8 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Echinocactus grusonii</i> .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
4.1 Objetivo general .....	32
4.2 Objetivos particulares .....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
5.1 Escarificación y desinfección de semillas .....	33
5.2 Siembra de semillas <i>in vitro</i> en medio sólido y líquido .....	33
5.3 Inducción, proliferación y subcultivo de brotes .....	34
5.4 Individualización y enraizamiento de brotes .....	35
5.5 Aclimatización y establecimiento <i>ex vitro</i> .....	35
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	37
6.1 Escarificación y desinfección de semillas .....	37

6.2 Germinación <i>in vitro</i> en medio líquido y sólido.....	37
6.3 Desarrollo de las plántulas .....	40
6.4 Oxidación de explantes en el medio de inducción .....	44
6.5 Respuestas morfogénicas en medio sólido y líquido .....	45
6.5.1 Rizogénesis directa .....	45
6.5.2 Formación de brotes por activación de aréolas.....	46
6.5.3 Formación de brotes y raíces morfológicamente diferentes.....	49
6.5.4 Hiperhidratación de brotes.....	51
6.6 Proliferación de brotes en medio MS 50% sólido .....	52
6.7 Individualización y enraizamiento de brotes .....	55
6.8 Aclimatización y sobrevivencia <i>ex vitro</i> .....	56
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>8. ANEXOS</b> .....	62
8.1 Anexo 1. Descripción botánica de <i>Echinocactus grusonii</i> Hildmann .....	62
8.2 Anexo 2. Formulación de los medios de cultivo MS y MS 50% (Murashige y Skoog, 1962) ....	63
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64

## RESUMEN

*Echinocactus grusonii* (Cactaceae), especie endémica de México, se distribuye en los estados de Querétaro e Hidalgo. Su restringida distribución geográfica, el amplio uso ornamental y la destrucción de su hábitat la sitúan en la categoría En Peligro de Extinción de la NOM-059-SEMARNAT-2010. La propagación de cactáceas por cultivo de tejidos vegetales ha utilizado generalmente medios de cultivo sólidos, sin embargo, se ha observado que la inducción y el desarrollo de brotes en medio de cultivo líquido produce mejores resultados, dado que los nutrimentos están con mayor disponibilidad para el explante en ausencia del agente gelificante. Por lo anterior, en este trabajo se utilizó a *Echinocactus grusonii* como modelo para evaluar la regeneración de brotes *in vitro* en medio líquido (puentes de papel filtro). El material vegetal inicial fueron semillas de *E. grusonii* sembradas en medio Murashige y Skoog líquido y sólido al 50% de sus componentes. El porcentaje de germinación *in vitro* después de 60 días fue mayor en medio sólido (78%) que en líquido (57%) sin embargo, a los 40 días de cultivo, la longitud de las plántulas en medio líquido fue mayor (1.2 cm) que en sólido (8 mm). De estas plántulas se obtuvieron explantes longitudinales de tallos, los cuales se sembraron en medio Murashige y Skoog líquido y sólido adicionado con N<sup>6</sup>-2 isopentenil adenina 3 mgL<sup>-1</sup>. La formación de brotes ocurrió vía directa por activación de aréolas. El promedio de brotes por explante fue mayor en medio líquido (3) que en sólido (1.8) a los 90 días de inducción. Los brotes obtenidos se individualizaron y enraizaron en medio Murashige y Skoog basal sólido, observando la formación de raíces de manera espontánea después de seis días. El 97% de los brotes individualizados formaron raíces. Los brotes enraizados se aclimatizaron, obteniendo 95% de sobrevivencia *ex vitro*. Con base en lo anterior, se propone el uso de medio líquido ya que hizo más eficiente el sistema de propagación, pues promovió la elongación de las plántulas facilitando la obtención de explantes e incrementó la regeneración *in vitro* de brotes en *Echinocactus grusonii*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es nativa del continente Americano, en México, esta vegetación abarca el 40% del territorio desarrollándose principalmente en el matorral xerófilo (Hernández y Godínez, 1994; Arias, 1997; Becerra, 2000; Mandujano *et al.*, 2002; Carmona-Lara *et al.*, 2008). Un gran número de especies pertenecientes a esta familia se encuentran en peligro de extinción, resultado de la modificación y destrucción de hábitats por las diversas actividades humanas (Arias, 1997). En consecuencia, 276 especies de esta familia están incluidas dentro de la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) (SEMARNAT, 2010).

Diversas especies de cactáceas se propagan convencionalmente por semillas y tallos con raíz (esquejes), sin embargo estos procesos son lentos, además de obtener un número menor de plantas, por lo que las técnicas de cultivo de tejidos vegetales resultan una alternativa viable para la producción de varias especies, entre ellas las cactáceas, ofreciendo ventajas como generar un gran número de individuos a partir de un solo explante con crecimiento acelerado, en menor tiempo, libre de enfermedades, en espacios relativamente reducidos y durante todo el año (Hartmann *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Trejo *et al.*, 2005; George *et al.*, 2008). Parte del éxito de estas técnicas depende del medio de cultivo, puesto que suministra anclaje, nutrición y la estimulación del desarrollo al explante. Cuando se utiliza medio sólido, sólo la superficie inferior del explante está en contacto con el medio, lo que significa que no hay una absorción uniforme de los nutrimentos en toda la superficie del explante. El crecimiento y desarrollo en un medio líquido puede resultar mejor, ya que el explante absorbe los nutrimentos por toda su superficie; por otra parte, el crecimiento en medio líquido también implica que cualquier exudado de la planta se diluya con más facilidad que en un medio con agar, donde pueden producirse acumulaciones locales (Pierik, 1990; Rojas *et al.*, 2004; George *et al.*, 2008). La mayoría de los trabajos sobre propagación de cactáceas reportan el uso de medio sólido (Frías, 1989; Anicua y Rivas, 2000; Flores, 2004; Lizalde-Viramontes *et al.*, 2004; Galván, 2005; Rodríguez, 2006; Martínez, 2007). En el presente trabajo, se empleó como modelo a *Echinocactus grusonii*, especie que se encuentra en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-

2010 (SEMARNAT, 2010), para evaluar el porcentaje de germinación y regeneración *in vitro* de brotes usando medio líquido con el fin de optimizar su propagación, contribuyendo así a su conservación y en un futuro cubrir parte de su demanda comercial.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Generalidades de las cactáceas**

Las cactáceas son originarias del continente americano agrupando cerca de 2000 especies, su principal centro de diversificación es México, se estima que en el país hay 669 especies, y que más del 70% de los géneros y de las especies son endémicas. Se distribuyen principalmente en las zonas áridas y semiáridas representadas por los desiertos de Sonora y Chihuahua, las selvas bajas caducifolias y la zona de depresión del Balsas, cubriendo casi la mitad del territorio nacional (Hernández *et al.*, 2007; Jiménez, 2011).

La familia Cactaceae pertenece al orden Caryophyllales, y se divide en cuatro subfamilias Pereskioideae, Cactoideae, Opuntioideae y Maihuenioideae (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001).

Con mínimas evidencias en el registro fósil, las cactáceas son consideradas por los especialistas, entre ellos Gibson y Nobel (1986), como un grupo natural que ha evolucionado en los últimos 80 a 60 millones de años a partir de formas no suculentas, desarrollando adaptaciones tanto morfológicas, fisiológicas como reproductivas que les han permitido enfrentarse a condiciones climáticas adversas de las zonas áridas, permitiendo a su vez, la diversificación de especies y formas de vida, estableciéndose en varios ecosistemas (Arias, 1997; Becerra, 2000; Nobel 2002). Entre estas adaptaciones están la estructura suculenta o crasa de sus tallos, la cual les permite acumular gran cantidad de agua en sus tejidos; sus hojas se han reducido o están ausentes con lo cual disminuyen la evapotranspiración, la fotosíntesis se lleva a cabo en la superficie de sus tallos; el pecíolo está transformado en una estructura llamada podario o tubérculo y las yemas de crecimiento están transformadas en estructuras denominadas aréolas, que es una yema de tejido meristemático, esto es, un conjunto de meristemas (células no diferenciadas) muy compactos en las cuales se desarrollan flores, frutos, espinas, lana, cerdas y pelos, cuya abundancia, número y tamaño varían dependiendo

de la especie. Los tallos conforman básicamente el cuerpo de la planta, engrosado por el desarrollo del parénquima, son verdes porque en ellos se encuentra el parénquima clorofílico. Varían en forma, tamaño y ramificación. Los tallos aplanados en forma de raqueta, denominados cladodios, son particulares del género *Opuntia*. Los tallos columnares o cilíndricos se observan en órganos o pitayos, éstos pueden ser simples y carecer de ramificación o ser ramificados (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Scheinvar, 2004; Jiménez, 2011; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012).

Desde una perspectiva fisiológica, los cactus se distinguen de la mayoría de las plantas porque al igual que otras plantas suculentas, su fotosíntesis sigue una ruta metabólica conocida como metabolismo ácido crasuláceo o CAM (por sus siglas en inglés), en la cual los estomas permanecen abiertos durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día, resultando de esta manera en una pérdida mínima de agua y fotorrespiración reducida (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Geydan y Melgarejo, 2005; Jiménez, 2011).

Sus flores son hermafroditas, es decir, en una misma flor están presentes los estambres (órganos masculinos) y el gineceo (órgano femenino); su forma, tamaño y color varían según la especie. Los frutos son muy diversos y éstos producen desde una hasta más de mil semillas que varían en tamaño, forma y características estructurales, las cuales pueden alcanzar porcentajes de germinación altos (superior al 70%). La germinación comienza con la hidratación de la semilla y culmina con la emergencia de la radícula (Barthlott y Hunt, 2000; Ruedas *et al.*, 2000; Jiménez, 2011).

De manera general, en muchas semillas es común que se presente latencia, que es definida como un estadio en el cual la semilla no germina aun cuando las condiciones de temperatura, agua y oxígeno son favorables para su germinación (Raven *et al.*, 1992; Pimienta *et al.*, 2006). Existen dos tipos de latencia, la primera denominada innata que se origina durante el proceso de desarrollo o maduración de las semillas, la cual es producida por las cubiertas duras de las semillas y por la presencia de embriones inmaduros, este tipo de latencia puede ser superado por tratamientos químicos, por ejemplo, empleando ácido sulfúrico. La latencia relacionada con embriones inmaduros se considera como fisiológica debido a que las semillas no germinan por algún efecto externo. El segundo tipo es

el forzado, que es la inhabilidad de germinar debido a restricciones como falta de agua, temperaturas bajas o poca aireación (Pimienta *et al.*, 2006).

Las cactáceas cumplen un rol importante en los ecosistemas constituyendo un elemento esencial en el paisaje, gracias al sistema radicular amplio y superficial que forma una malla que interviene en los procesos de erosión y desertificación de los suelos. Así mismo las raíces poseen pelos absorbentes caducos que constituyen una fuente continua de materia orgánica que se incorpora al suelo; además, interaccionan con diversos organismos, desarrollando estrechas relaciones con otras especies vegetales denominadas “plantas nodrizas” que ofrecen condiciones de humedad y temperatura para el establecimiento de nuevos cactus (Novoa *et al.*, 2005).

Las cactáceas en México constituyen un grupo de plantas excepcionalmente diverso por su gran variedad morfológica y taxonómica, sin embargo, el uso de esta familia es muy variado y se remonta a épocas prehispanicas. Los primeros datos que se tienen acerca de su uso en nuestro territorio provienen de Tehuacán, Puebla, y son de hace 6 500 a 10 000 años, siendo utilizadas principalmente como fuente de alimento, de forraje, para obtención de sustancias químicas de interés medicinal y farmacológico, como materia prima para la construcción de diversas herramientas e incluso han llegado a tener un significado divino al ser utilizadas en ceremonias religiosas o algunos ritos, creencias y costumbres de algunos grupos étnicos. Sin embargo, en la actualidad el principal uso de esta familia es como plantas de ornato; la afición de coleccionistas por adquirir plantas exóticas representa una presión para las poblaciones silvestres, además existen otros factores como la agricultura, la ganadería, los asentamientos humanos, el desarrollo industrial, la construcción de carreteras, los tendidos de líneas eléctricas y telefónicas, la extracción de materiales para la construcción, la construcción de presas y, sobre todo, la colecta ilegal de ejemplares para el comercio nacional e internacional que atenta directamente contra la conservación de las poblaciones naturales, contra los productores establecidos que cumplen con todos los requerimientos de la ley y contra la población en general, al no pagar impuestos y crear las condiciones para el empobrecimiento irremediable de la diversidad biológica (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Becerra, 2000; Márquez,

2000; Benítez y Dávila, 2002; Mandujano *et al.*, 2002; Nobel, 2002; Álvarez *et al.*, 2004; Bárcenas, 2006; Chávez *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2007; Hernández-Oria *et al.*, 2007; Alanís y Velazco, 2008; Martorell y Peters, 2009; Jiménez, 2011).

## **2.2 Descripción general del género *Echinocactus***

Las características morfológicas distintivas de este género son la forma globosa a cilíndrica que presenta su tallo con numerosas costillas, su gran tamaño y un ápice provisto de una densa masa lanosa de donde surgen sus flores amarillas, además de frutos secos, amarillentos y escamosos, semillas lisas de color negro y micrópilo próximo al hilo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Scheinvar, 2004). La mayoría de las especies pertenecientes a este género se conocen como “cactus barril” siendo los más representativos de los desiertos norteamericanos, como el Chihuahuense, Sonorense y el semidesierto Queretano (Anderson, 2001; Hernández *et al.*, 2007; Hernández-Oria *et al.*, 2007; Carmona-Lara *et al.*, 2008; Jiménez, 2011).

Britton y Rose (1963) reconocieron nueve especies en este género, seis de ellas endémicas de México (*E. grusonii* Hildmann., *E. horizonthalonius* Lemaire, *E. parryi* Engelman, *E. platyacanthus* Link y Otto, *E. polycephalus* Engelman y Bigelow, y *E. texensis* Hopffer), las cuales se distribuyen en tres principales zonas áridas de México: la Queretano-Hidalguense, la Chihuahuense y la Sonorense (Scheinvar, 2004).

## **2.3 Descripción general de *Echinocactus grusonii* Hildmann**

La forma del tallo de esta especie es globosa, alcanzan hasta 130 cm de altura y 80 cm de diámetro. Su principal característica es la presencia de espinas color amarillo oro o dorado, así como lana amarillenta en el ápice, además de sus flores con tépalos aguzados y puntas agudas de color café, por estas características es conocida como “barril dorado”, “biznaga de bola” y “asiento de suegra” (Figura 1, Anexo 1). Florece de junio a agosto (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Glass, 1998;

Gómez, 2001; Guzmán *et al.*, 2003; Scheinvar, 2004; Sánchez *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se presenta su clasificación taxonómica.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cactoideae
Tribu	Cacteeae
Género	<i>Echinocactus</i>
Especie	<i>Echinocactus grusonii</i> Hildmann



Figura 1. *Echinocactus grusonii*. a) Plantas adultas; b) Flor en antesis; c) Frutos; d) Semillas y e) Saqueo ilegal de plantas adultas.

Tomado de:

<http://blogs.ua.es/cactus/2012/04/23/doodle-del-dia-de-la-tierra-cactus-en-peligro-de-extincion/>

## **2.4 Distribución geográfica de *Echinocactus grusonii***

Es una especie endémica de México, específicamente de los estados de Querétaro e Hidalgo; en Querétaro su distribución se encuentra restringida al municipio de Cadereyta de Montes, en las laderas del Cerro Prieto que miran hacia el cañón del río Moctezuma, mientras que en Hidalgo se distribuye en el norte de la cortina de la Presa de Zimapán (Scheinvar, 2004; Sánchez *et al.*, 2006) (Figura 2). El Infiernillo, en la Barranca del Moctezuma, es su distribución original (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991), en donde ocupaba ambas laderas de la Garganta en los límites políticos de Querétaro e Hidalgo. Antes de la construcción de la Presa Fernando Hiriart Balderrama (Presa de Zimapán), en la década de los noventas, las poblaciones se localizaban desde el poblado La Vega hasta 8 km aguas arriba de la Boquilla (confluencia de los ríos San Juan y Tula, lugar conocido como el Infiernillo) por el río Tula y, desde ese punto hasta 7 km el río Moctezuma; el Biólogo Rafael Ortega Varela señala que el desarrollo del Proyecto Hidroeléctrico afectó el 50% del área de distribución de esta especie (Sánchez *et al.*, 2006). Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) mencionan que también se distribuye en San Luis Potosí, sin embargo, Sánchez y colaboradores (2006) señalan que no hay registros fidedignos de que haya existido en esta entidad federativa. Se encuentra principalmente en matorrales xerófilos, en cañadas y pendientes muy marcadas, con suelo rocoso y clima semidesértico a una altitud de 800 a 2000 msnm (Scheinvar, 2004; Sánchez *et al.*, 2006).

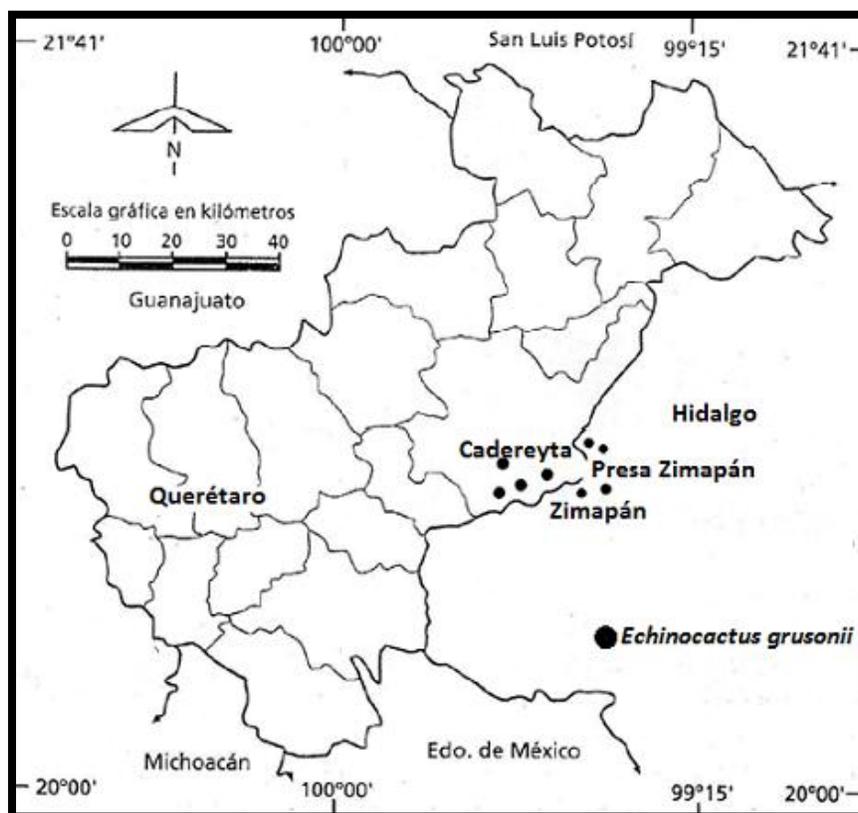


Figura 2. Mapa de distribución geográfica de *Echinocactus grusonii*. Con puntos se señalan las áreas donde se distribuye (Tomado y modificado de Scheinvar, 2004).

## 2.5 Problemática de *Echinocactus grusonii*

Actualmente, las poblaciones silvestres de *E. grusonii* están prácticamente extintas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Bárcenas, 2006; Jiménez, 2011). Hernández-Oria y colaboradores (2007) mencionaron que la densidad poblacional de esta especie en el Semidesierto Queretano es extremadamente baja (menos de 50 individuos). Esta situación se debe principalmente a la transformación y destrucción antropogénica de su hábitat (Fitz Maurice y Fitz Maurice, 2002) y recientemente, Jiménez (2011) señala que aunque existen ejemplares de *E. grusonii* en los jardines botánicos de diversas partes del mundo, sus poblaciones naturales casi han desaparecido debido a que las zonas donde eran más abundantes han quedado cubiertas por las aguas de la presa Zimapán construida en los noventa, quedando menos de 10 km<sup>2</sup> de área de ocupación. Actualmente *E. grusonii* es extraída de su hábitat natural en forma ilegal para utilizar su tallo globoso para la elaboración del tradicional dulce de acitrón (Alanís y Velazco, 2008) y en Hidalgo se emplea para

peinar la fibra de ixtle (Bravo-Marentes, 1999), y al ser una especie de gran belleza debido al color amarillo de sus espinas es altamente codiciada como planta ornamental, por tal motivo, Bárcenas (2006) indica que el comercio internacional de *E. grusonii* es muy común; siendo Estados Unidos, el Reino Unido, Alemania, Suecia, México, España, Italia y Canadá los principales líderes de comercio legal, sin embargo, también señala que las plantas madre posiblemente fueron colectadas ilegalmente de sus hábitats naturales, por tanto, el comercio legal no asegura que el comercio ilegal no ocurra. Por lo anterior, *Echinocactus grusonii* se cultiva en colecciones particulares y en jardines botánicos nacionales e internacionales, por ejemplo el Jardín de cactáceas de Villa Hambury en Italia, pero sobre todo es ubicada en la categoría Peligro de Extinción (P) por la NOM-059-SEMARNAT-2010, y la IUCN la ubica en la categoría Peligro Crítico (CR) (Fitz Maurice y Fitz Maurice, 2002; Scheinvar, 2004; Bárcenas, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2007; SEMARNAT, 2010).

## **2.6 Conservación de Cactáceas**

La conservación es una disciplina dedicada a la preservación, el rescate, el mantenimiento, el estudio y la utilización del patrimonio que representa la biodiversidad, y puede realizarse en dos modalidades: *in situ* y *ex situ*. Estas dos modalidades son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones, en el mediano y largo plazo (Pezoa, 2001).

La conservación de especies amenazadas dentro del hábitat natural o *in situ* implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas, de manera que la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida; el proceso de conservación *in situ* se inicia con el estudio y seguimiento en el tiempo de las poblaciones, recabando datos demográficos, genéticos y autoecológicos. Por otro lado, la conservación *ex situ*, en cautiverio o en colecciones, es la aplicación de una amplia variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyen a la recuperación y sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de su hábitat (Iriondo, 2001; Pezoa, 2001; Lascuráin *et al.*, 2009). Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación

*in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción. Dentro de las ventajas que proporcionan estos métodos están el control directo sobre el material, la fácil accesibilidad y la disponibilidad. Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies amenazadas consta de dos elementos, el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación (Iriondo, 2001).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) contribuye a la conservación *ex situ*, debido a que representa una alternativa para la propagación de los recursos vegetales. Las diferentes técnicas del CTV se han empleado para el estudio y propagación de una gran variedad de especies de cactáceas amenazadas y/o en peligro de extinción (Por ejemplo, *Turbinicarpus laui*, *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora aselliformis*, *Astrophytum ornatum*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Leuchtenbergia principis*, entre otras). Por lo tanto con el CTV es posible, junto con las acciones tomadas *in situ*, contribuir significativamente a la conservación de especies en peligro de extinción, ya sea mediante la propagación masiva de especies de interés comercial que satisfagan la demanda del mercado, con lo que se podría reducir la presión de colecta de individuos en las poblaciones naturales; y por otro lado, combinado con estudios genéticos y ecológicos puede ser la base para reintroducir individuos a sus hábitats originales (Lascuraín *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009).

## **2.7 Cultivo de Tejidos Vegetales**

La biotecnología vegetal tiene como una de sus bases el CTV, cuyo origen se remonta a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, la cual indica que todas las células vegetales tienen el potencial para regenerar

una planta completa, este principio es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Litz y Jarret, 1993; Jiménez, 1998; Trigiano y Gray, 2000; Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

El cultivo de tejidos vegetales puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento de fragmentos de tejidos (explantes) a partir de prácticamente cualquier parte de una planta (órganos, células, protoplastos) que se cultivan bajo condiciones asépticas, ambientales (temperatura, intensidad luminosa y fotoperiodo) y nutricionales (medios de cultivo) controladas. Con estas técnicas es posible producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente pequeños y durante todo el año (Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2004). El éxito o fracaso de estas técnicas depende de cuatro aspectos, el primero es la etapa de desarrollo del explante a utilizar, ya que por lo general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*, así mismo, el tipo de explante que se elija será determinante para la obtención de la respuesta deseada; el segundo es el medio de cultivo, puesto que la elección y adecuada formulación son uno de los aspectos fundamentales, ya que las sustancias que los componen influyen en el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*, lo que incluye a los reguladores de crecimiento vegetal empleados, puesto que estos influyen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de las semillas; tercero, las condiciones asépticas, para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo cualquier tipo de organismos contaminantes, y el cuarto, el genotipo de la planta donadora (Roca y Mroginski, 1993; George *et al.*, 2008).

Las aplicaciones de estas técnicas van desde ser la base de estudios teóricos sobre genética (Giménez *et al.*, 2008), fisiología (Martínez, 2007; Loaiza, 2008) y química vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Vojnov *et al.*, 2010), la propagación masiva (Quiala *et al.*, 2004; Rosa-Carrillo *et al.*, 2012), la producción *in vitro* de compuestos naturales de alto valor en cultivos de células u órganos vegetales, la obtención de materiales mediante la selección *in vitro*, la conservación de germoplasma vegetal mediante la criopreservación o almacenamiento de mínimo crecimiento

(Espinoza *et al.*, 1992; García-Águila y Karen, 2007; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010), la selección de variantes somaclonales y mutantes, la biosíntesis de metabolitos secundarios a escala industrial (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, así como la selección *in vitro* y el cultivo de brotes y raíces principalmente para la obtención de aceites esenciales y compuestos (Pierik, 1990; Villalobos y Thorpe, 1993; Jiménez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Trigiano y Gray, 2000; Rojas *et al.*, 2004; Calva y Pérez, 2005; Molina *et al.*, 2005).

### **2.7.1 Micropropagación**

La multiplicación de plantas es sin duda la aplicación más utilizada del cultivo *in vitro*, sus bases fueron establecidas desde los años 50 y 60 del siglo XX, pero la verdadera industria de la micropropagación se estableció en los años 70 y 80 (Kitto, 1997). La micropropagación se define como la propagación de plantas en gran cantidad utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Ésta es una de las aplicaciones más utilizadas de entre todas las técnicas que componen la biotecnología vegetal, debido a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación de plantas (Villalobos y Thorpe, 1993; Orellana, 1998a; Hartmann *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Iriondo, 2001). Consta de cinco etapas:

- **Etapla 0. Selección de la planta madre.** Se trata de una etapa preparativa, en la cual se selecciona y acondiciona a la planta madre que será utilizada como fuentes de explantes, la cual debe cumplir con requisitos fitosanitarios para reducir la probabilidad de enfermedades y contaminación (Hartmann *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Kane, 2000; Trigiano y Gray, 2000; George *et al.*, 2008).
- **Etapla 1. Establecimiento de los cultivos asépticos.** Consiste en la elección del explante y su desinfección con el fin de contrarrestar o eliminar la contaminación generada por la presencia de hongos, levaduras o bacterias. Para la desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes el hipoclorito de sodio (NaOCl) y de calcio (CaOCl), el

peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) y el etanol (EtOH) en diferentes concentraciones. La penetración del agente desinfectante en superficies rugosas o pubescentes del tejido vegetal se puede incrementar con la adición de agentes tensoactivos como el Tween 20. La selección y concentración de los desinfectantes se determina por las características del explante (Villalobos y Thorpe, 1993; Hartmann *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008).

- **Etapas 2. Multiplicación.** Es en esta etapa donde se realiza la micropropagación, obteniéndose un gran número de brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. Para esto, los explantes se colocan en un medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para la regeneración de brotes. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas axilares preexistentes.

La **organogénesis** se refiere a la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión vascular entre los nuevos brotes y el tejido parental. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callo, que es una masa indiferenciada de células (Orellana, 1998b; Rojas *et al.*, 2004). La **embriogénesis** somática es posible gracias a que las células o tejidos de la planta tienen la capacidad de desarrollarse en un embrión a través de la manipulación de las condiciones del cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento, esto es, el desarrollo de una planta a partir de células somáticas o haploides en ausencia de fertilización. Cuando los embriones se originan directamente del explante en ausencia de una etapa de callo se dice que la embriogénesis es directa, y cuando hay etapa de callo para el desarrollo del embrión entonces la embriogénesis es indirecta (Zimmerman, 1993; Gómez, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2004). Entre los factores que influyen en la organogénesis y embriogénesis están aquellos relacionados con el explante (su edad fisiológica, su tamaño y el estado de diferenciación), la composición química del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento (usualmente se induce la

respuesta cuando se emplean medios adicionados con auxinas o una proporción alta de auxina-citocinina) (George y Sherrington, 1984; Roca y Mroginski, 1993). La **multiplicación por yemas axilares preexistentes** parte de meristemas para la obtención de una o varias plantas completas, además no implica fenómenos de desdiferenciación y rediferenciación celular como los que ocurren en la organogénesis y embriogénesis. En la tabla 2 se muestran ejemplos de especies que han sido regeneradas por las diferentes vías de multiplicación *in vitro*. Se puede observar que en las cactáceas, la formación de brotes se da principalmente por organogénesis directa.

**Tabla 2. Algunos ejemplos de cactáceas y otras especies regeneradas por las diferentes vías de multiplicación *in vitro*.**

Especie	Vía de multiplicación <i>in vitro</i>	Referencia
<i>Ariocarpus retusus</i>	Embriogénesis somática	Stuppy y Nagl, 1992
<i>Ariocarpus retusus</i>	Embriogénesis somática	Olguín, 1994
<i>Ariocarpus kotschobeyanus</i>	Embriogénesis somática	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>Echinocactus grusonii</i>	Organogénesis directa	Rodríguez, 2006
<i>Astrophytum ornatum</i>	Organogénesis directa	Mendoza, 2007
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	Organogénesis directa	Flores, 2007
<i>Laelia anceps</i> ssp. <i>dawsonii</i>	Embriogénesis somática	Lee-Espinosa <i>et al.</i> , 2009
<i>Echinocereus reichenbachii</i>	Organogénesis directa	Gutiérrez, 2009
<i>Aporocactus flagelliformis</i>	Organogénesis directa	Lara, 2010
<i>Lophophora williamsii</i>	Organogénesis directa	Pérez, 2010
<i>Turbincarpus knuthianus</i>	Organogénesis directa	Villavicencio <i>et al.</i> , 2011
<i>Coffea canaphora</i>	Embriogénesis somática	Fuentes, 2013

- **Etapa 3. Elongación y enraizamiento.** En esta etapa lo que se pretende es que los brotes formen su sistema radical y al mismo tiempo estimular su elongación para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. Para favorecer la elongación se emplean medios nutritivos suplementados con bajas concentraciones de citocininas o libre de reguladores de crecimiento, mientras que para promover el enraizamiento de los brotes se emplean auxinas como el ANA y el AIB (Villalobos y Thorpe, 1993). El enraizamiento en cactáceas, puede llevarse a cabo en ausencia de auxinas empleando medio MS completo o al 50% de sus componentes (Quiala *et al.*, 2004).
- **Etapa 4. Aclimatización.** Las plantas enraizadas *in vitro* presentan características que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el periodo de cultivo *in vitro*. Entre éstas se encuentran la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las

plantas regeneradas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales que evitan la pérdida de agua (cutícula poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado) (George y Sherrington, 1984). Debido a esto, es necesario adaptarlas de forma paulatina al medio externo. Como son cultivos libres de patógenos, las plantas no han activado sus mecanismos de resistencia naturales, por lo que es necesario trabajar en las condiciones más limpias posibles (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Aún cuando el proceso de aclimatización se realiza cuidadosamente, generalmente se obtienen bajas tasas de supervivencia, en cactáceas como *Echinocereus dubius*, *Mammillaria craigii*, *Mammillaria sphaelata*, se han reportado bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro* (50, 55 y 55% respectivamente) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), esto se debe principalmente a un modo heterotrófico de nutrición y el poco control en la pérdida de agua con el que cuentan la plantas (Trigiano y Gray, 2000). Esta es una de las fases más difíciles durante la micropropagación de cactáceas ya que se requiere de un adecuado manejo de las condiciones de riego e iluminación, cuando el riego es excesivo, los cactus son afectados por pudriciones (Quiala *et al.*, 2004).

Esta metodología ha mostrado importantes ventajas y desventajas, algunas de ellas se mencionan en la Tabla 3 (Villalobos y Thorpe, 1993; Collin y Edwards, 1998; Iriondo, 2001; Evans *et al.*, 2003; Razdan, 2003; Rojas *et al.*, 2004; George *et al.*, 2008).

**Tabla 3. Ventajas y desventajas de la micropropagación**

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Incremento acelerado del número de plantas por cada explante.</li> <li>➤ Reducción del tiempo de multiplicación.</li> <li>➤ Producción permanente del material, es decir, no hay estacionalidad.</li> <li>➤ Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida.</li> <li>➤ Mayor control sobre la sanidad del material propagado.</li> <li>➤ Posibilidades de multiplicar con rapidez una especie de la cual se posea pocos individuos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Requiere de técnicas avanzadas e instalaciones y equipos especializados.</li> <li>➤ Se requiere desarrollar métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie.</li> <li>➤ Las plántulas inicialmente son muy pequeñas.</li> <li>➤ Variación somaclonal.</li> <li>➤ Para que sea factible su aplicación se requiere que la propagación del genotipo de interés sea rápida, eficiente y menos costosa que la propagación convencional o comercial que se tenga registrada, destacando sus diferencias en cuanto a su volumen de producción, calidad y uniformidad.</li> </ul>

### **2.7.2 Reguladores de crecimiento**

Las fitohormonas (de origen endógeno) son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, estimulando, inhibiendo o modificando procesos fisiológicos en las planta. Estas sustancias, se han extraído o producido sintéticamente para su aplicación exógena en el medio de cultivo con el fin de controlar las respuestas morfogénicas de los tejidos en las técnicas de cultivo *in vitro*, estas son llamadas reguladores de crecimiento vegetal (Barba, 1991; Roca y Mroginski, 1993; George *et al.*, 2008). En la actualidad, las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno, el ácido abscísico, el triacontanol, los brasinoesteroides, las turgorinas y las poliamidas, son considerados dentro del grupo de hormonas y reguladores de crecimiento. En cultivos *in vitro* generalmente son utilizadas las auxinas, las citocininas y las giberelinas. La adición de estos reguladores al medio en diferentes concentraciones, pueden estimular o detener el crecimiento y/o la diferenciación de algunos órganos en la planta, por tal motivo, la utilización de éstos en diferentes concentraciones y la mezcla de varios, hace posible manipular algunos procesos morfogénicos de la planta (Calva y Pérez, 2005; Rojas *et al.*, 2004). A continuación se describen los principales reguladores de crecimiento utilizados para la regeneración de plantas en el CTV.

- **Auxinas.** Constituyen un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptófano, implicados en eventos relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular, tales como la acidificación de la pared celular, el inicio de la división, la formación de tejidos no diferenciados (callo), la diferenciación del tejido vascular, y la formación de órganos (raíces). Además, la adición de la auxina en el medio de cultivo, generalmente mitiga el efecto de la citocinina sobre la elongación de los brotes, pero en conjunto, incrementan el número de brotes y su longitud apropiada para su posterior enraizamiento; las auxinas más utilizadas son el ácido indolacético (AIA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol butírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA), Dicamba y Picloram (Krikorian, 1993; Collin y Edwards, 1998; Trigiano y Gray, 2000; Rojas *et al.*, 2004; Calva y Pérez, 2005; George *et al.*, 2008).

- **Citocininas.** Generalmente son derivadas de adenina y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Su principal función es la estimulación de la división celular, romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas laterales. Aunque los brotes en crecimiento son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de citocininas, es conocido que éstas son insuficientes para soportar el desarrollo y crecimiento *in vitro*, por tal razón más del 85% de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen como suplemento alguna citocinina. Las citocininas más comunes son la zeatina (Z), la isopentil adenina (2iP), el ribósido de zeatina, la bencilaminopurina o benciladenina (BAP o BA) y la kinetina (K) (Krikorian, 1993; Hartmann *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Quiala *et al.*, 2004; Calva y Pérez, 2005; George *et al.*, 2008).

### **2.7.3 Problemas frecuentes en el cultivo *in vitro***

Aún cuando el cultivo de tejidos vegetales representa una gran ventaja, en diversas ocasiones se presentan problemas en los cultivos, tanto en medios líquidos como sólidos, ocasionando que no se obtengan resultados mucho más prometedores. Entre los problemas más comunes que se pueden presentar están la contaminación de los cultivos (medio y/o explantes), la hiperhidratación y la oxidación de los tejidos *in vitro*.

- **Contaminación:** La presencia y desarrollo de microorganismos en los cultivos *in vitro* se genera por una mala esterilización del medio de cultivo que además conforma un ambiente propicio para su desarrollo, y el no realizar adecuadamente la técnica de desinfección del material vegetal o la inoculación (Debergh y Zimmerman, 1991).
- **Hiperhidratación:** El exceso de nutrientes o de carbohidratos, los altos niveles de reguladores de crecimiento, la baja intensidad luminosa y, sobre todo, la elevada humedad relativa y la alta disponibilidad de agua en el medio, provocan desordenes anatómicos, morfológicos y fisiológicos en los tejidos cultivados *in vitro*. Los brotes hiperhidratados presentan una apariencia turgente, con una epidermis acuosa, en algunos casos pierden la

coloración y tienden a desorganizarse. Anatómicamente se trata de una hipertrofia de las células del parénquima y de los espacios intercelulares. Se incrementa el espacio intercelular y el volumen de aire contenido en los espacios, además de que los vasos y traqueidas están probablemente no lignificados, lo anterior causa que los tejidos tomen un aspecto vítreo presentando deformaciones (Hartmann *et al.*, 1997; Kevers *et al.*, 2004). Este fenómeno ocurre en mayor proporción en medio líquido y con menor frecuencia en medio sólido, altas concentraciones del agente gelificante evita en gran medida este problema, de igual manera ha resultado útil disminuir la concentración de citocininas o agregando agentes antivitrificantes (Hartmann *et al.*, 2002).

- **Oxidación:** La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, puede definirse como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas que son compuestos fitotóxicos y pueden llevar a la muerte del explante (Amiot *et al.*, 1996 y Bray *et al.*, 2000 citados por Azofeifa, 2009). La presencia de estos compuestos está condicionada a una serie de factores como pueden ser la edad fisiológica del explante (tejidos jóvenes contienen menores cantidades de compuestos fenólicos), el tamaño del área dañada por el corte y por el contenido natural de los mismos; cuando se presenta este fenómeno el explante se caracteriza por presentar una coloración negra o marrón (Collin y Edwards, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Razdan, 2003; Kevers *et al.*, 2004; Hazarika, 2006; George *et al.*, 2008).

#### **2.7.4 Medio de cultivo sólido**

A lo largo de las diferentes etapas de la micropropagación es necesario el empleo de medios de cultivo, que son el conjunto de elementos fisicoquímicos que integran la sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida o líquida) que suministra anclaje, nutrición y la estimulación del desarrollo al explante (Rojas *et al.*, 2004). Es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las

células crezcan sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés (Calva y Pérez, 2005). El desarrollo de estos medios se dio a finales de los años 50, los primeros medios utilizados fueron semisintéticos, frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura (Orellana, 1998a; Calva y Pérez, 2005). En la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo de composición conocida que cumplen con los requerimientos necesarios para sostener el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*; dentro de los más utilizados están el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968). De manera general todos los medios están compuestos por: a) sales minerales que se encargan de dar el soporte nutritivo de las plántulas, estas sales contienen macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Mo, Zn y Co) que son requeridos por cualquier planta para su desarrollo normal; b) una fuente de energía como sacarosa, que es la más empleada, sin embargo también se puede utilizar glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa, almidón y melaza; éstas remplazan el carbono que la planta fija normalmente de la atmósfera por medio de la fotosíntesis; c) vitaminas que son necesarias para la realización de una serie de reacciones catalíticas en los sistemas enzimáticos; las que más se incluyen en la preparación de medios son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina; d) aminoácidos que se utilizan como fuente de nitrógeno; la glicina, caseína hidrolizada, la glutamina, la asparagina y la adenina son las más empleadas, y e) elementos orgánicos como los reguladores de crecimiento y materiales de soporte; sin embargo, la composición del medio depende de la especie vegetal que se cultivará y de la etapa del proceso de micropropagación (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Razdan, 2003; Rojas *et al.*, 2004; Calva y Pérez, 2005; Muñoz de Malajovich, 2006; Mroginski *et al.*, 2010).

Dentro de los materiales de soporte para medios sólidos el más utilizado es el agar, cuyo componente es la agarosa, un polisacárido extraído de las algas marinas pertenecientes a la familia de las Rodophyceae (Razdan, 2003; Rojas *et al.*, 2004). Sin embargo, es importante señalar que el agar comercial contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del

medio de cultivo, afectando así directamente los tejidos cultivados (Szabados *et al.*, 1993). Además, el agar es capaz de retener el agua (cuanto mayor es la concentración de agar, mayor es la fuerza con la que el agua es retenida) y adsorber compuestos. Si la concentración de agar se incrementa, resulta difícil para los explantes la absorción de los nutrimentos. Otros materiales son el Phytigel® y el Gelrite® que se componen de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa (Pierik, 1990; Razdan, 2003). Otro inconveniente de utilizar medios sólidos tiene que ver con el proceso de preparación, dosificación, manipulación y el aumento de los costos por unidad que puede oscilar entre 70% y 90% del costo del medio de cultivo. Es por eso que en muchos casos se ha recurrido al empleo de medios en estado líquido (Orellana, 1998b). En la Tabla 4 se muestra el costo total para la preparación de 1 litro de medio de cultivo sólido y líquido (sin la presencia del agente gelificante).

**Tabla 4. Componentes del medio MS, y su respectivo costo (todos los costos fueron consultados en la Distribuidora Sigma-Aldrich, 2013)**

	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )	Cantidad (g)	Costo del producto (MXP) y cantidad (g)	Costo por gramo (MXP)	Costo para 1L MS (MXP)
<b>COMPUESTOS INORGÁNICOS</b>					
<b>❖ Macroelementos</b>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1.650	\$754.00 (500g)	\$1.508	\$2.48
KNO <sub>3</sub>	1900	1.900	\$454.00 (5g)	\$90.8	\$172.52
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	370	0.370	\$1159.00 (250g)	\$4.636	\$1.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	0.170	\$418.00 (100g)	\$4.18	\$0.71
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	440	0.440	\$551.00 (25g)	\$22.04	\$9.69
<b>❖ Microelementos</b>					
KI	0.83	0.00083	\$4460.00 (1000g)	\$4.46	\$0.003
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.0062	\$667.00 (500g)	\$1.334	\$0.008
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	22.3	0.0223	\$431.00 (100g)	\$4.31	\$0.096
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.6	0.0086	\$510.00 (100g)	\$5.1	\$0.043
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.25	0.00025	\$1118.00 (100g)	\$11.18	\$0.002
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.025	0.000025	\$1050.00 (500g)	\$2.1	\$0.0000525
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.025	0.000025	\$444.00 (25g)	\$17.76	\$0.000444
<b>❖ Solución de Fe-EDTA</b>					
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	37.3	0.0373	\$384.00 (100g)	\$3.84	\$0.143
FeSO <sub>2</sub> •7H <sub>2</sub> O	27.8	0.0278	\$862.00 (500g)	\$1.724	\$0.047
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>					
<b>❖ Vitaminas</b>					
Ácido nicotínico (B3)	0.5	0.0005	\$957.00 (500g)	\$1.914	\$0.000957
Piridoxina-HCl (B6)	0.5	0.0005	\$562.00 (25g)	\$22.48	\$0.011
Tiamina-HCl (B1)	0.1	0.0001	\$248.00 (5g)	\$49.6	\$0.004
<b>❖ Inositol</b>					
myo-Inositol	100	0.1	\$699.00 (50g)	\$13.98	\$1.398
<b>❖ Glicina</b>					
	2	0.002	\$527.00 (50g)	\$10.54	\$0.021
<b>❖ Agar bacteriológico</b>					
		8	\$2959.00 (250g)	\$11.836	\$94.68
<b>❖ Sacarosa</b>					
		30	\$552.00 (250g)	\$2.20	\$33.00
<b>Total con agar</b>			<b>\$19,766.00</b>		<b>\$316.60</b>
<b>Total sin agar</b>			<b>\$16,807.00</b>		<b>\$221.91</b>

### 2.7.5 Cultivo *in vitro* de cactáceas empleando medio sólido

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido aplicadas satisfactoriamente en la propagación de diferentes especies amenazadas de la familia Cactaceae, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material vegetal de partida requerido; en la Tabla 5 se muestran algunos trabajos realizados sobre propagación *in vitro* en estas especies, en los cuales el medio utilizado fue el MS sólido, las especies que más se han propagado son las del género *Mammillaria* y, los reguladores de crecimiento más empleados son las citocininas BA, K y 2iP, que promueven la formación de brotes.

**Tabla 5. Estudios realizados sobre la propagación *in vitro* en diferentes especies de la familia Cactaceae donde se reporta el uso de medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) sólido.**

ESPECIE	EXPLANTE	RCV (mgL <sup>-1</sup> )	PROMEDIO BROTE/EXPLANTE	REFERENCIA
<i>Ariocarpus retusus</i>	Centrales, laterales, tubérculos y raíces	BA (2) 2iP (1)	BA: 48, 2iP: 25	Olgúin, 1994
<i>Mammillaria elongata</i>	C.T. de Brote floral	BA/ANA (5, 0.1/0.2, 0.1)	10.3	Papafotiou <i>et al.</i> , 2001
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Longitudinal	K(2)	14	Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>Mammillaria conspicua</i>	Longitudinal	2iP (2)	N.E.	Fuentes y Martínez, 2001
<i>Cephalocereus senilis</i>	Aréolas	BA/ANA (3/0.3)	N.E.	Choreño-Tapia <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria pectinifera</i>	Longitudinal	TDZ/ANA (2.27/0.5)	3.5	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Pilosocereus</i> sp.	Longitudinal	6-BA (1)	2.28	Montalvo <i>et al.</i> , 2004
<i>Turbincarpus valdezianus</i>	Apical, lateral y transversal	BA (0.5)	7.8	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005
<i>Neobuxbamia tetetzo</i>	Yemas axilares	2iP (15)	15	Galván, 2005
<i>Ferocactus glaucescens</i>	Longitudinal	BA (2, 5)	5	Santos, 2005
<i>Thelocactus rinconensis</i>	Apical y lateral	A: 2iP/ANA (1/0.1) L: BA/ANA (1/0.1)	A: 4; L: 6	Díaz, 2007
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	Apical y lateral	BA (1)	A: 7.5; L:21.25	Flores, 2007
<i>Astrophytum ornatum</i>	Longitudinal	K, BA (2)	K: 5.95, BA: 2.93	Mendoza, 2007
<i>Browningia candelaris</i>	Transversal	BA (0.5)	8.4	Sánchez-Moran y Pérez-Molphe-Balch, 2007
<i>Thelocactus bicolor</i>	Longitudinal	ANA (0.5)	2.87	Zamora, 2007

Continuación: Especie	Explante	RCV	Promedio Br/Ex	Referencia
<i>Peniocereus greggii</i>	Transversal	BA/AIB (4/0.2)	3.4	Cortés <i>et al.</i> , 2008
<i>Echinocereus reichenbachii</i>	Lateral	BA (0.5)	6	Gutiérrez, 2009
<i>Aporocactus flagelliformis</i>	C.T. de tallo joven	BA/ANA (1/0.1)	10.6	Lara, 2010
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	Apical	2iP (2)	0.9	Manzo, 2010
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Apical	2iP/ANA (3/0.2)	1.6	Manzo, 2010
<i>Coryphanta retusa</i>	Apical y lateral	BA (2)	9	Ruvalcaba-Ruiz <i>et al.</i> , 2010
<i>Lophophora williamsii</i>	Apical y transversal	BA (1.5)	4.8	Pérez, 2010
<i>Turbincarpus knuthianus</i>	Segmentos apicales	K/AIB (10/1)	10	Villavicencio <i>et al.</i> , 2011

**Abreviaturas:** **K:** Kinetina; **ANA:** Ácido naftalenacético; **BA:** Benciladenina; **A:** Apical; **L:** Lateral; **C.T.:** Corte transversal; **N.E.:** No especificado; **2iP:** N<sup>6</sup>-2, isopentenil adenina; **AIB:** Ácido indol butírico. **TDZ:** Tiazuron; **RCV:** Reguladores de crecimiento vegetal; **Br/Ex:** brote/explante

### 2.7.6 Medio de cultivo líquido

Los medios de cultivo líquidos también están compuestos por sales minerales, una fuente de energía, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y puede haber o no material de soporte, los cuales pueden ser lana de vidrio mineral, algodón, espuma de plástico y puentes de papel filtro, este último sistema fue desarrollado por Heller en 1953 (Pierik, 1990; Szabados *et al.*, 1993; Razdan, 2003; Rojas *et al.*, 2004). Cuando resulta posible el cultivo en medio líquido sin material de soporte, se debe considerar una buena aireación la cual es posible cultivando al explante parcialmente sumergido en el medio de cultivo (Pierik, 1990). El empleo de medio líquido sin soporte se utiliza para el cultivo de protoplastos, producción de metabolitos secundarios y la propagación de embriones somáticos (George *et al.*, 2008).

Las principales ventajas de emplear medio líquido son que el crecimiento y desarrollo resulta mejor, ya que el explante puede absorber de manera rápida, constante y uniforme los nutrimentos y agua por toda su superficie, mientras que en medio sólido es más lenta por la presencia de agentes gelificantes, lo que dificulta el intercambio de agua y nutrimentos, así como el incremento en el

número de plantas que se obtienen, ya que se ha observado una disminución en el tiempo entre subcultivos lo cual permite producir una mayor cantidad de brotes por unidad de tiempo y disminución en los plazos de propagación. Además, el crecimiento en medio líquido también implica que cualquier exudado de la planta se diluya con más facilidad que en el agar, donde pueden producirse acumulaciones locales (Pierik, 1990; Orellana, 1998b; Rojas *et al.*, 2004; Celestino *et al.*, 2005; George *et al.*, 2008). Otras ventajas son mayor facilidad en la preparación, esterilización y manipulación; disminución en los costos del medio de cultivo, facilidad de automatización (Orellana, 1998b), medir con facilidad y en forma continua variaciones en el pH, conductividad, iones, al tiempo que se puede reemplazar por medio fresco con facilidad (Celestino *et al.*, 2005). Sin embargo, el desarrollo de los tejidos se puede ver afectado por la falta de oxígeno y por el fenómeno de hiperhidratación, problemas que se pueden controlar con el uso de soportes (Celestino *et al.*, 2005; George *et al.*, 2008).

### **2.7.7 Estudios realizados *in vitro* empleando medio líquido**

Entre los primeros estudios *in vitro* con medio líquido cabe mencionar el de Haberlandt en 1902, quien utilizó medio líquido Knop adicionado con 1 a 5% de sacarosa para el cultivo de células de *Lamium purpureum*, las células sobrevivieron por un mes, sin embargo, no se observó división celular (Hvoslef-Eide y Preil, 2005). En la Tabla 6 se muestran algunos trabajos de propagación *in vitro* en diferentes familias empleando medio líquido. Su uso para la propagación de cactáceas ha sido reportado escasamente, siendo utilizado principalmente para la germinación de semillas, o bien, para la elongación de las plántulas germinadas *in vitro* que se utilizan como fuente de explantes.

**Tabla 6. Algunos trabajos de propagación *in vitro* en diferentes especies utilizando medio Murashige y Skoog, 1962, (MS) líquido.**

ESPECIE	EXPLANTE	RCV (mgL <sup>-1</sup> )	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>Saccharum officinarum</i> (Poaceae)	Ápices	BA/K (0.2/0.1)*	N.E.	Chavarría <i>et al.</i> , 1999
<i>Matricaria recutita</i> (Asteraceae)	Callo	Sin hormonas*	Flavonoides	Fernández <i>et al.</i> , 2002
<i>Musa</i> spp. (Musaceae)	Meristemos	BA (5)	Br: 60	Colmenares y Giménez, 2003
<i>Anthurium andraeanum</i> (Araceae)	Br	Sin hormonas	Br: 25.5	Del Rivero <i>et al.</i> , 2004
<i>Pelecyphora strobiliformis</i> (Cactaceae)	Longitudinales	ANA (0.5)	Br: 24.75	Flores, 2004
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Br	BA/AIA (3/1.5)	Br: 1.91 (prom)	Saucedo <i>et al.</i> , 2008
<i>Aloe vera</i> (Liliaceae)	Transversal y longitudinal	MS (50%),BA (1)*	Br: 3.75 prom	Albany <i>et al.</i> , 2006
<i>Heliconia standley</i> (Heliconiaceae)	Ápices	BA/AIA	Br: 3.5	Sosa-Rodríguez <i>et al.</i> , 2009

**Abreviaturas:** RCV: Reguladores de crecimiento vegetal; K: kinetina; AIA: Ácido indolacético; BA: Benciladenina; Br: Brotes; N.E.: No Especificado; prom: promedio

\*En agitación constante.

Frías (1989) reportó el uso de medio líquido en cactáceas. Utilizó medio líquido de De Fossard con un soporte de algodón para la germinación de semillas de *Echinocactus grusonii*. Después de 14 a 16 semanas de cultivo, obtuvo plántulas de 1 a 1.3 cm de longitud para la obtención de explantes longitudinales, sin embargo, no reporta el porcentaje de germinación.

*Pelecyphora strobiliformis* fue propagada empleando medio MS líquido con puentes de papel filtro para la germinación de semillas, reportando el 89.23%, las plántulas obtenidas se seccionaron longitudinalmente para la obtención de explantes, los cuales fueron cultivados en medio MS líquido al 50% de sus componentes (con puentes de papel filtro) adicionado con ANA 0.5 mgL<sup>-1</sup> obteniendo un promedio de 24.75 brotes por explante, sin embargo, no se reportaron resultados acerca de la fase de aclimatización ni del establecimiento de plantas *ex vitro* (Flores, 2004).

*Cephalocereus senilis* fue propagada a partir de explantes longitudinales provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, obteniéndose en promedio 7 y 11 brotes por explante aplicando BA 1 y 2 mgL<sup>-1</sup>

respectivamente, dichos brotes individualizados y enraizados fueron transferidos a medio MS sólido y líquido (con puentes de papel filtro) para promover su elongación. Los brotes en medio líquido mostraron en promedio una longitud mayor (24.9 mm) en comparación con los del medio sólido (19.2 mm). En cuanto a su sobrevivencia *ex vitro*, sólo el 40% sobrevivieron de las provenientes del medio sólido, y el 70% de las procedentes del medio líquido (Tapia, 2006).

*Thelocactus rinconensis* se propagó a partir de explantes apicales provenientes de plántulas germinadas *in vitro*; para facilitar la obtención y siembra de los explantes, las plántulas fueron colocadas en medio MS sólido y líquido con  $1 \text{ gL}^{-1}$  de carbón activado en puentes de papel filtro para promover su elongación; las plántulas procedentes de medio líquido alcanzaron una longitud de 1.29 cm al mes de haber sido transferidas, mientras que las de medio sólido 0.5 cm a los dos meses. Para la formación de brotes el mejor tratamiento fue 2iP/ANA ( $1/0.1 \text{ mgL}^{-1}$ ) con un promedio de 4 brotes por explante; el 92% de los brotes sobrevivieron en condiciones *ex vitro* (Díaz, 2007).

López (2009) realizó el estudio histológico y micromorfológico de los brotes regenerados *in vitro* en *Mammillaria coahuilensis*, la propagación se logró a partir de explantes apicales y laterales provenientes de plántulas germinadas *in vitro*; las cuales fueron colocadas previamente en medio MS líquido con el fin de promover su elongación; después de un mes, las plántulas que se encontraban en medio líquido alcanzaron en promedio una longitud de 8 mm, en contraste con aquellas que se encontraban en medio sólido alcanzaron 4 mm de longitud; todas las plántulas se utilizaron para la obtención de explantes, posteriormente se cultivaron en medio MS 50% adicionado con BA  $5 \text{ mgL}^{-1}$  para la inducción de brotes.

## **2.8 Cultivo *in vitro* de *Echinocactus grusonii***

*E. grusonii* ha sido propagada por cultivo de tejidos vegetales a partir de explantes obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*. Uno de los primeros antecedentes que se tienen de la micropropagación de esta especie fue reportado por Frías (1989), quien estableció el diseño experimental para la multiplicación de brotes *in vitro* por organogénesis directa, obteniendo cuatro

brotos por explante longitudinal con la aplicación de la combinación de kinetina (K)  $4 \text{ mgL}^{-1}$  y ácido indol acético (AIA)  $0.8 \text{ mgL}^{-1}$ , no se reportan resultados acerca de la fase de aclimatización ni del establecimiento de plantas *ex vitro*.

Anicua y Rivas (2000) reportaron algunas condiciones para la propagación *in vitro* de *E. grusonii* a partir del aislamiento de aréolas de plantas adultas. Evaluaron el efecto independiente de concentraciones graduales de dos citocininas, K ( $0.5, 1, 5$  y  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ) y BA ( $0.5, 1, 5$  y  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ) en la activación de aréolas cultivadas en medio MS. La respuesta obtenida fue la formación de callo en todos los tratamientos, desarrollándose más rápido con K  $5 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y BA  $1 \text{ mgL}^{-1}$ .

En 2004, Lizalde-Viramontes y colaboradores obtuvieron, a partir de explantes laterales que provenían de plántulas germinadas *ex vitro*, hasta cuatro brotes por explante aplicando BA  $2 \text{ mgL}^{-1}$ , luego los brotes enraizados *in vitro* en medio MS con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido indol butírico (AIB) fueron transferidos a condiciones *ex vitro*, después de dos a tres semanas de aclimatización en una cámara de incubación. De cada 20 brotes que se trasladaron a invernadero sobrevivieron el 80 % después de cuatro semanas de la transferencia.

*E. grusonii* también fue propagada por Rodríguez (2006) utilizando medio MS, y explorando la respuesta de los explantes con tres citocininas: BA, 2iP y K en concentraciones de  $1, 2$  y  $3 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente. Los mejores resultados fueron obtenidos con 2iP  $3 \text{ mgL}^{-1}$  logrando regenerar 280 brotes y un promedio de 3.11 brotes por explante longitudinal. Los brotes presentaron un aspecto bien definido y fueron enraizados en medio MS basal, el desarrollo espontáneo de raíces se presentó después de 15 días, posteriormente los brotes enraizados se aclimatizaron *ex vitro*, obteniendo un elevado porcentaje (90%) de sobrevivencia.

El efecto de BA y AIA, la edad y el tipo de explantes en la regeneración *in vitro* de *E. grusonii* fue evaluada por Chablé *et al.* (2007), los mejores resultados se lograron con el empleo de explantes longitudinales de seis meses de edad, los cuales fueron cultivados en medio MS adicionado con BA  $2 \text{ mgL}^{-1}$  y AIA  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ , sin embargo, no reportan el número de brotes regenerados por explante ni el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro*.

En la Tabla 7 se muestran algunos trabajos de la propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii*.

**Tabla 7. Estudios sobre la propagación *in vitro* de *E. grusonii* utilizando medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) sólido**

EXPLANTE	RCV (mgL <sup>-1</sup> )	RESPUESTA	SOBREVIVENCIA (%)	REFERENCIA
Longitudinales	K/AIA (4/0.8)	4br/ex	N. E.	Frías, 1989
Aréolas	K/BA (5,10/1)	Callo	N. E.	Anicua y Rivas, 2000
Laterales	BA (2)	4 br/ex	80	Lizalde-Viramontes, 2004
Longitudinales	2iP (3)	3.11 br/ex	90	Rodríguez, 2006
Longitudinales	BA/AIA (2/0.5)	N.E	N. E.	Chablé <i>et al.</i> , 2007

**K:** kinetina; **RCV:** Reguladores de crecimiento vegetal; **AIA:** Ácido indolacético; **BA:** Benciladenina, **2iP:** N<sup>o</sup>-2, isopentenil adenina; **br/ex:** brotes/explante; **N.E.:** no especificado.

En estos trabajos, el medio más empleado para la propagación de *E. grusonii* es el MS en estado sólido, y dado que el medio líquido se ha reportado para otras cactáceas (*Pelecypora strobiliformis*, *Cephalocereus senilis*, *Thelocactus rinconensis* y *Mammillaria coahuilensis*) para promover la elongación de las plántulas germinadas *in vitro* y así facilitar la obtención de explantes; así como estimular la elongación de los brotes individualizados, en este estudio se pretende comparar la respuesta de *E. grusonii* al ser propagada en medio MS sólido y líquido con 2iP 3 mgL<sup>-1</sup>, con base en los resultados obtenidos por Rodríguez (2006), ya que en esta concentración se obtuvo el mayor número de brotes por explante (3.11) con aspecto bien definido, además de obtener el mayor porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* (90%).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*E. grusonii* es una cactácea endémica de México, ubicada en la categoría Peligro de Extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido principalmente a su restringida distribución geográfica (Hidalgo y Querétaro), la destrucción de su hábitat y su amplio uso ornamental. Esta especie ha sido propagada exitosamente por cultivo de tejidos vegetales utilizando medio sólido. El empleo de medio líquido facilita la disponibilidad de nutrimentos para los explantes cultivados *in vitro*, por lo que se propone el uso de éste para evaluar si favorece e incrementa la regeneración *in vitro* de brotes en esta especie, con el fin de hacer más eficiente el sistema de propagación *in vitro*, contribuyendo así a su conservación y a futuro cubrir su amplia demanda comercial.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 General

- Promover la proliferación de brotes *in vitro* de *E. grusonii* utilizando medio de cultivo líquido.

#### 4.2 Particulares

- Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *E. grusonii* en medio de cultivo líquido y sólido.
- Evaluar el número de brotes regenerados *in vitro* en ambos medios de cultivo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Escarificación y desinfección de semillas

Semillas de *Echinocactus grusonii* donadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, colectadas en marzo de 2010, se guardaron en bolsas de papel estraza, y se almacenaron durante cinco meses en un refrigerador a 4°C, posteriormente siguieron el proceso de escarificación y desinfección utilizado por Rosas (2002) para *Echinocactus platyacanthus*, y Rodríguez (2006) para *E. grusonii* que a continuación se describe:

Las semillas se escarificaron en ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 15 segundos, posteriormente se sometieron a un tren de desinfección que consistió en lavar las semillas en agua destilada (50 mL) más una gota de detergente líquido (Dawn®) por 15 minutos, enseguida se trataron con agua destilada (50 mL) más tres gotas de bactericida comercial (Microdyn®) por 30 minutos, posteriormente en alcohol al 70% dos minutos y, por último, en hipoclorito de sodio al 20% (v/v, 6% cloro activo) adicionado con tres gotas de Tween 80® por cada 50 mL de agua destilada durante 15 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua. En condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces durante un minuto cada una con agua destilada esterilizada.

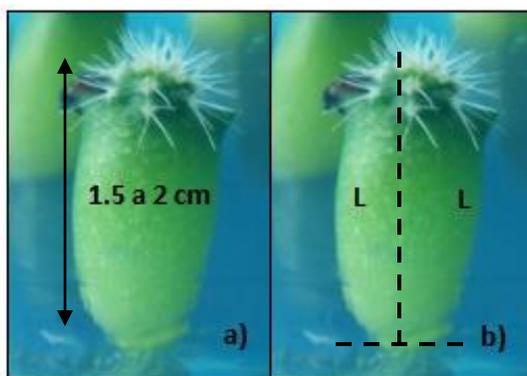
### 5.2 Siembra de semillas *in vitro* en medio sólido y líquido

La siembra se realizó en medio Murashige y Skoog al 50% de sus componentes (MS 50%) adicionado con sacarosa 15 gL<sup>-1</sup> (Anexo 2). Se empleó medio líquido utilizando puentes de papel filtro como soporte, y medio sólido gelificado con agar bacteriológico Bioxon® 8 gL<sup>-1</sup>. En ambos casos se colocaron cinco semillas/frasco Gerber® con 25 mL de medio de cultivo. Se sembraron 150 semillas para cada tratamiento. Se consideró como semilla germinada aquella en la cual había emergido la radícula (Salisbury y Ross, 2000). Se evaluó el porcentaje promedio de germinación acumulada y la desviación estándar tanto para medio líquido como para sólido, además se efectuó un análisis de

varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS versión 10 para determinar si hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios utilizados.

### **5.3 Inducción, proliferación y subcultivo de brotes**

Como fuente de explantes se utilizaron plántulas de 1.5 a 2 cm de longitud (2-3 meses de edad). Se eliminó la raíz, y posteriormente se cortó el tallo a la mitad para obtener dos explantes longitudinales por plántula (Figura 3) los cuales se sembraron en frascos con 25 mL de medio MS sólido y líquido adicionado con 2iP 3 mgL<sup>-1</sup> (medio de inducción) (Rodríguez, 2006). Se sembraron cuatro explantes por frasco en medio sólido y dos por frasco en medio líquido con puentes de papel filtro, haciendo un total de 60 explantes por cada tipo de medio. Los cultivos fueron incubados y permanecieron 90 días en el medio de inducción para posteriormente ser subcultivados a medio MS 50%, sacarosa 15 gL<sup>-1</sup> y agar Bioxon<sup>®</sup> 8 gL<sup>-1</sup> (25 mL de medio/frasco) donde permanecieron 105 días para que los brotes pudieran proliferar y continuar con su crecimiento.



**Figura 3. Explantes longitudinales de *E. grusonii*. a) Plántula germinada *in vitro* y b) Explantes longitudinales (L).**

Se evaluó el número de brotes por explante, el tiempo de formación de los brotes, las características morfológicas de los brotes regenerados, así como el tiempo máximo de permanencia de los explantes en el medio líquido para evitar su posible hiperhidratación.

#### **5.4 Individualización y enraizamiento de brotes**

Después de 105 días en el medio MS 50%, los brotes de 0.5 a 1.5 cm de longitud se individualizaron del explante cuando el área de contacto entre ambos era mínima. Se sembraron de cuatro a seis brotes por frasco en medio MS basal sólido (25 mL de medio/frasco) para promover la formación espontánea de raíces, donde permanecieron 12 semanas.

El medio de cultivo para la germinación, la inducción, el subcultivo y la individualización de brotes, se esterilizó en autoclave a 120°C y 1.5 Kg cm<sup>-2</sup> durante 18 minutos. Las semillas, los explantes y brotes se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25±2°C, fotoperiodo 16/8 h e intensidad luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### **5.5 Aclimatización y establecimiento ex vitro**

Una vez que los brotes enraizados alcanzaron una longitud aproximada de 2 a 2.5 cm, se enjuagaron cuidadosamente las raíces para quitar el agar, y se colocaron en papel estroza para eliminar el exceso de agua, posteriormente se transfirieron en charolas de plástico transparentes con sustrato esterilizado que consistió en una mezcla de tierra negra y tezontle (1:1) y posteriormente fueron mantenidos en un cuarto de incubación. Después de 16 semanas de aclimatización, fueron trasladados a condiciones *ex vitro* en un invernadero para continuar con su aclimatización. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

La Figura 4 resume los métodos empleados en este trabajo.

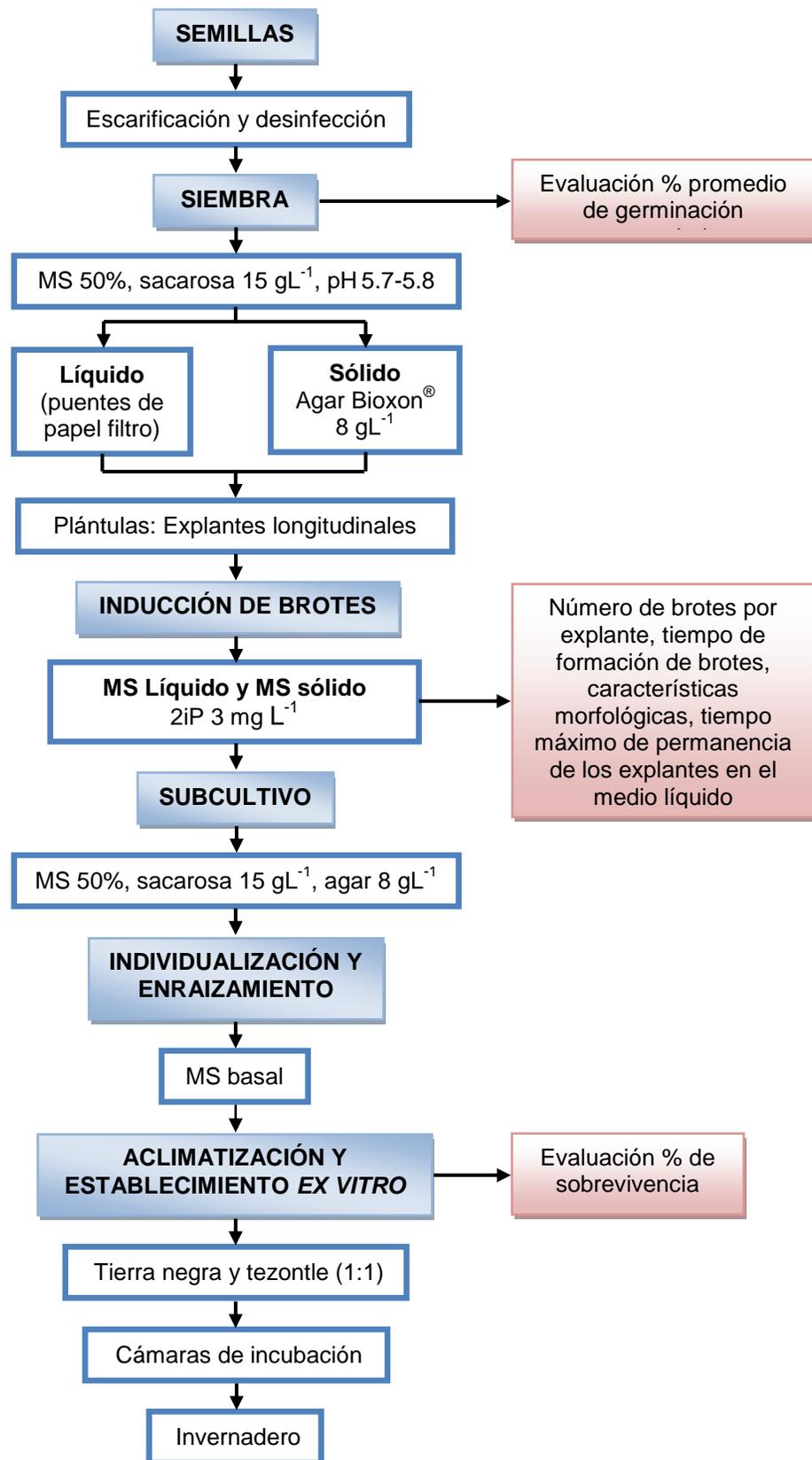


Figura 4. Diagrama de flujo del procedimiento realizado para la regeneración *in vitro* de brotes de *E. grusonii* utilizando medio sólido y líquido.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

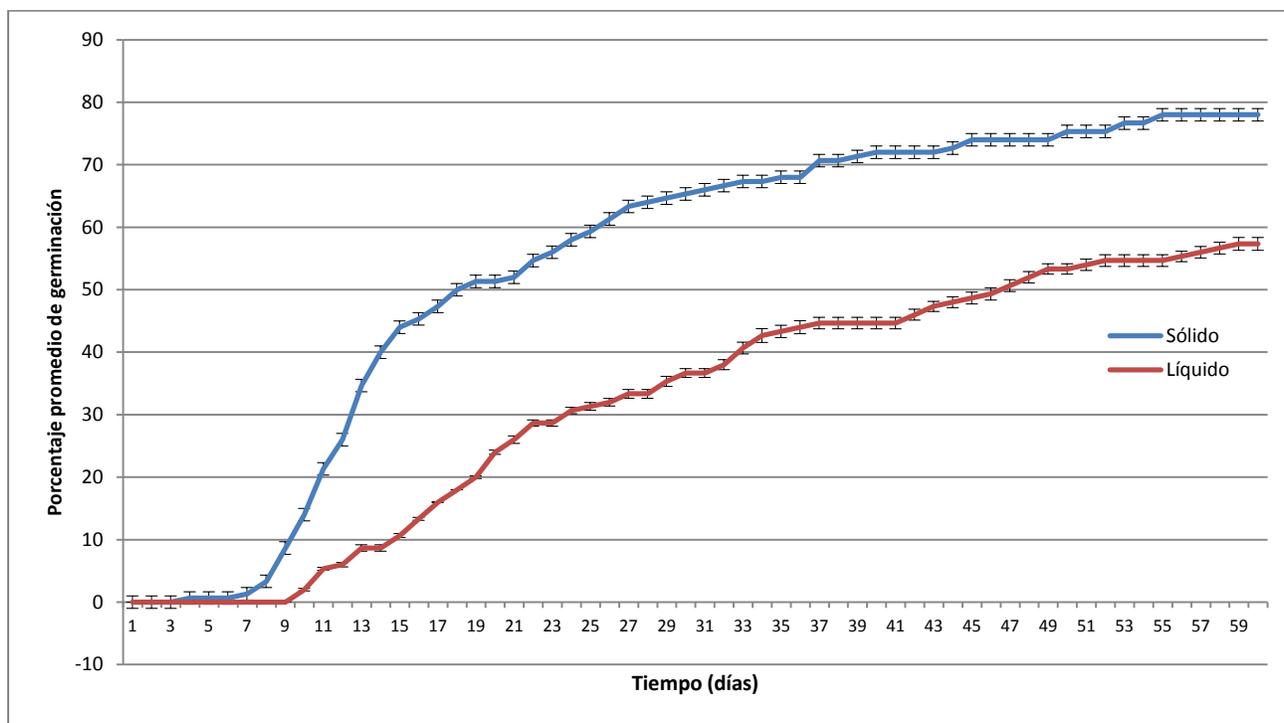
### 6.1 Escarificación y desinfección de las semillas

El tratamiento de escarificación y desinfección definido por Rosas (2002) para *E. platyacanthus* y empleado para *E. grusonii* resultó eficiente, ya que permitió la germinación de las semillas sin problemas de contaminación, alcanzando el 78% de germinación en medio sólido, y 57% en líquido.

Se han reportado tratamientos que facilitan la germinación, como lo señalan López y colaboradores (2001), quienes realizaron la evaluación de diferentes tratamientos ( $H_2SO_4$ , HCl,  $H_2O_2$  y agua a 70°C) para la germinación de *E. platyacanthus*, obteniendo como resultado que el tratamiento con  $H_2SO_4$  presentó los más altos porcentajes de germinación (80%) con dos minutos de inmersión; mientras que Navarro *et al.*, 2008, compararon el porcentaje de germinación de *Mammillaria hamata* y *M. sphaelata* al tratarlas en  $H_2SO_4$ , agua a 50°C, Tween al 5%, ácido giberélico y temperatura de 4°C. En *M. hamata* las semillas escarificadas con  $H_2SO_4$  por dos minutos registraron el 100% de germinación, mientras que para *M. sphaelata* el 83%. Con estos resultados y el obtenido en este trabajo, se confirma la necesaria acción corrosiva del  $H_2SO_4$  para simular el paso de las semillas por el tracto digestivo de vertebrados y así facilitar la germinación.

### 6.2 Germinación *in vitro* en medio sólido y líquido

Se evaluó el porcentaje promedio de la germinación en medio sólido y líquido de tres lotes de 50 semillas cada una, conformando un total de 150 semillas por tipo de medio. En el medio sólido la germinación inició entre el segundo y tercer día posterior a la siembra, alcanzando el máximo porcentaje (78%) a los 56 días, mientras que en medio líquido inició al décimo primer día, con un 57% de germinación promedio alcanzado a los 60 días. El ANOVA indicó que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios utilizados ( $F= 26.54$ ,  $p = 0.00$ ) (Gráfica 1).



**Gráfica 1. Porcentaje promedio de germinación acumulada *in vitro* de semillas de *Echinocactus grusonii* en medio MS 50% sólido y líquido. N= 150, las barras en cada punto representan la desviación estándar.**

Bregman y Bouman (1983), estudiaron los patrones de germinación en 89 géneros de la familia Cactaceae, encontrando que la mayoría de las semillas comienzan a germinar en el transcurso de una semana, esto pudo corroborarse en el presente estudio en las semillas de *E. grusonii*.

Aunque no se obtuvo el 100% de germinación, se puede considerar que la viabilidad de las semillas fue alta, ya que en cactáceas como *Hylocereus undatus*, *Stenocereus griseus* y *Peniocereus greggii* se reportaron porcentajes de germinación (12.9, 15.2 y 38.5% respectivamente) inferiores al 50% (Cuéllar *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2008). Bajo las mismas condiciones *in vitro* empleadas en este trabajo, se han reportado porcentajes de germinación para otras cactáceas, tal es el caso de *Thelocactus bicolor* y *T. rinconensis*, donde el máximo porcentaje (96.66%) se alcanzó a los 19 días y 79% a los 76 días respectivamente (Zamora, 2007; Díaz, 2007); mientras que para *Echinocactus grusonii*, Rodríguez (2006) reportó el 94% a los 19 días y, Martínez (2007), el 96% a los 14 días. Dichos porcentajes son superiores a los obtenidos en el presente trabajo (57% en medio líquido y 78% en medio sólido); las diferencias entre estos resultados pueden deberse a diversos factores, entre ellos al tiempo de almacenamiento de las semillas. Flores y colaboradores (2005) reportaron

para las cactáceas tres patrones de germinación con el paso del tiempo: las semillas pierden viabilidad al año, las semillas permanecen viables y germinan de manera similar por hasta 2 años, y la germinación aumenta en semillas de 1 y/o 2 años de edad al romperse la latencia. Sin embargo, en este trabajo las semillas de *E. grusonii* no cumplen con estos patrones, ya que se utilizaron semillas almacenadas por cinco meses y se obtuvieron porcentajes de germinación bajos (57% en medio líquido y 78% en medio sólido), esto sugiere que quizás las bajas tasas de germinación se deban al tiempo de almacenamiento, ya que en trabajos como el de Martínez (2007) quien utilizó semillas almacenadas bajo las mismas condiciones que en el presente estudio, pero con tiempo de almacenamiento de 4 años, reportó el 96% de germinación; o el de Rodríguez (2006) quien reportó 94% de germinación empleando semillas almacenadas por 2 años a temperatura ambiente, que aunque no fueron las mismas condiciones de almacenamiento que las utilizadas en este estudio se observó que el tiempo es un factor que influye en la germinación de semillas de *E. grusonii*. Por lo que se propone que las semillas requieren de un tiempo de postmaduración; Raven y colaboradores (1992) señalan que algunas semillas fisiológicamente inmaduras de especies desérticas antes de germinar tienen que pasar por una serie de cambios enzimáticos y bioquímicos, es decir un periodo de postmaduración. De acuerdo con Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000) y Santos-Díaz *et al.* (2003), el bajo porcentaje de germinación *in vitro* también puede deberse a factores como la escasa permeabilidad de la cubierta seminal, inmadurez del embrión, la inviabilidad de las semillas o su estado de latencia.

En la mayoría de los trabajos reportados, el medio empleado para la germinación *in vitro* ha sido el MS 50% sólido como ejemplo se pueden mencionar a *Astrophytum myriostigma* (Santos *et al.*, 2001), *Astrophytum ornatum* (Mendoza, 2007), *Ariocarpus bravoanus* (Gómez, 2008), *Echinocereus reichenbachii* (Gutiérrez, 2009), *Astrophytum capricorne*, *A. myriostigma*, *Echinocereus reichenbachii*, *Escobaria dasyacantha*, *Mammillaria prolifera* y *Sclerocactus scheeri* (Salas-Cruz *et al.*, 2011). El uso de medio MS líquido con puentes de papel filtro ha sido escasamente reportado para la germinación *in vitro* de semillas de cactáceas. En *Pelecyphora strobiliformis* (Flores, 2004), se obtuvo el 89.23%

de germinación en un periodo de siete a catorce días. En el presente trabajo con *E. grusonii*, se esperaba que el uso de medio en estado líquido favoreciera el proceso de germinación, ya que en medio sólido el intercambio de agua y nutrimentos es más lenta por la presencia de agentes gelificantes (Orellana 1998b), sin embargo el análisis estadístico mostró diferencias significativas a favor del medio sólido. Estos resultados pueden ser atribuidos al estado del medio de cultivo. De acuerdo a Raven *et al.*, (1992) la germinación de las semillas depende de factores tanto externos como internos; entre los externos el agua, el oxígeno y la temperatura son especialmente importantes. Durante las primeras fases de la germinación, la respiración puede ser anaerobia, pero tan pronto como se rompe la cubierta seminal la semilla respira aeróbicamente y, por tanto, necesita oxígeno; si la superficie de la semilla está saturada de agua, la cantidad de oxígeno utilizable por la semilla puede ser insuficiente para que se produzca la respiración aerobia, y entonces la semilla no podrá germinar. Esto posiblemente ocurrió en el presente estudio, ya que en medio líquido con puentes de papel filtro la difusión de gases posiblemente se vio limitada por la formación de una capa acuosa de medio nutritivo sobre la superficie de la semilla dando como resultado un bajo porcentaje de germinación. Mientras que en medio sólido, las semillas presentan un área mayor expuesta a la atmósfera *in vitro* permitiendo el intercambio gaseoso, principalmente de oxígeno. No obstante, el empleo de medio líquido favoreció el posterior desarrollo y crecimiento de las plántulas para la obtención de explantes.

### **6.3 Desarrollo de las plántulas**

La germinación de las semillas comenzó con la emergencia de la radícula de color blanco entre el segundo y tercer día en medio sólido (Figura 5a), mientras que en medio líquido se observó hasta el día once (Figura 5b). Después de uno o dos días posteriores a la emergencia de la radícula, emergió el hipocótilo, de color verde claro, y los pequeños cotiledones. Después de 14 días de la siembra, la longitud promedio de las plántulas en medio líquido fue mayor (5 mm) (Figura 5d) que en medio sólido (3 mm) (Figura 5c); también se observó que el desarrollo de la raíz fue mayor en medio líquido

comparado con el medio sólido. A los 40 días el hipocótilo alcanzó 1.2 cm de longitud promedio en medio líquido, y en sólido 8 mm, al mismo tiempo, en el ápice de la plántula comenzó a diferenciarse el tallo, evidenciado por la aparición de pequeñas aréolas y tricomas. Las raíces fueron más abundantes y de mayor longitud en medio líquido, delgadas y de color blanco, con raíces secundarias y con numerosos pelos radicales (Figura 5f); mientras que en medio sólido las raíces fueron de menor longitud y gruesas, de color blanco, raíces secundarias y escasos pelos radicales (Figura 5e).

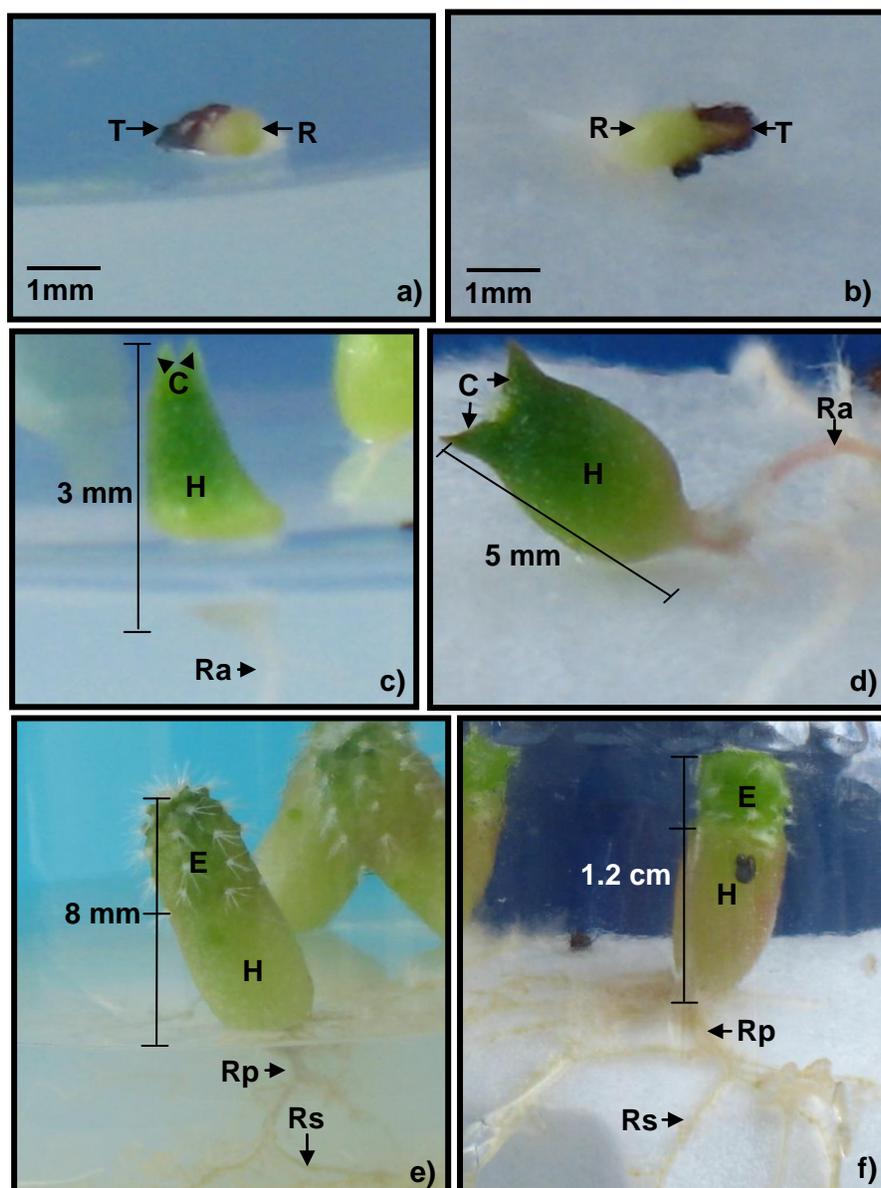


Figura 5. Desarrollo de las plántulas germinadas *in vitro* de *E. grusonii* en medio sólido (columna izquierda) y líquido (columna derecha). Emergencia de la radícula (R) entre el segundo y tercer día en medio sólido (a) y al día once en medio líquido (b). A los 14 días, las plántulas en medio sólido (c) tuvieron una longitud ligeramente menor (3 mm) que las germinadas en medio líquido (5 mm) (d). Después de 40 días, el epicótilo se desarrolló en un tallo bien definido con pequeñas aréolas y tricomas. La longitud promedio de las plántulas en medio líquido fue 1.2 cm (f) y en medio sólido 8 mm (e). T: testa, R: radícula, Ra: raíz, C: Cotiledones, H: hipocótilo, E: epicótilo, Rp: raíz primaria y Rs: raíz secundaria.

Resultados similares reportó Díaz (2007) al promover la elongación de plántulas germinadas *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* en medio MS sólido y líquido con puentes de papel filtro, alcanzando una longitud de 0.5 cm y 1.29 cm respectivamente; y López (2009) reportó para plántulas germinadas *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* una longitud promedio de 8 mm en medio MS líquido con puentes de papel filtro y en medio sólido 4 mm de longitud; en ambos trabajos se promovió la elongación de las plántulas para facilitar la obtención y siembra de los explantes. Tapia (2006) también promovió la elongación de los brotes individualizados de *Cephalocereus senilis* al transferirlos a medio MS sólido y líquido con puentes de papel filtro, los brotes en medio líquido mostraron en promedio una longitud mayor (24.9 mm) en comparación con los del medio sólido (19.2 mm). Estos resultados y los obtenidos para *E. grusonii* demuestran que el uso de medio líquido con puentes de papel filtro promueven el crecimiento y la elongación de las plántulas en menor tiempo. Según Orellana (1998b), los medios líquidos son eficaces para el crecimiento y diferenciación de tejidos; lo cual puede deberse a la rápida absorción de los nutrimentos, mientras que en medio sólido, la presencia de agar dificulta el intercambio de agua y nutrimentos, por lo tanto la elongación disminuye.

Con base en lo anterior, se destaca la importancia de emplear medio líquido, ya que bajo estas condiciones las plántulas de *E. grusonii* se elongaron considerablemente (1.2 cm) en contraste con aquellas que se encontraban en medio sólido (8 mm), lo que facilitó la obtención y siembra de los explantes.

Uno de los problemas al emplear medio líquido para cultivar cactáceas *in vitro* es que, al ser plantas almacenadoras de agua, por naturaleza éstas tienden a hiperhidratarse. Kevers *et al.* (2004) reportó que este problema suele ocurrir con más frecuencia al utilizar medio líquido, por lo que en este estudio se esperaba obtener un porcentaje de hiperhidratación más alto en las plántulas germinadas en medio líquido (2.6% a los 32 días posteriores a la siembra), sin embargo, fue mayor en medio sólido (8.6%) a los 26 días posteriores a la siembra, en ambos casos las plántulas hiperhidratadas presentaron una coloración verde claro, un aspecto vítreo, translúcido y aumento en su tamaño; además se observaron tonalidades rojizas que indicaron indicios de oxidación (Figura 6).

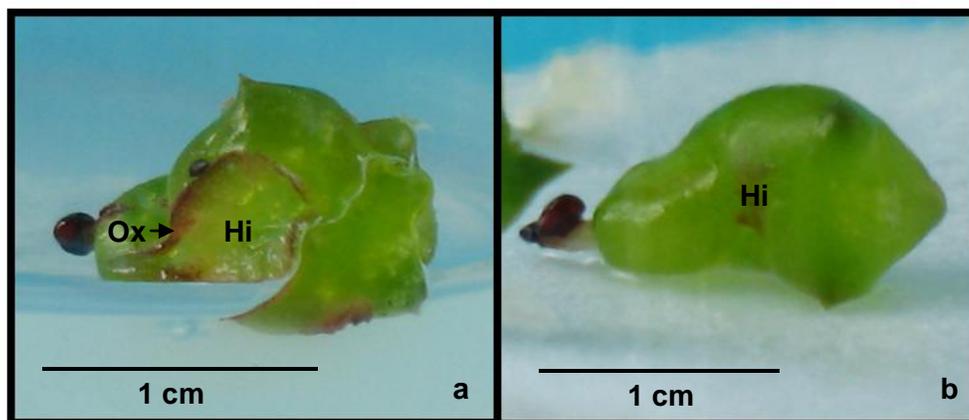


Figura 6. Plántulas de *E. grusonii* con síntomas de oxidación (Ox) e hiperhidratación (Hi) en a) Medio MS 50% sólido y b) Medio MS 50% líquido a los 26 y 32 días posteriores a la siembra respectivamente.

La hiperhidratación de plántulas germinadas *in vitro* en medio sólido se ha reportado en otras especies de cactáceas, tal como *Mammillaria coahuilensis* (Flores, 2007) y *Thelocactus rinconensis* (Díaz, 2007). Dicha hiperhidratación puede deberse a factores ligados a las condiciones del cultivo *in vitro*, tales como el agente gelificante y su concentración, una baja intensidad lumínica durante la incubación, la elevada humedad relativa dentro del contenedor y a una mayor difusión del medio líquido a la plántula, que de acuerdo a Debergh y Zimmerman (1991), son los factores clave para explicar estas anomalías. Otra razón es que las plantas cultivadas *in vitro* al transpirar en exceso porque los estomas no funcionan adecuadamente, se promueve la absorción de más agua por parte de los tejidos (Olmos *et al.*, 2004).

Kevers *et al.*, 2004 y Hazarika (2006) mencionaron que en general las plantas propagadas *in vitro* generan muchas enzimas oxidativas como la polifenoloxidasas, las peroxidasas, las tirosinasas y sus sustratos, las cuales son responsables de la oxidación u oscurecimiento de tejidos vegetales cuando son dañados físicamente. En las plántulas germinadas *in vitro* de *E. grusonii*, se registró el 1.2% de oxidación después de 32 días de estar en medio MS líquido, mientras que en medio MS sólido se obtuvo 3.5% después de 26 días.

#### 6.4 Oxidación de explantes en el medio de inducción

A los tres días posteriores a la siembra, los explantes longitudinales de *E. grusonii* presentaron una coloración café-rojizo tanto en medio sólido como en medio líquido, siendo mayor en los explantes sembrados en medio sólido, puesto que abarcó la mitad del explante (Figura 7a), mientras que en medio líquido, dicha coloración se presentó en menos de la mitad de los explantes (Figura 7b). Al día 90 posterior a la siembra en medio líquido el 16% de explantes presentaron oxidación, mientras que en medio sólido el 36%.

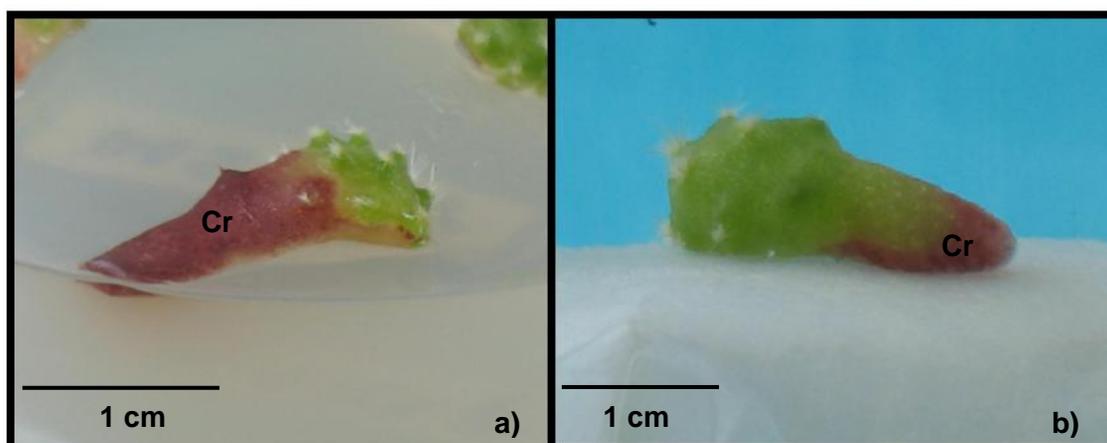


Figura 7. Explantes longitudinales de *E. grusonii* con coloración café-rojizo (Cr) en medio MS + 2iP 3 mgL<sup>-1</sup> sólido (a) y líquido (b) a los tres días posteriores de la siembra.

El uso de plántulas germinadas *in vitro* para la obtención de explantes ha sido ampliamente reportado para cactáceas como en *Astrophytum myriostigma* (Santos *et al.*, 2001), *Mammillaria voburnensis* (Ordóñez, 2003), *Astrophytum ornatum* (Mendoza, 2007), *Neobuxbaumia tetetzo* (Galván, 2005), *Thelocactus rinconensis* (Díaz, 2007), *Thelocactus bicolor* (Zamora, 2007), *Echinocereus reichenbachii* (Gutiérrez, 2009) y *Echinocactus grusonii* (Rodríguez, 2006); para esta última especie, Anicua y Rivas (2000) reportaron dificultades en la desinfección de los explantes (fracciones de plantas adultas), debido a la presencia de espinas y la gran cantidad de tricomas, por lo cual resulta más eficiente y fácil de manipular estructuras como las semillas que resisten la escarificación para promover su germinación y obtener plántulas como fuente de explantes de tejido joven y ya en condiciones asépticas.

La coloración café-rojiza que presentaron los explantes de *E. grusonii*, también fue reportada en explantes de *Mammillaria haageana* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), en *Pelecypora strobiliformis* (Flores, 2004) y *E. grusonii* (Rodríguez, 2006). Dicha coloración puede deberse a la producción de pigmentos carotenoides y xantofílicos en respuesta a las heridas ocasionadas al realizar los cortes del tejido para la obtención de explantes y a la composición del medio de cultivo (Bravo-Hollis, 1978; Collin y Edwards, 1998). Jiménez (1998) señala que los compuestos fenólicos acumulados en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas dando como resultado la coloración negra o marrón. Además, Azofeifa (2009) señala que los explantes, una vez que inician con esta coloración liberan exudados al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, pero la producción está influenciada por los reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) agregados al medio de cultivo, no obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en un explante no tiene igual efecto en otro, esto se debe a las diferencias genéticas en el origen de los materiales.

Cabe señalar que de acuerdo a Azofeifa (2009), los explantes son menos propensos al oscurecimiento si se establecen en un medio de cultivo líquido, ya que, en este estado físico se propicia la dispersión de sustancias tóxicas. Esto puede explicar por qué en este estudio, los explantes sembrados en medio líquido, presentaron una coloración menor respecto a los explantes sembrados en medio sólido, ya que en este medio el agente gelificante favorece la retención de fenoles u otras sustancias dañinas en las inmediaciones del explante.

## **6.5 Respuestas morfogénicas en medio sólido y líquido**

### **6.5.1 Rizogénesis directa**

Se presentó la formación de raíces adventicias en la región central y basal del explante que estaba en contacto con el medio, cercano a los haces vasculares del mismo. En el medio líquido, se formaron a partir del día 13 posterior a la siembra; a los 75 días el 63% de los explantes presentaron raíces de

color blanco, delgadas, con pocos pelos radicales y de longitud mayor respecto a las raíces formadas en los explantes sembrados en medio sólido (Figura 8a y b), donde la formación inició al décimo día posterior a la siembra, registrando el 33% (Figura 8c).

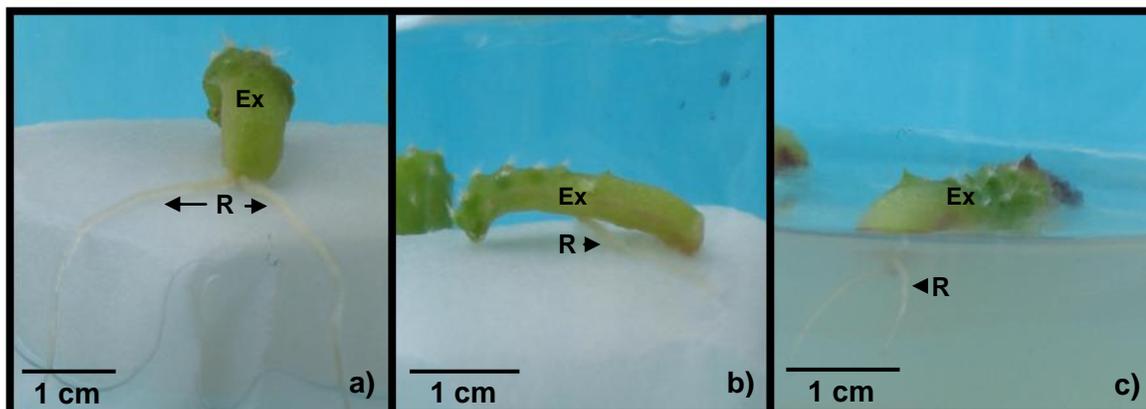


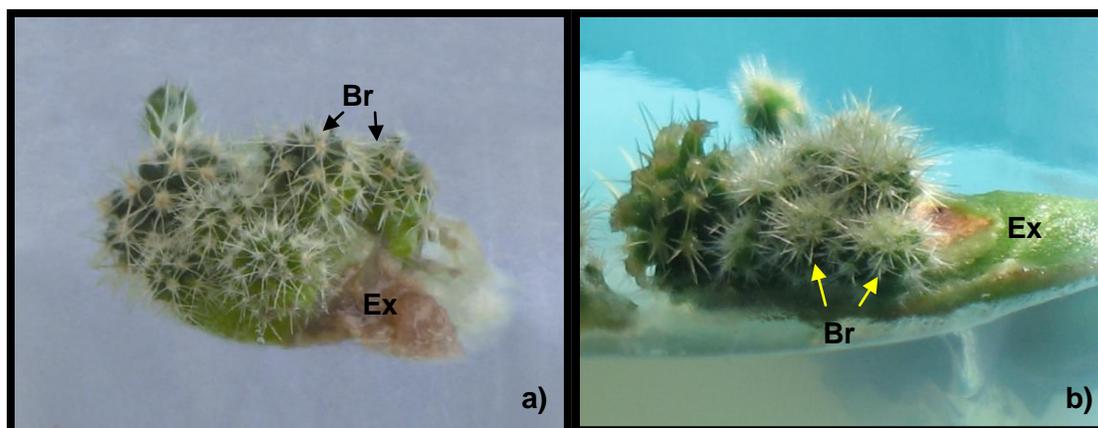
Figura 8. Formación de raíces adventicias (R) a partir de explantes longitudinales (Ex) de *E. grusonii* en medio MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido (a) y (b) y sólido (c) de 1.5 a 2 cm de longitud.

Rodríguez (2006) reportó la misma respuesta para explantes de *E. grusonii* a los 15 días posteriores de estar en el medio de inducción, mientras que Zamora (2007) y López (2009) reportaron la formación de raíces adventicias a los 20 días de iniciado el cultivo para *Thelocactus bicolor* y *Mammillaria coahuilensis*; y recientemente, Lara (2010) reportó este mismo evento para explantes de *Aporocactus flagelliformis* después de 60 días en el medio de inducción. En estos reportes, además de las citocininas se utilizaron auxinas, las cuales son las promotoras de la proliferación celular estimulando la formación y alargamiento de raíces (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2003). No obstante, en este estudio no se emplearon auxinas, es probable que la formación de raíces pueda deberse a la presencia de las auxinas endógenas del tejido. Esta respuesta puede indicar que los explantes se comportan como individuos al regenerar la parte faltante del explante, es decir, la raíz (Lara, 2010).

### 6.5.2 Formación de brotes por activación de aréolas

La formación de brotes ocurrió vía directa por la activación de aréolas, tanto en medio líquido como en sólido. En ambos medios, la regeneración de brotes se originó en las aréolas ubicadas en la zona

media del explante. En medio líquido el desarrollo de brotes se presentó después de 30 días en el medio de inducción, obteniendo un promedio de 3 brotes por explante a los 90 días (Figura 9a), mientras que en medio sólido el desarrollo de brotes inició después de 33 días en el medio de inducción alcanzando un promedio de 1.8 brotes por explante después de 90 días (Figura 9b). En ambos casos, los brotes presentaron una coloración verde, forma globosa con tubérculos pequeños y bien definidos, aréolas separadas entre sí, en las cuales se observó una gran cantidad de tricomas y espinas de color blanco.



**Figura 9. Brotes (Br) formados en zona apical de explantes longitudinales (Ex) de *E. grusonii* en medio MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido (a) y sólido (b).**

En las cactáceas, las citocininas endógenas y exógenas son determinantes para romper la dormancia de las aréolas y así inducir la división celular *in vitro* para la formación de brotes, en general se sabe que promueven el movimiento de los nutrimentos desde el sitio de producción al sitio de utilización, así como la maduración de cloroplastos, y participan en la regulación del crecimiento de tallos y raíces (Fay y Gratton, 1992; Taiz y Zeiger, 2006).

En diversos trabajos de propagación de cactáceas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Santos, 2005; Flores, 2007; Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007; Pérez, 2010; Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010) entre otros se ha empleado de forma extensiva la citocinina BA, que aunque es un fitorregulador sintético y económico ha dado buenos resultados para la regeneración de brotes, seguida de la K (Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Santos *et al.*, 2001; Mendoza, 2007) y en menor proporción 2iP (Johnson y Emino, 1979; Olguín, 1994; Fuentes y

Martínez, 2001; Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Galván, 2005; Díaz, 2007; Manzo, 2010) muy probablemente por lo elevado de su costo.

En los trabajos de propagación *in vitro* realizados con *E. grusonii* las citocininas más empleadas para la formación de brotes han sido BA (Lizalde-Viramontes *et al.*, 2004; Chablé *et al.*, 2007), K (Frías, 1989; Anicua y Rivas, 2000) y 2iP (Frías, 1989; Rodríguez, 2006). Los resultados obtenidos en los trabajos mencionados reportan en general cuatro brotes por explante (Frías, 1989; Lizalde-Viramontes (2004) y Rodríguez (2006) 3.11 brotes por explante. Por otro lado, Flores (2004) reportó para *Peleciphora strobiliformis* un promedio de 24.75 brotes por explante, después de seis meses de inducción en medio MS 50% líquido adicionado con ANA 0.5 mgL<sup>-1</sup>.

Estos resultados difieren con los obtenidos en este estudio, ya que se obtuvo un promedio menor del número de brotes por explante (1.8 brotes/explante en medio sólido y 3 brotes/explante en medio líquido), esto puede ser atribuido al tipo, el tamaño, la edad y el número de explantes utilizados, así como el tipo de hormona exógena y concentración empleada. Roca y Mroginski (1993), así como Jiménez (1998), mencionan que el tamaño del explante puede determinar la respuesta *in vitro*, ya que los explantes grandes poseen un potencial regenerador mayor respecto a los explantes pequeños; mientras que Calva y Pérez (2005) y Jiménez (1998) señalaron que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, ya que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas de diferentes edades fisiológicas, por tanto, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será su respuesta *in vitro*. George y colaboradores (2008), indican que la concentración endógena y el tipo de hormonas varían de especie a especie, incluso dentro de una misma especie. Otro aspecto importante es la consistencia del medio de cultivo, en el caso de los medios sólidos el agente gelificante puede modificar la expresión morfogenética debido a que pueden contener sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento (Radice, 2010).

### 6.5.3 Formación de brotes y raíces morfológicamente diferentes

Durante la formación de brotes en medio líquido y sólido, se detectó la formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD), en ambos casos, estos brotes se desarrollaron en la parte apical del explante, presentaron coloración verde oscuro, tubérculos gruesos y separados entre sí, aréolas de mayor diámetro, generalmente sin espinas pero con numerosos tricomas que, en un mismo brote, podían presentar color claro y/o café oscuro. Además, estos brotes no se diferenciaron por completo del explante, lo que impidió su individualización. Después de 90 días posteriores a la siembra el 40% de explantes procedentes del medio líquido formaron en promedio 0.63 BMD por explante (Figura 10a), y en medio sólido el 35% de explantes formaron 0.46 BMD por explante (Figura 10b). Aunado a esto, también se observó la formación de raíces adventicias morfológicamente diferentes (RMF), las cuales se desarrollaron en la zona media del explante, eran cortas, escasas, gruesas, no presentaron raíces secundarias, y en general, el color era café verdoso. En medio líquido la formación de estas raíces inició al día 54 posterior a la siembra de los explantes, alcanzando un máximo de 8.3% a los 90 días (Figura 10c); y en medio sólido la formación RMF comenzó después de 49 días de inducción registrando 17% a los 90 días posteriores a la siembra (Figura 10b).

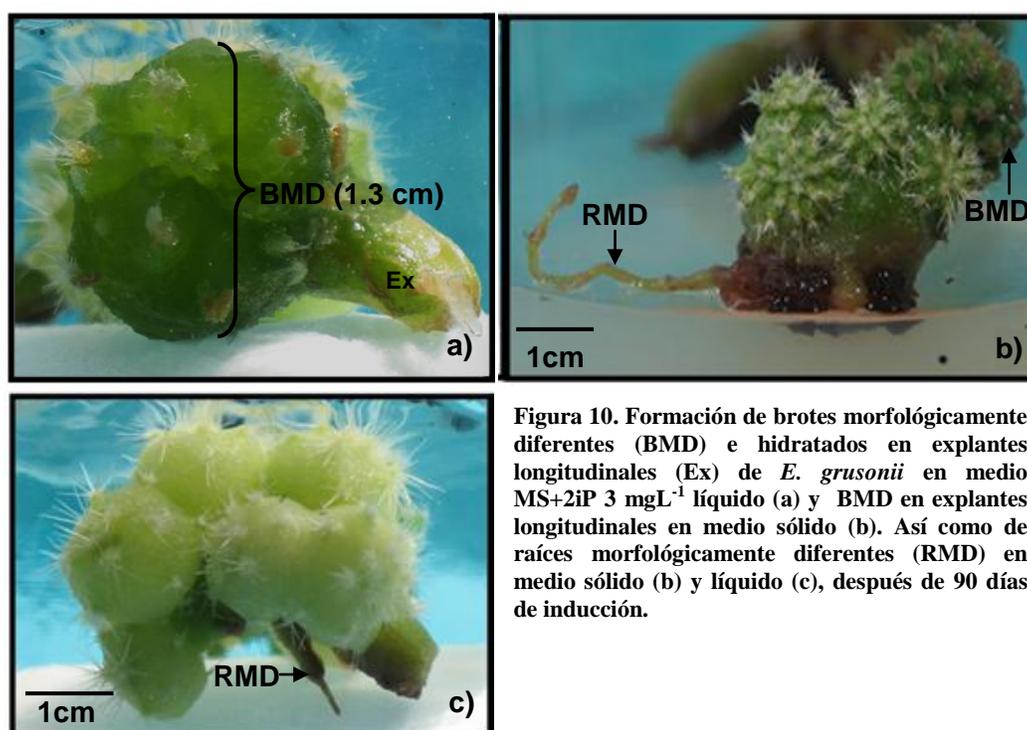


Figura 10. Formación de brotes morfológicamente diferentes (BMD) e hidratados en explantes longitudinales (Ex) de *E. grusonii* en medio MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido (a) y BMD en explantes longitudinales en medio sólido (b). Así como de raíces morfológicamente diferentes (RMD) en medio sólido (b) y líquido (c), después de 90 días de inducción.

En cuanto a la formación de BMD, no se tienen reportes de su anatomía, histología, fisiología, lo único que se ha reportado es su descripción morfológica; fueron reportados para *Pelecyphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera* en una proporción de 0.5 y 1% respectivamente (Giusti *et al.*, 2002). Por su parte, Zamora (2007) reportó 35% de estos brotes después de 12 semanas en medio de inducción, a los que llamó brotes de apariencia anormal. Mientras que Rodríguez (2006) para *E. grusonii* reportó el 50.25% llamándolos de la misma manera. Todos estos trabajos y el presente estudio concuerdan en que estos brotes no presentan una morfología bien definida, ya que se observó un tamaño mayor comparado con los brotes normales, tubérculos grandes, tricomas color marrón, las espinas no se definieron y no se desarrollaron así como la base del brote presentó un mayor diámetro en la zona de contacto con el explante; debido a lo anterior los brotes no se individualizaron ya que en trabajos previos Rodríguez (2006) y Zamora (2007) se llevó a cabo su individualización y no sobrevivieron (datos no publicados). De acuerdo con Pospóšilová y colaboradores (1999), estas características pueden deberse a las condiciones *in vitro* como la disponibilidad de nutrimentos, la alta humedad y la poca radiación lumínica, que en conjunto dan como resultado, en algunos casos, plántulas *in vitro* con morfología, anatomía y fisiología diferente, lo cual complica su establecimiento a condiciones *ex vitro*. Calva y Pérez (2005) señalan que estas condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas, las cuales se reflejan primero en la morfología, aún cuando éstos provengan de un mismo explante.

Existen escasos reportes acerca del desarrollo de raíces morfológicamente diferentes, por ejemplo, Shishkova y colaboradores (2006) quienes reportaron para *Stenocereus gummosus* y *Ferocactus peninsulæ* que la influencia del genotipo de las plantas utilizadas sobre la regeneración de raíces es más fuerte que la influencia de las concentraciones de hormonas en los medios de cultivo; con base en esto, se sugiere que el genotipo del explante de *E. grusonii* determinó la morfología de estas raíces. Radice (2010) señala que el genotipo es un factor determinante en todos los procesos

morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* así como también para la diferenciación y crecimiento de brotes, por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo como las condiciones de cultivo seleccionadas, deben ser específicos para cada situación en particular.

#### 6.5.4 Hiperhidratación de brotes en medio líquido y sólido

Durante el desarrollo de brotes se presentaron problemas de hiperhidratación. Los primeros síntomas se detectaron al día 33 posterior a la siembra en medio líquido, y en medio sólido a los 48 días. Transcurridos 90 días posteriores a la siembra se registró el 24.4% de brotes hidratados en medio líquido (Figura 11a), mientras que en medio sólido el 2.7%; estos brotes se caracterizaron por presentar una apariencia vítrea y translúcida, aumento en su volumen, de color verde claro, y ocasionalmente con aréolas atrofiadas en las que no se observaron espinas ni tricomas (Figura 11b).

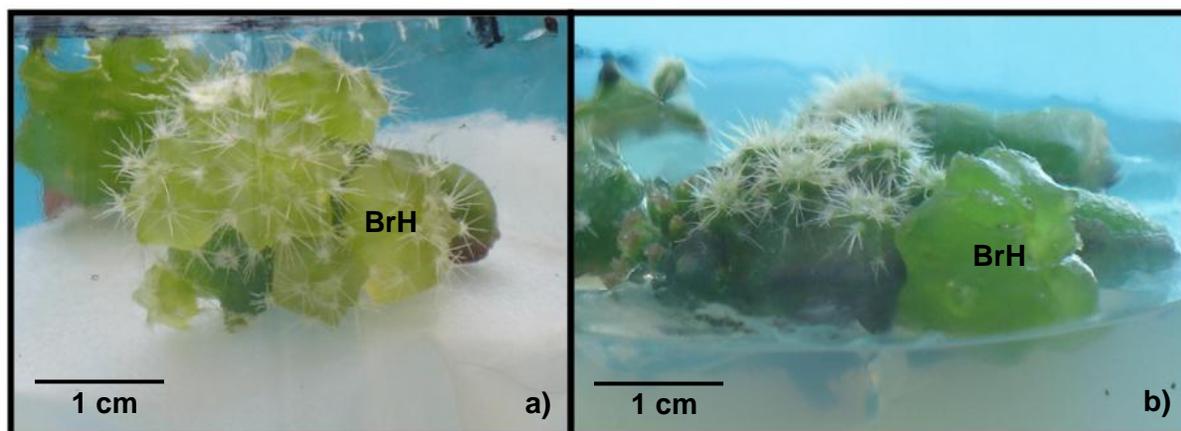


Figura 11. Brotes hidratados (BrH) de *E. grusonii* en medio MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido (a) y sólido (b).

De acuerdo a Kevers y colaboradores (2004), la hiperhidratación puede deberse a la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento; lo que coincide con diversos trabajos de cultivo *in vitro* donde se reporta que la hiperhidratación está asociada a elevadas concentraciones de citocininas y en particular a la presencia de BA en el medio de cultivo, tal es el caso de *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis*, donde se reportó el 62.4% y 63.7% de brotes hiperhidratados respectivamente (Giusti *et al.*, 2002), mientras que para *Astrophytum ornatum*, Mendoza (2007)

reportó más del 50% y, Zamora (2007), el 67% para *Thelocactus bicolor*. Dichos porcentajes de hiperhidratación son mayores a los obtenidos en este estudio, sin embargo, son similares a los reportados por Rodríguez (2006), López (2009) y Lara (2010), quienes reportaron para *Echinocactus grusonii*, *Mammillaria coahuilensis* y *Aporocactus flagelliformis* el 3.6%, 12% y 2% respectivamente; las diferencias entre estos resultados sugieren que altas dosis de citocininas incrementan la susceptibilidad de los tejidos a la hiperhidratación, ya que inducen una mayor difusión de agua en el tejido, pero además dicha respuesta varía de acuerdo a la especie (George *et al.*, 2008).

Para evitar este desorden morfo-fisiológico se recomienda utilizar altas concentraciones de agar en el medio (0.8-1.2%), reducir la concentración de reguladores de crecimiento y utilizar algunos agentes antivitrificantes como el floroglucinol, el cual es un promotor de la biosíntesis de la lignina que se encuentra en la pared celular de las plantas, en el cultivo *in vitro*, el desarrollo de lignina reduce la hiperhidratación (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2002).

En este trabajo, la hiperhidratación registrada para brotes de *E. grusonii* no fue severa, por tal motivo no fue necesario recurrir a estas recomendaciones, sin embargo se sugiere que la permanencia máxima de los brotes en medio líquido sea menor a 90 días.

#### **6.6 Proliferación de brotes secundarios en medio MS 50% sólido**

Después de tres meses en el medio de inducción sólido y líquido (MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup>), el explante junto con los brotes formados se subcultivaron en medio MS 50% sólido. Después de 18 días de haber sido subcultivados se observó la formación de brotes secundarios de aspecto normal que se originaron a partir de la región apical y lateral de los brotes previamente formados en medio líquido, su morfología fue similar a la de los brotes normales, es decir, brotes con forma globosa de color verde oscuro, tubérculos con aréolas y abundantes espinas de color blanco y un tamaño menor en comparación con el brote del cual se originaron (Figura 12a). El promedio de brotes formados en explantes procedentes de medio líquido (3 brotes/explante), formaron 0.43 brotes secundarios en promedio, que

son aquellos que se forman a partir de un brote inicial, respuesta que sólo se presentó en los brotes procedentes del medio líquido.

Así mismo, los BMD procedentes del medio líquido y sólido también formaron brotes secundarios de aspecto normal (brotes de menor tamaño en comparación al BMD que lo originó, forma globosa, color verde oscuro, tubérculos con aréolas y espinas color blanco), éstos se desarrollaron en la región apical del BMD (Figura 12b). Se desarrollaron en promedio 0.63 BMD por explante en medio líquido, los cuales originaron en promedio 0.4 brotes secundarios por BMD; mientras que el promedio de BMD por explante (0.46) formados en medio sólido dio lugar a la formación de 0.06 brotes secundarios por BMD.

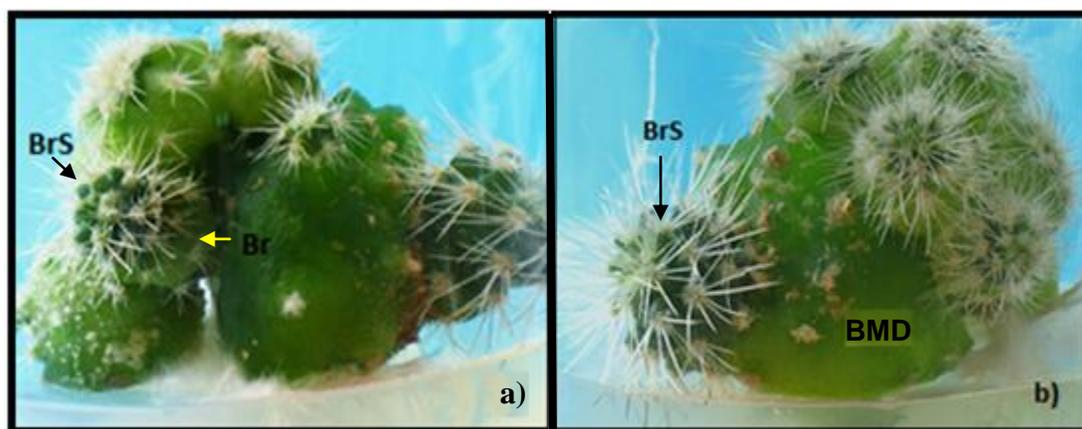
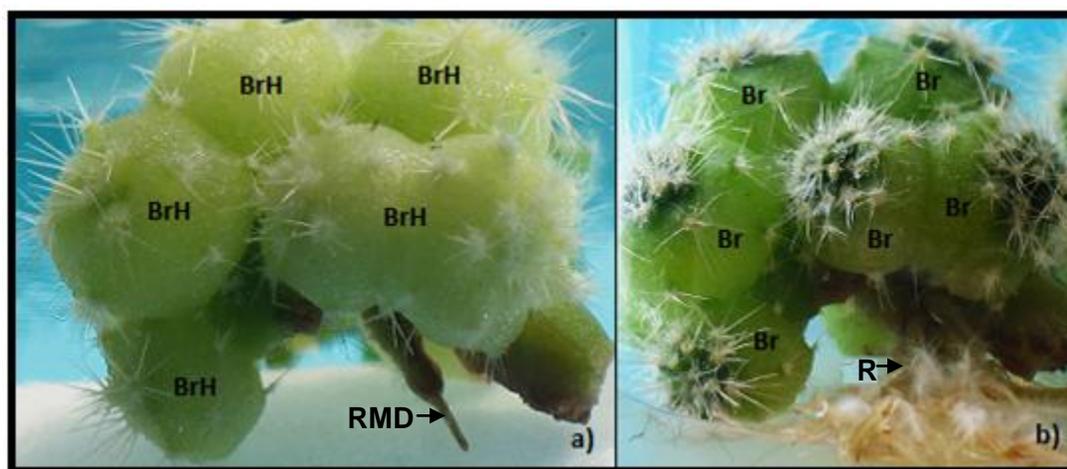


Figura 12. Formación de brotes secundarios (BrS) de *E. grusonii* en medio MS 50% sólido a partir de brotes previamente desarrollados (Br) (a), así como brotes morfológicamente diferentes (b) procedentes de medio de MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido.

El desarrollo de brotes secundarios procedentes de las aréolas de brotes iniciales, indica que esta especie puede mantener su potencial morfogénico y continuar generando brotes después del periodo de inducción, esto puede deberse a que los brotes comienzan a producir sus propias citocininas lo cual hace que haya una mayor estimulación a la formación de brotes (Orellana, 1998b), efecto reportado para diferentes especies de cactáceas como *Turbinicarpus laui* (Mata *et al.*, 2001), *Pelecypora strobiliformis* (Flores, 2004), *T. subterraneus* y *T. lophophoroides* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), *Neobuxbaumia tetetzo* (Galván, 2005), *Echinocactus grusonii* (Rodríguez, 2006), *Astrophytum ornatum* (Mendoza, 2007) y *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

Por otro lado, Rodríguez (2006) señaló para *E. grusonii*, que los BMD pueden ser un tejido potencial al activar sus aréolas y desarrollar brotes secundarios de apariencia normal; en este estudio se observó la misma respuesta, lo cual sugiere que los cambios fenotípicos generados por genes que son estimulados y expresados por los efectos del cultivo *in vitro* dan como resultado BMD los cuales no necesariamente son heredables, al no presentar cambios en el material hereditario (Pérez, 1998). No obstante, Zamora (2007) no observó la formación de brotes secundarios a partir de BMD para *Thelocactus bicolor*, estos resultados muestran que los cambios epigenéticos varían según la especie.

Aunado a esto, los brotes hidratados procedentes del medio sólido y líquido (Figura 13a), los cuales presentaban su tallo con un aspecto vítreo translúcido con una coloración entre verde pálido y amarillo, con tubérculos poco definidos y con escasas raíces, al ser subcultivados a medio MS 50%, fueron adquiriendo paulatinamente un tallo de aspecto normal, de color verde oscuro con tubérculos bien definidos en los que se incrementó el número de espinas y con raíces que desarrollaron gran cantidad de pelos radicales (Figura 13b).



**Figura 13. Brotes hidratados (BrH) y raíz morfológicamente diferente (RMD) en medio MS+2iP 3 mgL<sup>-1</sup> líquido (a); mismos brotes después de ser subcultivados e medio MS 50%.**

La hiperhidratación es un serio problema en el cultivo de tejidos vegetales, ya que puede impedir el enraizamiento y sobrevivencia de los brotes, sin embargo, los brotes de *E. grusonii* que presentaron este problema se recuperaron y continuaron con su desarrollo normal, enraizando y estableciéndose en invernadero.

### 6.7 Individualización y enraizamiento de brotes

Brotos individualizados de 0.5 a 1.5 cm de longitud de *E. grusonii* provenientes de medio MS 50%, se sembraron en medio MS basal; después de seis días se observó el desarrollo de las primeras raíces de manera espontánea en la zona basal del brote. Después de 12 semanas de incubación, el 97% de los brotes individualizados de 3 cm de longitud promedio (Figura 14) formaron raíces, las cuales fueron abundantes, presentando una raíz primaria de color verde claro, raíces secundarias de color blanco o amarillo y algunos pelos radicales (Figura 15).

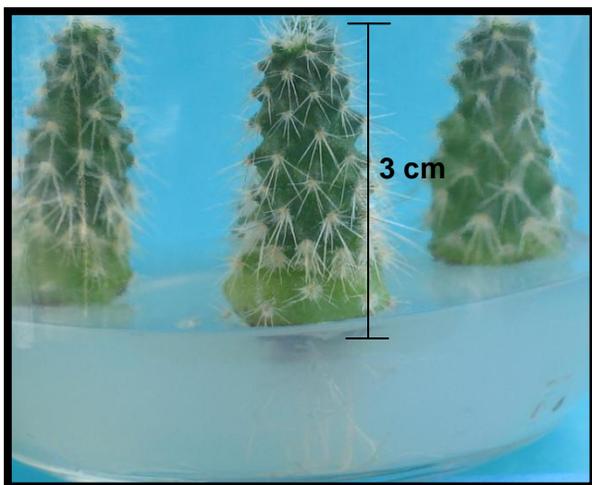


Figura 14. Brotos individualizados de *E. grusonii* en medio MS basal después de 12 semanas de incubación.

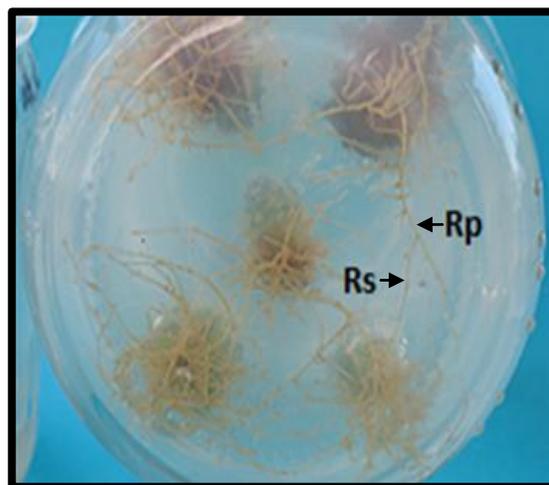


Figura 15. Raíces formadas por brotes individualizados de *E. grusonii* en medio MS basal después de 12 semanas de incubación.

La elongación y enraizamiento de los brotes, es una de las etapas más importantes de la micropropagación, en la cual se induce la elongación y formación de raíces para que sean capaces de sobrevivir en sustrato, por lo que resulta de vital importancia que las raíces estén en contacto directo con el medio para la absorción de nutrientes y el soporte de la planta (George *et al.*, 2008). Dado lo anterior, diversos autores recomiendan el uso de medios de cultivo (de preferencia en estado líquido) adicionados con auxinas, disminuir a la mitad la concentración de sales minerales, elevar la concentración de sacarosa, y el uso de carbón activado para inducir la formación de raíces (Orellana, 1998b; George *et al.*, 2008). Sin embargo, Escobar y colaboradores (1986) mencionan que al adicionar alguna auxina al medio se pueden obtener resultados óptimos de enraizamiento, aunque también señalan que basta con las auxinas endógenas para tener buenos resultados en este proceso. Además, en ausencia de citocinina exógena la relación auxina/citocinina endógena favorece

a las auxinas y por tanto se estimula la formación de raíces (Montalvo *et al.*, 2004). Esto pudo corroborarse en brotes individualizados de *E. grusonii* al generar raíces (97%) sin la presencia de auxinas exógenas. Resultados similares fueron reportados por Santos (2005), quien observó para *Ferocactus glaucescens* el 97% de brotes enraizados en medio MS sin reguladores de crecimiento, mientras que para *Cephalocereus senilis*, Tapia (2006) reportó el 82% de enraizamiento y Soria (2006) obtuvo el 80% para brotes de *Mammillaria schiedeana* subsp. *schiedeana*. Así mismo se ha reportado para *Thelocactus rinconensis* (Díaz, 2007), *Pilosocereus sp.* (Montalvo *et al.*, 2004) y *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010) el 100% de brotes enraizados en medio MS sin reguladores de crecimiento. El desarrollo de un sistema radicular es importante ya que permite llevar a cabo el establecimiento de los brotes enraizados y realizar su aclimatización *ex vitro*.

### **6.8 Aclimatización y sobrevivencia *ex vitro***

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos; estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas, como tallos delgados, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y nutrición heterótrofo. Todos estos cambios provocan que gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante a las condiciones ambientales, por lo que la fase de aclimatización resulta trascendental para el establecimiento en condiciones *ex vitro* del material vegetal regenerado, y que este adquiera sus características morfológicas normales (Agramonte *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). En esta investigación, los brotes enraizados de *E. grusonii*, se mantuvieron 12 semanas en un cuarto de incubación ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16/8 h e intensidad luminosa  $40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), dentro de charolas de plástico con una mezcla esterilizada de tierra negra y tezontle (1:1) (Figura 16a); posteriormente fueron transferidos a un lugar donde les diera luz natural durante cuatro semanas; las charolas se abrieron ligeramente. Después de este tiempo los brotes incrementaron su volumen y longitud, la cual

fue en promedio 3.2 cm (Figura 16b). Posteriormente los brotes enraizados fueron trasladados a condiciones de invernadero para continuar con su aclimatización. A los ocho meses el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* para *Echinocactus grusonii* fue 95.14% (235 brotes sobrevivieron de un total de 247 brotes), dichos brotes presentaron una longitud promedio de 3.8 cm. El tallo, originalmente alargado por efecto de la iluminación dentro de los cuartos de incubación, fue adquiriendo su forma globosa a partir del ápice paulatinamente, éste presentó lana y numerosas espinas de tonos amarillos, característicos de la especie (Figura 16c). La mortandad se debió a la deshidratación de las plántulas, ya que éstas presentaron una apariencia rugosa de la epidermis y tallos delgados que gradualmente fueron perdiendo la coloración verde hasta presentar un tono café claro (Figura 16d); la pérdida de agua posiblemente fue ocasionada por una baja funcionalidad de los estomas que permanecen abiertos por efecto del cultivo *in vitro* donde la humedad relativa dentro de los frascos es más alta que en condiciones *ex vitro* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).



Figura 16. Aclimatización y sobrevivencia *ex vitro*. a) Brotes enraizados de *E. grusonii* en charolas de plástico con sustrato. b) Brotes de 3.2 cm de longitud después de cuatro meses de permanecer en luz natural. c) Brotes de 3.8 cm de longitud después de ocho meses de ser trasladados a condiciones de invernadero. d) Brote muerto por deshidratación.

El porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* obtenido para brotes enraizados de *Echinocactus grusonii* (95%) es similar a los reportados para otras especies de cactáceas, tales como *Cephalocereus senilis* al alcanzar el 96% de sobrevivencia (Choreño-Tapia *et al.*, 2002), para *Telocactus rinconensis* se reportó el 92% (Díaz, 2007), para *Ferocactus glaucescens* se registró del 80-90% (Santos, 2005) y para *Coryphantha retusa* el 95% (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser atribuidos a la aclimatización gradual que se les proporcionó a las plantas: primero, al mantenerlas un tiempo en las mismas condiciones ambientales de luz y temperatura a las que permanecieron *in vitro*; posteriormente, a temperatura ambiente dentro de las mismas charolas con la tapa abierta, lo que permitió inducir cambios fisiológicos en las plantas que favorecieron su sobrevivencia en condiciones *ex vitro*.

Otra condición que influyó en la sobrevivencia *ex vitro*, fue colocar las charolas donde recibieran luz natural semanas antes de ser transferidas a condiciones de invernadero para incrementar gradualmente la intensidad luminosa, técnica recomendada por Agramonte y colaboradores (1998). Finalmente, el sustrato también contribuyó al establecimiento *ex vitro*, ya que este proporcionó un ambiente para el crecimiento de las raíces y de la planta al aportar aire y nutrientes.

Por otro lado, el bajo porcentaje de brotes muertos por deshidratación de *E. grusonii* (4.8%) no resultó ser un problema grave; Malda y colaboradores (1999) señalan que aunque la pérdida de agua es relativamente significativa durante la aclimatización, en algunas especies de la familia Cactaceae, es posible que el cuerpo suculento permita a las plantas sobrevivir y recuperarse a la deshidratación.

- México es el principal centro de diversificación de las cactáceas, sin embargo un gran número de especies pertenecientes a esta familia se encuentran en peligro de extinción, debido principalmente a la modificación y destrucción de su hábitat por las diferentes actividades humanas, aunada a sus características biológicas como un lento crecimiento y ciclos de vida largos. Tal es el caso de *Echinocactus grusonii*, especie en peligro de extinción. Esta investigación hizo más eficiente el sistema de propagación *in vitro* de *E. grusonii* empleando medio de cultivo líquido, el cual facilitó la obtención de explantes longitudinales al promover el

desarrollo y crecimiento de las plántulas. Dichos explantes fueron menos propensos al oscurecimiento u oxidación al ser establecidos en medio líquido, ya que en este estado físico se propicia la dispersión de sustancias tóxicas; pero sobre todo incrementó la regeneración *in vitro* de brotes con morfología bien definida, así como la proliferación de brotes secundarios, logrando su establecimiento *ex vitro*.

- Es importante señalar que el presente estudio reporta la propagación *in vitro* de una cactaceae (*Echinocactus grusonii*) empleando medio de cultivo líquido, reportando altos porcentajes de sobrevivencia.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ El proceso de escarificación ( $H_2SO_4$  concentrado) y desinfección empleado para las semillas de *E. grusonii* fue eficiente ya que se obtuvo el 0% de contaminación.
- ❖ El porcentaje de germinación *in vitro* fue mayor (78%) en medio MS 50% sólido que en medio MS 50% líquido (57%) a los 56 y 60 días respectivamente.
- ❖ La longitud promedio de las plántulas fue mayor en medio líquido (1.2 cm) que en medio sólido (8 mm) después 40 días de cultivo.
- ❖ La hiperhidratación de plántulas germinadas *in vitro* fue mayor en medio sólido (8.6%) que en medio líquido (2.6%) a los 32 y 26 días posteriores a la siembra respectivamente.
- ❖ El 1.2% de plántulas germinadas *in vitro* en medio líquido presentaron problemas de oxidación a los 32 días posteriores a la siembra y en medio sólido se registró el 3.5% después de 26 días.
- ❖ Los explantes longitudinales sembrados en el medio de inducción ( $MS+2iP\ 3\ mgL^{-1}$ ) presentaron problemas de oxidación en ambos medios, líquido (16%) y sólido (36%), a los 90 días de la siembra.
- ❖ En los explantes se presentó rizogénesis directa, la cual fue mayor en medio líquido (63%) que en medio sólido (33%).
- ❖ La formación de brotes ocurrió vía directa por activación de aréolas, tanto en medio líquido como sólido.
- ❖ El medio líquido promovió la formación de un promedio mayor en el número de brotes por explante (3) que el medio sólido (1.8) a los 90 días de inducción.
- ❖ Los primeros síntomas de hiperhidratación de brotes se detectaron a los 33 días en medio líquido y a los 48 días en sólido, alcanzando el 24.4% y 2.7% respectivamente a los 90 días de cultivo.

- ❖ La proliferación de brotes secundarios fue observada únicamente en los brotes obtenidos en medio líquido después de 18 días de haber sido subcultivados en medio MS 50% sólido.
- ❖ Después de 12 semanas de incubación, el 97% de brotes individualizados sembrados en medio MS basal sólido formaron raíces de manera espontánea.
- ❖ El porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* para *E. grusonii* fue de 95% después de ocho meses de ser trasladados a invernadero.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Descripción botánica de *Echinocactus grusonii* Hildmann.

De acuerdo a Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), Scheinvar (2004) y Sánchez *et al.* (2006), ***Echinocactus grusonii*** es una planta solitaria, globosa. **Tallo** verde claro, hasta de 1 m o más de ancho, ápice lanoso color amarillo. **Costillas** 20 a 37, delgadas, altas y cercanas unas de las otras. **Aréolas** grandes, alargadas y distantes entre sí cerca de 1 cm, a veces más o menos confluentes, las cercanas al ápice con lana amarillenta. **Espinas** de color amarillo dorado cuando jóvenes, después más pálidas, y las viejas con algo de tinte castaño, subuladas, anuladas. **Espinas radiales** 8 a 10, subuladas, de 3 cm de longitud. **Espinas centrales** 4, más de 5 cm de longitud. **Flores** amarillas, brillantes, de 4 a 6 cm de longitud y 5 cm de diámetro, dispuestas en corona, incluidas en la lana apical, en la anthesis nunca se extienden mucho. **Pericarpelo** esferoidal recubierto de lana y escamas angostas y acuminadas, papiráceas; tubo receptacular de 3 cm de diámetro, cubierto con escamas lanceoladas y largamente acuminadas. **Segmentos exteriores del perianto** largamente acuminados, de color castaño en el envés y amarillo en el haz. **Segmentos interiores del perianto** de color amarillo cadmio, con brillo sedoso, erectos, angostamente lanceolados, acuminados, más cortos que los exteriores. **Estambres** amarillos, numerosos, conniventes, formando un grueso cicilindro en el centro; estilo amarillo; lóbulos del estigma 10 a 12, amarillos. **Fruto** amarillento, oblongo hasta esférico, de 12 a 20 mm de longitud, de pared delgada, cubierta con escamas y lana blanca o desnudo hacia abajo. **Semilla** negruzca, de 1.5 mm de longitud; testa brillante, de color castaño.

**8.2 Anexo 2. Formulación de los medios de cultivo MS y MS 50% (Murashige y Skoog, 1962).**

	<b>MS</b> <b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>MS 50% sólido</b> <b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>MS 50% líquido</b> <b>mg L<sup>-1</sup></b>
<b>MACROELEMENTOS</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	825
KNO <sub>3</sub>	1900	950	950
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	185	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	85
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	220	220
<b>MICROELEMENTOS</b>			
KI	0.83	0.415	0.415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.1	3.1
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.89	8.445	8.445
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	4.3	4.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.125	0.125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	0.0125
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	0.0125
<b>SOLUCIÓN DE Fe</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3	18.65	18.65
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	13.9	13.9
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>			
<b>VITAMINAS</b>			
Ácido nicotínico (B3)	0.5	0.25	0.25
Piridoxina-HCl (B6)	0.5	0.25	0.25
Tiamina-HCl (B1)	0.1	0.05	0.05
<b>INOSITOL</b>			
myo-Inositol	100	50	50
<b>GLICINA</b>			
Glicina	2	1	1
<b>Sacarosa</b>	30 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>
<b>pH</b>	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8
<b>Agar</b>	8 gL <sup>-1</sup>	8 gL <sup>-1</sup>	

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte P. D., F. T. Jiménez y M. A. R. Dita. 1998. Aclimatización. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara. p. 193-206.
- Alanís F. G. y C. Velazco. 2008. Importancia de las Cactáceas como recurso natural en el noroeste de México. *Ciencia UANL* 11(1): 5-11.
- Albany N., J. Vilchez, S. León de Sierralta, M. Molina y P. Chacín. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Revista de la Facultad de Agronomía* 23(2): 1-10.
- Álvarez R., H. Godínez-Álvarez, U. Guzmán y P. Dávila. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas implicadas para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 7-16.
- Anderson E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland, Oregon. p. 73 y 83.
- Anicua F. J. y R. V. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación de los estatus metabólicos *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Estado de México. 68 pp.
- Arias M. S. 1997. Distribución General. En: CONABIO-SEMARNAP-PROFEPA-UNAM-Centro Universitario de Comunicación de las Ciencias (Eds.). Suculentas Mexicanas. Cactáceas. CVS Publicaciones. México D. F. p. 17 y 101.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Barba A. A. 1991. Reguladores del crecimiento vegetal. En: D. V. Hurtado y M. E. Merino (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México. p. 48-66.
- Bárcenas R. T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. CONABIO. *Biodiversitas* 68:11-15.
- Barthlott W. y D. Hunt. 2000. Seeds diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research* 5: 1-173.
- Becerra R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* 6(32): 2-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de CITES. *Biodiversitas* 6(40): 8-11.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 45-51.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Vol. 2. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 571 pp.

- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. p. 39-97.
- Bravo-Marentes C. 1999. Inventario nacional de especies vegetales y animales de uso artesanal. Asociación Mexicana de Arte y Cultura Popular AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J002. México, D.F.
- Bregman R. y F. Bouman. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 86: 357-374.
- Britton N. L. y J. N. Rose. 1963. The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family. Vols. 3 y 4. Dover Publications, Inc. Nueva York. 318 pp.
- Calva C. G. y J. V. Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6 (11): 1-16.
- Carmona-Lara M. del P., R. Foroughbakhch, A. Flores-Valdés, M. A. Alvarado y M. A. Guzmán-Lucio. 2008. Flora cactológica y especies asociadas en el área natural protegida Sierra Corral de los Bandidos, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 307-323.
- Castro-Gallo I., E. Meza-Rangel, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4 (2): 5-24.
- Celestino C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14(3): 345-357.
- Chablé M. F., E. B. Alvarado, J. A. R. Romero, J. A. L. Rangel, N. V. Morán, J. P. Covarrubias y J. P. Ramírez. 2007. Regeneración *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann. En: Libro de resúmenes de XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, del 25 al 29 de junio de 2007, Morelia, Michoacán. p. 31.
- Chavarría E., B. Jiménez y F. Yeh. 1999. Protocolo para la reproducción masiva *in vitro* de caña de azúcar en Costa Rica. En: Libro de resúmenes del XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, del 19 al 23 de julio de 1999, San José, Costa Rica. p. 207-208.
- Chávez V. M., O. C. González, P. W. Juárez, C. Sánchez, M. Mata, J. Flores, C. Guzmán, J. Reyes, C. Mandujano, R. Cruz, E. Sandoval, E. Calderón, A. Martínez y L. Márquez. 2006. Conservación de cactáceas mexicanas en peligro de extinción. V Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas, Hermosillo, Sonora. p. 561-596.
- Chávez M. R. J., J. G. O. Hernández y E. M. Sánchez. 2007. Documentación de factores de amenaza para la flora cactológica del semidesierto queretano. *Boletín Nakari* 18(3): 89-95.
- Choreño-Tapia J. M., H. González-Rosa, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(2): 183-196.

- Colmenares M. y C. Giménez. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía* 20(4): 1-10.
- Collin H. A. y G. S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. Springer Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157p.
- Cortés V. C. M., J. C. P. Sánchez, M. R. Alvarado, L. S. Almanza y S. V. Fraire. 2008. Establecimiento de un sistema de micropropagación de *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica* 4(2): 1-7.
- Cuéllar C. L., M. E. R. Morales y J. F. N. Treviño. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en cactáceas. *Zona Árida* 10: 129-133.
- Dávila-Figueroa C., M. de L. De la Rosa-Castillo, E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 540-545.
- Debergh P. C. y R. H. Zimmerman. 1991. *Micropropagation: technology and application*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 479 pp.
- Del Rivero B. N., E. Quiala, D. Agramante, R. Barbón, W. Camacho, L. Morejón y M. Pérez. 2004. Empleo de sistema de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada. *Biotecnología Vegetal* 4(2): 97-100.
- Díaz R. B. 2007. Propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton y Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 63 pp.
- Escobar A. H., V. M. Villalobos y A. M. Villegas. 1986. *Opuntia* propagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7(3): 269-277.
- Espinoza N., R. Lizárraga, C. Sigueñas, F. Buitrón, J. Bryan y J. H. Dodds. 1992. Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 19 pp.
- Evans D. E., J. O. D. Coleman y A. Kearns. 2003. *Plant cell culture*. Bios Scientific. USA. 194 pp.
- Fay M. F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33- 48.
- Fernández C. O., E. C. Ojito y L. A. Pérez. 2002. Obtención de Flavonoides a partir del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L. *Universidad Eafit* 127: 65-71.
- Fitz-Maurice W. A. y B. Fitz-Maurice. 2002. *Echinocactus grusonii*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Flores S. J. C. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pelecyphora strobiliformis* (Wendermann) Fric et Schelle (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 58 pp.

- Flores J., A. Arredondo y E. Jurado. 2005. Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* 25: 183-187.
- Flores R. D. Y. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada el estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 61 pp.
- Frías D. P. M. 1989. Desarrollo morfológico para la propagación vegetativa de *Echinocactus grusonii* Hildman (Cactaceae), mediante cultivo de tejidos. Tesis de Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Estado de México. 87 pp.
- Fuentes M. V. y N. M. M. Martínez. 2001. Micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de aréolas activadas *in vivo* por etiolación. Tesis de Licenciatura (Biología), Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala.
- Fuentes M. A. 2013. Embriogénesis somática en 12 clones comerciales de *Coffea canaphora* var. robusta (Rubiaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 89p.
- Gamborg O. L., R. A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Galván T. A. 2005. Micropropagación de *Neobuxbaumia tetetzo* (Cactaceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, con fines de conservación *ex situ*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Estado de México. 52 pp.
- García-Águila L. y M. de F. K. Acosta. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* 7(2): 67-79.
- George E. F. y P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Par. Hand Book and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited. Gran Bretaña. 690 pp.
- George E. F., M. A. Hall y G.J. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd. Edition. Volume 1. The Background. Springer. The Netherlands. 501 pp.
- Geydan T. D. y L. M. Melgarejo. 2005. Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana* 10(2): 3-15.
- Gibson A. y P. Nobel. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. Londres. 285 pp.
- Giménez C., E. de García y O. Haddad. 2008. Genetic and resistance stability to Black Sigatoka disease during micropropagation of *Musa* CIEN BTA-03 somaclonal variant. *International Journal of Experimental Botany* 77: 65-79.
- Giusti P., F. Vitti, F. Fiocchetii, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.

- Glass E. C. 1998. Guía para la identificación de Cactáceas amenazadas de México. Vol 1. Ediciones Cante. México D.F. 239 pp.
- Gómez K. R. 1998. Embriogénesis somática. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. p. 57-79.
- Gómez S. D. A. 2001. Enciclopedia ilustrada de los Cactus y otras Suculentas (Descripción de las especies, hábitat y cuidados de cultivo). Ediciones Mundi-Prensa. Editorial Floramédica. p. 20-21.
- Gómez J. R. 2008. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*, Hernández y Anderson (Cactaceae), especie endémica mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 71 pp.
- Gutiérrez M. M. de los A. 2009. Propagación *in vitro* de *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck ex Walp.) Haage, (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo. 73 pp.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM. CONABIO. México. p. 58
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México. 90 pp.
- Hartmann H. T., D. E. Kester, F. T. Davies Jr. y R. L. Geneve. 1997. Plant propagation: principles and practices. 6ª Ed. Prentice Hall. New Jersey. 770 pp.
- Hartmann H. T., D. E. Kester, F. T. Davies Jr. y R. L. Geneve. 2002. Plant propagation principles and practices. Prentice Hall. New Jersey. 880 pp.
- Hazarika B. N. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108 (2): 105-120.
- Hernández M. H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Hernández J. G., R. J. Chávez y E. Sánchez. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto Queretano. CONABIO. *Biodiversitas* 70: 6-9.
- Hernández-Oria G. J., R. Chávez-Martínez y E. Sánchez-Martínez. 2007. Factores de riesgo en las Cactaceae amenazadas de una región semiárida en el sur del Desierto Chihuahuense, México. *Interciencia* 32(11): 728-734.
- Hvoslef-Eide A. K. y W. Preil. 2005. Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer. The Netherlands. 588 pp.
- Iriondo A. J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Investigación Agraria: Protección Vegetal* 16(1): 5-24.

- Jiménez G. E. A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. p: 13-24.
- Jiménez S. C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* 12(1): 1-23.
- Johnson J. L y Emino E. R. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal* (US) 51:275-277.
- Kane M. E. 2000. Propagation from preexisting meristems. En: Trigiano R. N. y J. Gray (eds.). Plant Tissue Culture and laboratory exercises. U.S.A. p. 75-86.
- Kevers C., T. Franck, R. J. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.
- Kitto S. L. 1997. Commercial micropropagation. *Hort Science* 32(6): 12-18.
- Krikorian A. D. 1993. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 42-76.
- Lara M. L. 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem. (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 98 pp.
- Lascuraín M., L. Barraza, E. P. Díaz, F.S. Gual, M. Maunder, J. Dorantes y V. E. Luna. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: Capital Natural de México. Vol. II. Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO. México. pp: 517-544.
- Lee-Espinosa H.E., J. Murguía-González, A. Laguna-Cerda, B. García-Rosas, M. R. Gámez-Pastrana, M. E. Galindo-Tovar, I. Landero-Tórres, L. Iglesias-Andreu y N. Santana-Buzzy. 2009. Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* para la producción de semillas sintética. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 33-40.
- Linsmaier E. M. y F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 18: 100-127.
- Litz R. E. y R. L. Jarret. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p: 144-171.
- Lizalde-Viramontes H. E., E. M. Pérez-Molphe-Balch y F. C. Dávila. 2004. Propagación por técnicas del cultivo de tejidos en cactáceas de los géneros *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*. En: Hernández R. M., H. R. M. Cházaro, B.M. J. Cházaro y G. J. A. Vázquez (Eds.). Resúmenes IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. Guadalajara, México. 268 pp.

- Loaiza A. C. 2008. Análisis fisiológico del efecto de tres marcas de agar y Gelrite en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae) Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Nacional Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 68 pp.
- López G., L. Rocha, I. Cantú y A. Martínez. 2001. Evaluación de tratamientos pregerminativos para la biznaga verde *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto. En: Alanís F. G. y A. M. Ledezma. Memorias del III Taller Regional de cactáceas del noreste de México, del 23 al 25 de agosto 2001. Universidad Autónoma de Nuevo León. p: 70-73.
- López H. A. 2009. Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie amenazada del estado de Coahuila. Tesis Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 67 pp.
- López E. A. L., L. P. Olgún, J. Márquez y M. López. 2009. Establecimiento y propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas. En: Pulido F. G., W. Scott, J. C. Gaytán, A. L. López, M. E. López, M. A. N. Villavicencio, L. Romero y A. Moreno. Biología de conservación III. Uso y manejo de la biodiversidad. UAEH. pp. 55-65.
- Mroginski L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos vegetales. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ArgenBio. p. 17-25.
- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81(1): 71-87.
- Mandujano M. C., J. Golubov y J. Reyes. 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. *Biodiversitas* 6(40): 4-7.
- Manzo R. S. M. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semillas para su conservación. Tesis de Maestría en Ciencias, Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad Fruticultura, Campus Montecillos, Colegio de Postgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillos, Texcoco, Estado de México, 47 pp.
- Márquez D. E. 2000. Manual técnico para propagar cactáceas. Tesis de Licenciatura (Ingeniero Agrícola), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 115 pp.
- Martínez R. A. Y. 2007. Evaluación fisiológica de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 69 pp.
- Martínez-Vázquez O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64 (1): 99-105.

- Martorell C. y E. M. Peters. 2009. Disturbance-Response Analysis: a Method for Rapid Assessment the Threat to Species in Disturbed Areas. *Conservation Biology* 23(2): 377- 387.
- Mata R. M., M. A. Monroy, K. G. Moebius y V. M. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass Et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Development Biology* 37: 400-404.
- Mendoza M. G. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 87 pp.
- Moebius-Goldammer K. G., M. Mata-Rosas y V. M. Chávez-Ávila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 39(4): 388-393.
- Molina M. L., H. Sagastume Mena y A. Suchini. 2005. Conservación *in vitro* de cinco especies de cactáceas en peligro de extinción de Guatemala, distribuidas en los departamentos de Progreso y Zacapa. CONCYT. Guatemala. 15 pp.
- Montalvo G., E. Quiala, R. Mederos, J. Matos, M. de Feria, M. Chávez, O. Placencia y M. León. 2004. Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. *Biología Vegetal* 4(1): 43-48.
- Muñoz de Malajovich M. A. 2006. Biotecnología. Editorial Universidad Autónoma de Quilmes. Argentina. 424 pp.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Navarro C. M. del C., G. O. Cervantes y J. O. C. Lázaro. 2008. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación de dos especies de *Mammillaria*. *Zona Árida* 12(1): 97-105.
- Nobel P. 2002. Cacti, biology and uses. University of California Press. California. 280 pp.
- Novoa S., A. Ceroni y C. Arellano. 2005. Contribución al conocimiento de la fenología del cactus *Neoraimondia arequipensis* subsp. *roseiflora* (Weddermann & Backeberg) Ostolaza (Cactaceae) en el Valle del Río Chillón, Lima-Perú. *Ecología Aplicada* 4(1 y 2): 35-40.
- Olguín S. L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 85 pp.
- Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2004. Micropropagación. En: Echenique V., C. Rubinstein, L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Argentina. p. 161-172.
- Ordóñez M. M. A. 2003. Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 69 pp.

- Orellana P. P. A. 1998<sup>a</sup>. Introducción a la propagación masiva. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara. P. 125-133.
- Orellana P. P. A. 1998<sup>b</sup>. Propagación vía organogénesis. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara. p. 151-178.
- Papafotiou M., G. N. Balotis, P. T. Louka y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.
- Pérez-Alonso N. y E. Jiménez. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195-211.
- Pérez P. J. N. 1998. Variación Somaclonal. En: J. N. Pérez (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara. p. 105-121.
- Pérez G. C. 2010. Micropropagación de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex S. D.) Coult. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 46 pp.
- Pérez-Molphe-Balch E. M., M. R. Pérez, E. A. Villalobos, E. R. Meza, L.R. Morones y H. V. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cell Development Biology Plant* 34: 131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E. M., R. Ramírez Malagón, H. G. Núñez Palenius y N. Ochoa Alejo. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. 1<sup>a</sup>Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. p: 9-37 y 71-80.
- Pérez-Molphe-Balch E. M. y C. A. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis ehrenberg* and *P. strobiliformis*. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38: 73-78.
- Pezoa A. 2001. Estrategias de conservación de la diversidad biológica. En: Squeo F. A., G. Arancio y J. R. Gutiérrez (Eds.). Libro Rojo de la Flora Nativa de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo. Ediciones Universidad de La Serena, Chile 18: 273-280.
- Pierik R. M. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 326 p.
- Pimienta B. E., A. M. Urias, B. C. R. Hernández y L. M. Morán. 2006. Desarrollo vegetal. Universidad de Guadalajara, Coordinación General Académica Unidad para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado. Guadalajara, Jalisco. 331 p.
- Pospóšilová J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzánková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4): 481-497.
- Quiala E., G. Montalvo y J. Matos. 2004. Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 195-199.

- Radice S. 2010. Morfogénesis. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ArgenBio. p. 27-33.
- Raven P.H., E. F. Ray y S. E. Eichhorn. 1992. Biología de las plantas. Vol. 2. Editorial Reverté. España. 773 p.
- Razdan M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2ª ed. Enfield. New Hampshire. U.S.A. 375 pp.
- Roca W. N. y L. A. Mroginski. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 pp.
- Rodríguez G. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Nacional Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 85 pp.
- Rojas G. S., J. L. García y M. R. Alarcón. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. CORPOICA, PRONATTA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 55 pp.
- Rojas-Aréchiga M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
- Rosa-Carrillo Ma. De L., M. S. Domínguez-Rosales, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez.Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* 37(2): 114.120.
- Rosas L. U. 2002. Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 110 pp.
- Ruedas M., T. Valverde y S. Castillo-Argüero. 2000. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimama* (Cactaceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 25-35.
- Ruvalcaba-Ruíz D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(1): 139-143.
- Salas-Cruz L. R., R. Foroughbackch-Pournabav, M. de L. Díaz-Jiménez, M. L. Cárdenas-Ávila y A. Flores-Valdes. 2011. Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 565-575.
- Salisbury F. B. y C. W. Ross. 2000. Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Paraninfo Thomson Learning. España. 258 pp.
- Sánchez-Chiang N. y V. M. Jiménez. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana* 21(1): 193-205.

- Sánchez E., S. Arias, M. Hernández-Martínez y R. Chávez. 2006. Ficha técnica de *Echinocactus grusonii*. En: Sánchez E. (compilador). Apuntes técnicos para el conocimiento de la situación de conservación de especies de la familia Cactaceae en el estado de Querétaro. Jardín Botánico Regional de Cadereyta "Ing. Manuel González de Cosío" Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCyTEQ). Base de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. CK016. México. D. F.
- Sánchez-Morán M.R. y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando metatopolina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 4(2):16-18.
- Santos D. M. del S. 2005. Micropropagación de *Ferocactus glaucescens* Britton & Rose, cactácea mexicana de valor ornamental. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 2 (3): 6-8.
- Santos-Díaz M. del S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. de L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 480-484.
- Santos D. M. del S., J. M. M. del C. Macías, A. A. Gómez y M. de L. Santos-Díaz. 2001. Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae) *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 24(2): 133-138.
- Saucedo A. S. G., L. E. G. Ramos y T. X. C. Reyes. 2008. Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Ciencia y Tecnología* 1: 17-21.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. 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*, 30 de diciembre de 2010. México D. F. p. 78.
- Scheinvar L. 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro: diversidad y riqueza. Fondo de Cultura Económica. México D. F. p. 57-59, 223-228.
- Shishkova S., N. E. Moreno, V. Castillo-Díaz, J. Arellano y J. G. Dubrovsky. 2006. Variabilidad genotípica de cactáceas con crecimiento determinado de la raíz en la regeneración de raíces a partir de callos. *Zonas Áridas* 10: 41-58.
- Soria C. D. 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subs. *schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Córdoba, Veracruz. 74 pp.
- Sosa-Rodríguez F. M., R. S. Ortiz, R. P. Hernández, P. M. Armas y D. S. Guillén. 2009. Propagación *in vitro* de *Heliconia standley* Macbride en Cuba. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 17-23.
- Stuppy W. y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88.

- Szabados L., V. M. Nuñez, L. M. Tello, G. Mafla, J. Roa y W. M. Roca. 1993. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 80-93.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Vol. II. Universitat Jaume I. Publicacions. 1338 pp.
- Tapia C. D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 73 pp.
- Trejo O. C. K., C. Ramírez y R. Q. Soltero. 2005. Micropropagación de Cactáceas. En: libro de resúmenes de Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. XVI Semana de la Investigación Científica. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 21 al 25 de noviembre 2005. Universidad de Guadalajara, México. p. 542-546.
- Trejo-Tapia G. y M. Rodríguez-Monroy. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia* 32(10): 669-674.
- Trigiano R. N. y D. J. Gray. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC Press. U.S.A. 454 pp.
- Vázquez-Sánchez M., T. Terrazas y S. Arias. 2012. El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteeae (Cactaceae, Cactoideae). *Botanical Sciences* 90(2): 97-108.
- Velázquez-Enciso L. E y Soltero-Quintana R. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46:56-62.
- Villalobos V. M. y T. A. Thorpe. 1993. Micropropagación, conceptos, metodología y resultados. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 128-141.
- Villavicencio G. E. E., A. C. González, A. G. Arredondo, L. D. Iracheta, S. S. Comparan y R. V. Casique. 2011. Micropropagación de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactácea ornamental del desierto Chihuahuense, en estatus de riesgo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(6): 37-54.
- Vojnov A. M. Rivero y D. Zappacosta. 2010. Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ArgenBio. p. 457-466.
- Zamora M. H. C. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 45 pp.
- Zimmerman J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plan Cell* 5: 1411-1423.