



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLOS**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

**Propagación *in vitro* de *Mammillaria*  
*coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran  
y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a  
partir de semilla para su conservación**

Sinai Mariana Manzo Rodríguez

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLOS, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

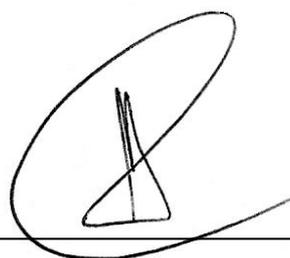
La presente tesis titulada “Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación”, realizada por la alumna: Sinai Mariana Manzo Rodríguez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

Consejero:



Dr. Héctor González Rosas

Asesor:



M. C. Alejandro Manzo González

Asesor:



M. C. Eldá Aracely Gaytán Acuña

Montecillos, Texcoco, Edo. de Méx., Julio del 2010

## **DEDICATORIAS**

A ESTIVALIZ, mi hija por ser el pilar de mi vida y superación.

A MI FAMILIA, por apoyarme en esta etapa de mi vida. Agradezco su cariño, guía y enseñanzas.

A MIS AMIGOS, por ayudarme incondicionalmente.

A MI PROMETIDO, por su cariño y apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Aprovecho esta oportunidad para manifestar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas de quienes recibí apoyo.

Quiero agradecer de una manera muy especial a CONACYT, a mi consejero el Dr. Héctor González Rosas y mis asesores el M.C. Alejandro Manzo González y la M. C. Elda Aracely Gaytan Acuña ellos gracias infinitas.

La cantidad de palabras no es insuficiente para describir mi agradecer a todos por su ayuda incondicional, en mi vida personal y académica.

## CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades de la familia Cactaceae	4
2.1.1. Usos	5
2.2. Clasificación taxonómica de los géneros	8
2.3. <i>Mammillaria coahuilensis</i> var. <i>Coahuilensis</i> (Boedeker) Moran	8
2.3.1. Sinonimia	8
2.3.2. Características morfológicas	8
2.4. <i>Echinocactus platyacanthus</i> Link & Otto	9
2.4.1. Sinonimia	9
2.4.2. Características morfológicas	10
2.5. Norma Oficial de la Federación (NOM-059-ECOL-2001), la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES) y Categorías de Riesgo	11
2.6. Formas de conservación de las cactáceas	12
2.7. Reproducción de las cactáceas	13
2.7.1. Reproducción sexual	13
2.7.2 Germinación	14
2.7.3 Germinación en las cactáceas silvestre	15
2.7.4 Reproducción asexual o vegetativa	16
2.8. Cultivo de tejidos en cactáceas	16
2.9. Medio de cultivo	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Ubicación del experimento	20
3.2. <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	20
3.2.1. Material vegetal	20
3.2.2. Germinación	20
3.2.3. Formación de brotes	21
3.2.4. Enraizamiento	22
3.2.5. Aclimatación	22
3.3. <i>E. platyacanthus</i>	23
3.3.1. Material vegetal	23
3.3.2. Germinación y viabilidad	23
3.3.3. Formación de brotes	24
3.3.4. Enraizamiento	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	26
4.1. Germinación de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	26
4.2. Inducción de brotes, enraizamiento y aclimatación	28
4.2.1. Establecimiento del inoculo	28
4.2.2. Tipo y color de callo	29

4.2.3. Inducción de brote	29
4.2.4. Tipo y color de callo	30
4.2.5. Número de brotes	30
4.2.6. Formación de raíz	33
4.2.7. Aclimatación	34
4.3. Germinación y viabilidad de <i>E. platyacanthus</i>	34
4.4. Inducción de brotes y formación de raíz	37
4.4.1. Tipo y color de callo	37
4.4.2. Número de brotes	38
4.4.3. Formación de raíz	40
4.4.4. Tipo y color de callo	40
V. CONCLUSIONES	42
VI. LITERATURA CITADA	43

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Páginas
<b>Cuadro 2-1.</b> Categorías designadas por CITES, UICN y NOM-059-ECOL-2001	12
<b>Cuadro 2-2.</b> Los compuestos del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con vitaminas	19
<b>Cuadro 3-1.</b> Concentraciones para la primera fase de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas)	22
<b>Cuadro 3-2.</b> Concentraciones para la segunda fase de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas)	22
<b>Cuadro 3-3.</b> Concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas)	25
<b>Cuadro 3-4.</b> Concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas)	25
<b>Cuadro 4-1.</b> Número promedio de brotes obtenidos en inoculos de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> para la primera prueba con la auxina ANA y las citocininas 2iP y TDZ	29
<b>Cuadro 4-2.</b> Comparación de medias para el número de brotes en <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	33
<b>Cuadro 4-3.</b> Comparación de medias para el número de brotes en <i>E. platyacanthus</i>	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Páginas
<b>Figura 2-1.</b> Mapa de la distribución de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	9
<b>Figura 2-2.</b> Mapa de la distribución de <i>E. platyacanthus</i>	10
<b>Figura 2-3.</b> Sección de una semilla casi madura de <i>Toumeyia papyracantha</i> en donde se muestran las siguientes partes: 1, micrópilo; 2, hilo; 3, radícula; 4, perisperma; 5, endosperma; 6, cotiledón; 7, embrión y 8, testa	14
<b>Figura 3-1.</b> <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> (a) semilla y (b) planta	20
<b>Figura 3-2.</b> Fotografías ( <i>Echinocactus platyacanthus</i> Link & Otto), planta (a), fruto (b) y semilla (c)	23
<b>Figura 4-1.</b> Plántula germinada de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> a los 50 d	26
<b>Figura 4-2.</b> Número de semillas germinadas de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> en medio MS al 25 % de macronutrientes	27
<b>Figura 4-3.</b> Porcentaje de germinación de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> en medio MS al 25 % de macronutrientes	27
<b>Figura 4-4.</b> Número de semillas germinadas de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> en medio MS al 25 % de macronutrientes	28
<b>Figura 4-5.</b> Porcentaje de germinación de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i> en medio MS al 25 % de macronutrientes	28
<b>Figura 4-6.</b> Formación de callos compactos con 2iP (a) y friables con TDZ (b) de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	30
<b>Figura 4-7.</b> Formación de callos verdes (a) y con la pigmentación rojiza (b) en el medio con TDZ de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	30
<b>Figura 4-8.</b> Número de brotes obtenidos por tratamientos con citocininas de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	31
<b>Figura 4-9.</b> Formación de brotes (a, b y c) normales (d) vitrificado de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	32
<b>Figura 4-10.</b> Foto de un brote con raíz (a) y raíces lignificadas	

en el medio MS al 100 % (b) de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	34
<b>Figura 4-11.</b> Foto de una plántula aclimatada (a) y plántulas trasplantadas al sustrato (b) de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	34
<b>Figura 4-12.</b> Embriones de <i>E. platyacanthus</i> sin tetrazolio (a) y con tetrazolio después de seis días (b)	35
<b>Figura 4-13.</b> Semillas germinadas (a) y plántulas (b) de <i>E. platyacanthus</i>	35
<b>Figura 4-14.</b> Número de semillas germinadas de <i>E. platyacanthus</i> en un medio MS al 100 %	36
<b>Figura 4-15.</b> Porcentajes de germinación <i>E. platyacanthus</i> en un medio MS al 100 %	36
<b>Figura. 4-16.</b> Formación de callos compactos con 2iP (a) y friables con TDZ (b) de <i>E. platyacanthus</i>	37
<b>Figura 4-17.</b> Formación de callos con tonalidad verde: callo con brote veloso con 2iP (a) y callo con vellosidad con TDZ (b) de <i>E. platyacanthus</i>	37
<b>Figura 4-18.</b> Número de brotes obtenidos por tratamiento de citocinina de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	38
<b>Figura 4-19.</b> Formación de brotes normales (a, b y c) con 2iP y (d) con TDZ de <i>M. coahuilensis</i> var. <i>coahuilensis</i>	39
<b>Figura 4-20.</b> Foto de un brote con raíz (a) y raíces lignificadas en medio MS al 100 % (b) de <i>E. platyacanthus</i>	40
<b>Figura 4-21.</b> Callo con 2iP (a) e incremento de tamaño del callo con TDZ (b) de <i>E. platyacanthus</i>	41

## RESUMEN

Se conoce relativamente poco de la propagación de las cactáceas *in vitro*. Generalmente se utiliza la semilla, tejido vascular y la activación de las areolas. Sin embargo, son pocas las especies que se multiplican y se preservan por estos medios de propagación. *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran es endémica de Coahuila, Méx. y ha sido sobre recolectada por su valor como planta de ornato y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto se distribuye del centro al norte del país, a pesar de su amplia presencia, es una especie sobre explotada, principalmente para la elaboración de dulce (acitrón) y como alimento para el ganado. Por esta actividad humana ha sido difícil conseguir planta y al igual que la semilla y por lo tanto se reduce la probabilidad de propagar e incrementar su población. Por lo anterior, *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* se encuentra considerada como planta amenazada y *E. platyacanthus* está sujeta a protección especial, de acuerdo a la norma NOM-059-2001 para México y se encuentran reportadas en la lista internacional de CITES, en el apéndice II, por lo que se requiere de otros métodos que asegure la preservación.

El objetivo general del presente trabajo fue establecer la propagación *in vitro* de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* y *E. platyacanthus* a través del uso, como inóculo, de semillas. Se utilizaron las semillas por ser fácil su manejo y producir individuos libres de patógenos. Como hipótesis fundamental se planteó que la aplicación de auxinas y citocininas en las plántulas obtenidas a partir de semilla de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* y *E. platyacanthus* inducirían la formación de brotes.

Para esta investigación se utilizó el medio de cultivo de Murashige and Skoog (MS) (1962) suplementado con glicina ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina HCl ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina HCl ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). A esta composición en lo sucesivo le llamaremos medio MS. El pH fue de 5.7-5.8, ajustando con 0.1 de hidróxido de sodio o 0.1 de ácido clorhídrico. Los frascos con 25 ml de medio con tapas de plástico fueron esterilizados en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min. Lo anterior se aplicó en las pruebas para las dos especies.

Para *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* que presenta semillas pequeñas con germinación epigea y además son ortodoxas, se utilizaron semillas con 42 meses de edad, las cuales se dividieron en dos lotes. En el primer lote se utilizaron para la primera siembra 150 semillas las cuales se esterilizaron con el procedimiento siguiente: agua jabonosa por 5 min; enjuagándose con agua corriente; en seguida se sumergieron en etanol al 70 % por 1 min y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1.2 % por 10 min. Finalmente se enjuagaron tres veces en agua desionizada

esterilizada. Con el segundo lote se realizó la segunda siembra con 290 semillas que se esterilizaron con el procedimiento siguiente: agua jabonosa por 15 min y luego etanol al 70 % por 1 min. Posteriormente se introdujeron en hipoclorito de sodio al 1.2 % por 15 min y se lavaron tres veces en agua destilada esterilizada. Se sembraron 10 semillas por frasco, las cuales se colocaron en medio MS con el 25 % de macronutrientes y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa.

La inducción de brotes se realizó en dos fases. En la primera fase se emplearon 100 plántulas obtenidas de semillas germinadas in vitro colocándose en medio MS con el 100 % de macronutrientes y 30 g L<sup>-1</sup> sacarosa. Los tratamientos fueron los reguladores de crecimiento 6-(y, y-dimetilalilamino) purina (2iP), tidiazurón (TDZ) y ácido naftalenacético (ANA) combinadas de la forma siguiente: solas 2iP, TDZ, y ANA:2iP y ANA:TDZ, variando las concentraciones entre ellas. En la segunda fase se utilizaron los callos obtenidos de la fase anterior sembrados en el mismo medio utilizando otras concentraciones de los reguladores de crecimiento.

Las variables evaluadas fueron: germinación (%), el índice de velocidad de germinación (semillas/día) (IVG), tipo y color de callo, número de brotes, brotes que formaron raíces (%) y aclimatación (%).

Con respecto a *E. platyacanthus*, cuyas semillas que son consideradas medianas y tienen una germinación epigea y ortodoxa, se realizó una prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio al 0.1 % en 10 semillas de un lote de 50 semillas de las 200 que se tenían. La edad de estas semillas era de 10 meses. Se evaluó la viabilidad y posteriormente se determinó su porcentaje de germinación al igual que la velocidad. La esterilización de la semilla consistió en lavar la semilla en una solución jabonosa en agua corriente por 20 min y se enjuagó; posteriormente se sumergió en alcohol al 70 % por 1 min, se pasaron a hipoclorito de sodio al 1.2 % por 15 min y finalmente se realizaron tres enjuagues de agua destilada estéril. Se sembraron 10 semillas por frasco, utilizando el medio MS con el 100 % de macronutrientes y 30 g L<sup>-1</sup> sacarosa.

Se utilizaron 56 plántulas obtenidas de la semilla germinada de *E. platyacanthus* las cuales se utilizaron para la inducción de brotes. Se sembraron en medio MS al 100 % y 30 g L<sup>-1</sup> sacarosa. Los tratamientos fueron los reguladores de crecimiento 6-(y, y-dimetilalilamino) purina (2iP), tidiazurón (TDZ) y ácido naftalenacético (ANA) combinadas de la forma siguiente: solas 2iP, TDZ, y ANA:2iP, ANA:TDZ. Se realizaron dos fases. En la primera fase se utilizó el medio de cultivo anterior variando la concentración de las citocininas, y en la segunda fase, además de variar la concentración de los reguladores se suplementó con glutamina (250 mg L<sup>-1</sup>) y arginina (40 mg L<sup>-1</sup>).

Las variables evaluadas fueron: germinación (%), el índice de velocidad de germinación (semillas/día) (IVG), viabilidad, tipo y color de callo, número de brotes y brotes que formaron raíces (%).

En el establecimiento de la presente investigación se espera que con los tratamientos antes mencionados se alcance la propagación *in vitro* de las especies *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* (en Coahuila) y *E. platyacanthus* (desde Puebla hasta Coahuila) y de esta manera contribuir a su rescate donde se desarrollan en forma natural.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diez (*M. coahuilensis* var. *coahuilensis*) y cinco (*E. platyacanthus*) repeticiones, el análisis de datos se realizó usando el análisis de varianza (ANOVA) con SAS y la prueba de medias fue con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Los resultados obtenidos arrojaron que para *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* el porcentaje de germinación fue de 25.5 % para la primera siembra y en la segunda de 26.4 %. La germinación promedio fue de 26.0 %. El IVG para la primera siembra de 1.6 semillas/día y en la segunda siembra de 3.6 semillas/día. El tipo de callo más común fue el compacto. El color de callo más común fue el verde y el rojizo que se presentó solamente en los medios con TDZ al 2.5 mg L<sup>-1</sup>. Esta coloración es posible se deba a la presencia de betalainas. La vitrificación fue observada en los brotes cultivados con TDZ. El mayor número de brotes se presentó en el medio con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2iP (0.9 brotes/explante en promedio); aparentemente el empleo de 2iP favorece la formación de brotes lo que concuerda con la respuesta obtenida con otras mamilarias. El enraizamiento fue del 56.5 % en un medio MS al 100 % de las sales inorgánicas. La generación espontánea de raíces es un proceso normal en las cactáceas. Se obtuvo el 92.3 % de plantas aclimatadas.

En *E. platyacanthus* se obtuvo una viabilidad baja de semillas, además de presentar una coloración rosa pálida los embriones, mientras que el porcentaje de germinación fue de 32.9 % con una velocidad de 1.0 semillas/día. Con respecto a la viabilidad las semillas no tomaron la coloración rosa intenso que se esperaba como sucede con las pruebas con semillas ortodoxas comunes además de que la misma prueba requirió de varios días. El tipo de callo más común fue el compacto. El color de callo el verde. El mayor número de brotes se presentó en el medio con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de 2iP (1.6 brotes/explante en promedio); aparentemente el empleo de 2iP favorece la formación de brotes lo que concuerda con la respuesta obtenida con otras especies. El enraizamiento fue del 100 % en un medio MS al 100 % de las sales inorgánicas.

## ABSTRACT

It is known the propagation of cactus the test-tube ones relatively little. It is generally used the seed, vascular tissue and the activation of the areolas. Nevertheless, the species are few that multiply and they are preserved by these means of propagation. *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Dwell is endemic of Coahuila, Méx. and on it has been collected by his ornamental value and *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto is distributed of the center to the north of the country, in spite of its ample presence, is an operated species on, mainly for the elaboration of candy (acitrón) and like food for the cattle. By this human activity it has been difficult to secure plant and like the seed and therefore is reduced the probability of propagating and of increasing its population. By the previous thing, *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* is considered as it plants threatened and *E. platyacanthus* is subject to special protection, according to norm NOM-059-2001 for Mexico and they are reported in the international list of CITES, in appendix II, reason why it is required of other methods that the preservation assures.

The general objective of the present work was to establish the test-tube propagation of *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* and *E. platyacanthus* through use, as inoculate, of seeds. The seeds were used for being easy their handling and to produce free individuals of pathogens. As fundamental hypothesis considered that the application of auxins and cytokinins in plantlets obtained from seed of *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* and *E. platyacanthus* would induce the formation of shoots.

For this investigation the medium of culture of Murashige and Skoog was used (MS) (1962) supplemented with amino acids and vitamins.

The seeds of *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* are small with epigeous germination and in addition are orthodox. Seeds with 42 months of age were used that were divided in two lots. In the first lot 150 seeds were used which became sterile with the following procedure: soapy water by 5 min; rinsing itself with running water; immediately they submerged in ethanol to 70 % by 1 min and later in sodium hypochlorite to 1.2 % by 10 min. Finally three times sterilized desionized water were rinsed. With the second lot the second sowing was realized 290 seeds that became sterile with the following procedure: soapy water by 15 min and soon ethanol to 70 % by 1 min. Later they were introduced in sodium hypochlorite to 1.2 % by 15 min and three times distilled water sterilized were washed. 10 seeds by bottle were seeded, which were in the middle placed MS with 25 % of macro nutriments and sucrose 30 g L<sup>-1</sup>.

The induction of buds was realized in two phases. In first stage 100 seedling were used of germinated seeds test-tube being placed MS medium with 100 % of macronutriments and sucrose 30 g L<sup>-1</sup>. The treatments were the regulators of growth 6 (γ, γ-dimethylallylamino) purine (2iP), thidiazuron (TDZ) and naphthalenacetic acid (ANA) combined of the following form: 2iP, TDZ, and ANA alone: and 2iP:ANA and ANA:TDZ, varying the concentrations among them. In the second phase, the obtained calluses of the previous phase were inoculated in the same culture medium, but using other concentrations of the growth regulators. The evaluated variables were: germination (%), the index of ratio of germination (seeds/day) (IVG), type and color of callus, number of buds, buds that formed roots (%) and acclimatization (%).

With respect to *E. platyacanthus*, whose seeds that are considered medians and have a epigeous and orthodox germination, a test of viability with chloride of tetrazolium to 0.1 % was realised in 10 seeds of a lot of 50 seeds of the 200 that were had. The age of these seeds was of 10 months. The viability was evaluated and later the rate was determined its percentage of germination. The sterilization of the seed consisted of washing the seed in a soapy running water solution by 20 min and it was rinsed; later min submerged in ethanol to 70 % by 1 min, they went to hypochlorite of sodium to 1.2 % through 15 min and finally three sterilized distilled water rinsing were realized. 10 seeds by bottle were inoculated using MS medium with 100 % of macronutriments and sucrose 30 g L<sup>-1</sup>.

56 seeds of *E. platyacanthus* were used and the seedlings obtained of the germinated which were used for the induction of buds. They were inoculated in the MS medium to 100 % and sucrose 30 g L<sup>-1</sup>. The treatments were the regulators of growth 6 (γ, γ-dimethylallylamino) purine (2iP), thidiazuron (TDZ) and naphthalenacetic acid (ANA) combined of the following form: 2iP, TDZ alone, and ANA: 2iP, ANA: TDZ. Two phases were realized. In the first stage was used the MS medium, but with concentrations different from the cytokinins, and in the second phase, besides varying the concentration of the regulators it supplemented with glutamine (250 mg L<sup>-1</sup>) and arginine (40 mg L<sup>-1</sup>).

The evaluated variables were: germination (%), the index of ratio of germination (seeds/day) (IVG), type and color of callus, number of buds, buds that formed roots (%) and acclimatization (%).

A completely random experimental design was used with ten (*M. coahuilensis* var. *coahuilensis*) and five (*E. platyacanthus*) repetitions, the data analysis was realized using the analysis of variance (ANOVA) with SAS and the mean test was with the test of Tukey (alpha=0.05).

The obtained results threw that for *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* the percentage of germination was of 25.5 % for the first sowing and in second of 26.4 %. The germination average was of 26.0 %. The IVG for the first sowing of 1.6 seeds/day and in the second sowing of 3.6 seeds/day. The type of more common callus was the compact one. The color of more common callus was green and the reddish one that only appeared in means with 2.5 mg L<sup>-1</sup> of TDZ. This coloration is possible must to the presence of betalains. The vitrification was observed in the buds worked with TDZ. The greater number of buds appeared in medium with 2.0 mg L<sup>-1</sup> of 2iP (0.9 buds/explant in average); apparently the use of 2iP favors the formation of buds which agrees with the answer obtained with other mamillarias. The rooting was of 56.5 % in an average MS to 100 % of the inorganic salts. The spontaneous generation by roots is a normal process in the cactus ones. 92.3 % of acclimated plants were obtained.

In *E. platyacanthus* obtained a low viability of seeds, besides presenting a pale pink coloration the embryos, whereas the percentage of germination was of 32.9 % with a rate of 1.0 seeds/day. With respect to the viability the seeds did not take intense the pink coloration that was expected as it happens to the tests with common orthodox seeds apart from which the same test required of several days. The type of more common callus was the compact one and of green color. The greater number of buds appeared in medium with 0.2 mg L<sup>-1</sup> of ANA and 3.0 mg L<sup>-1</sup> of 2iP (1.6 buds/explant in average); apparently the use of 2iP favors the formation of buds which agrees with the answer obtained with other species. The rooting was of 100 % in an average MS to 100 % of the inorganic salts.

## I. INTRODUCCIÓN

En México existe una gran diversidad vegetal, por las características en clima, topografía y latitudes, dentro de esta riqueza se encuentran las cactáceas. Las cactáceas son autóctonas del Continente Americano en donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas (Bravo, 1978; Arias, 1993; Hernández y Godínez, 1994; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Alanís y Velazco, 2008).

La familia Cactaceae tiene la mayor cantidad de especies (Kunte y Šubík, 2004; Alanís y Velazco, 2008) abarcan 300 géneros y un total de 2500 especies, se siguen descubriendo especies e inclusive géneros como *Geohintonia*, *Cintia* y *Yavia*. Muchas de estas especies son consideradas endémicas, lo cual es muy importante por que su área de distribución es restringida y muchas veces con la mínima alteración de su hábitat llegan a desaparecer. Aunado a que son especies con características biológicas propias que las hace más sensibles, como es el lento crecimiento de las especies, ya que las especies presentan un enorme riesgo, sobre todo en aquellos lugares con frecuentes eventos de disturbio (Hernández y Godínez, 1994; Alanís y Velazco, 2008).

La actividad y el aumento de la población ha causado que el desarrollo urbano (vías de comunicación mal planificadas, los cambios irracionales del uso del suelo etc.) agrícola y ganadero este creciendo de forma desmedida, provocando la destrucción del hábitat natural de esta familia (Elizondo *et al.*, 1990; Arias *et al.*, 2005; Alanís y Velazco, 2008).

Las cactáceas son utilizadas como alimento, para la producción de licor, extracción de agua (biznaga), postes, juguetes, medicinal, sellador (saguaro), cauterizador (pitayo dulce y agrio), ceremonial, pintura y ornamental, por su belleza (Nobel, 1998). A nivel mundial, están muy difundidas, habiéndose introducido ilegalmente, accidentalmente o como plantas de ornato para su comercialización (Domínguez y Domínguez, 1976; Arias, 1993; Hernández-Oria, *et al.* 2007), lo que provoca que sean extraídas de su hábitat natural, excediendo la recolección a la tasa natural de su reproducción, propiciando un fuerte deterioro en la familia, reduciendo el número de especies y en algunos casos hasta su extinción.

*M. coahuilensis* var. *coahuilensis* es endémica de Coahuila, Méx. ha sido sobre colectada por su valor como planta de ornato, es considerada, como amenazada y *E. platyacanthus* se distribuye del centro al norte del país, a pesar de su amplia presencia, es una especie sobreexplotada, principalmente para la elaboración de dulce (acitrón) y como alimento para el ganado, está sujeta a protección especial por

la NOM-059-ECOL-2001 (Semarnat, 2002; Alanís y Velazco, 2008), al igual se encuentran reportadas en la lista internacional, ambas especies en el apéndice II, siendo la lista de especies amenazadas por el comercio de CITES, por lo que se requiere de otros métodos, por ejemplo la propagación *in vitro* que asegure la preservación de las especies (Arias *et al.*, 2005; CITES, 2009), como resultado de la actividad humana.

Dada la dificultad de conseguir material vegetativo, la germinación es una opción viable para lograr mantener y preservar la especie. Sin embargo, la germinación es una de las etapas más vulnerables en el ciclo de las plantas. Es importante conocer la capacidad de las semillas para germinar y desarrollar una planta normal, se sabe que cada especie tiene características específicas físicas y biológicas, ocasionando comportamientos diferentes entre ellas, por esta razón es necesario realizar pruebas que determinen el potencial que tienen las semillas en la germinación.

Los frutos de las cactáceas producen numerosas semillas, muy pocas son las que llegan a germinar o a desarrollarse a manera de producir nuevas plantas por lo adverso del medio y también por ser víctimas por parte de las hormigas, aves, mamíferos y reptiles al servirles de alimento; por las condiciones desfavorables para la germinación a que quedan expuestas frecuentemente al ser diseminadas, y por la falta de un microclima que proteja el desarrollo de las plántulas en tanto estas llegan a formar sus tejidos protectores y de almacenamiento (Bravo, 1978).

Es importante conocer la capacidad de las semillas para germinar y desarrollar una planta normal, para determinar las probabilidades de sobrevivencia se requiere de pruebas como la de viabilidad mediante la tinción del embrión para definir el porcentaje de germinación (Moreno, 1984).

*M. coahuilensis* var. *coahuilensis* presenta varios problemas, por ejemplo la viabilidad de la semillas disminuye con el tiempo, después de 3 a 4 años baja hasta un 70 %. Mientras para *E. platyacanthus* de entre 6 a 7 meses puede bajar su viabilidad un 55 %.

Se conoce relativamente poco de la propagación de las cactáceas *in vitro*. Generalmente se utiliza la semilla, tejido vascular y la activación de las areolas. Sin embargo son pocas las especies que se multiplican y se preservan por estos medios de propagación. Generalmente se propagan por métodos convencionales no permitiendo la variabilidad genética al utilizar partes de las plantas madre y por otro lado, debido a la actividad humana a la que están siendo sometidas, es la causa por la cual es difícil conseguir la planta, al igual que la semilla y por lo tanto se reduce la probabilidad de propagar e incrementar su población.

Hasta donde sabemos no hay trabajos reportados en *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* que nos permita tomar referencia y en *E. platyacanthus* es poca la información reportada, por lo que es importante realizar más estudios en estas especies, para poder generar información. Otro problema es el desconocimiento de métodos de propagación adecuados.

### **1.1. Objetivos**

Determinar en *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*, el porcentaje de germinación y velocidad de crecimiento.

Se puede comparar los resultados de la viabilidad con los obtenidos de la germinación en *E. platyacanthus*.

Establecer la propagación *in vitro* de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* y *E. platyacanthus* a través del uso, como inóculo, de semillas.

### **1.2. Hipótesis**

El medio de cultivo estimulara el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* y *E. platyacanthus*.

La prueba de germinación es una manera de conocer la viabilidad de las semillas de *E. platyacanthus*.

Se espera que la aplicación de auxinas y citocininas en los explantes de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* y *E. platyacanthus* inducirán la mayor formación de brotes.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades de la familia Cactaceae

Las cactáceas pertenecen al grupo de plantas llamadas xerófitas suculentas. Las características desde el punto de vista anatómico y morfológico, las han adquirido por herencia de los caracteres de antiguas líneas evolutivas y también por tendencias evolutivas más recientes, por lo que sus adaptaciones las hace altamente especializadas. El tallo de las cactáceas puede almacenar y conservar el agua en sus tejidos. Reduciendo la superficie transpiratoria, al modificar las formas de sus tallos, y el engrosamiento de la cutícula. Surgiendo como una respuesta evolutiva a las condiciones climáticas donde hay escases de agua. La raíz facilita la absorción rápida del agua por la gran longitud que adquieren algunas raíces, o en la conservación de dicho líquido por las enormes raíces tuberosas de ciertas especies. También pueden formar raíces adventicias. Los tubérculos es la base de las hojas hipertrofiadas. Las areolas son las yemas, que dan origen a hojas reducidas, nuevos tallos, flores, espinas, glóquidas, cerdas y pelos, y a veces raíces adventicias. Las espinas, escamas o glóquidas son órganos modificados (hojas modificadas). Es consecuencia de la atrofia del limbo de las hojas. Estas pueden ser gruesas o defensivas, suaves y glandulares. Sirven como defensa frente a los herbívoros, también para protegerse de la luz solar, las bajas temperaturas, algunas absorben el agua del rocío que se depositan en ellas y en algunos casos contribuyen a la propagación de la especie, al adherirse al pelaje y ser transportados a otros lugares. Las flores brotan, de las areolas o de las axilas. Son sésiles, y carecen de pedúnculo floral. Forman un perianto indiferenciado (Bravo, 1978; Kunte y Šubík, 2004).

Todas las flores de los cactus se dividen en tres grandes grupo, según su forma: en forma de embudos, tubulares y campaniformes, casi todos los cactus producen flores dioicas (tienen ambos órganos reproductores), los órganos femeninos se ubican en el centro de la flor mientras el masculino se distribuyen en un círculo concéntrico alrededor de los primeros. Las flores suelen abrirse durante el día, excepto *Discocactus*, *Echinopsis*, *Neobinghamia*, etc. Las flores duran muy poco tiempo abiertas para economizar el agua, las polinizadas duran menos tiempo abiertas que las que no lo están. La mayoría de los cactus son alógamos, por lo que necesitan de dos individuos de la misma especie para la fecundación. En el entorno natural, el polen suele ser transportado por insectos, colibríes y murciélagos. Mientras las plantas cultivadas, son los cultivadores, también existen plantas autofecundadas como en *Rebutia* y *Notocactus*. Los frutos de los cactus son bayas y

pueden ser carnosos, semicarnosos y secos, en muchos casos son comestibles. Las semillas presentan variación en la forma, tamaño, estructura y color de la testa; en las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas (Bravo, 1978; Kunte y Šubík, 2004).

### 2.1.1. Usos

Las cactáceas, por su aspecto peculiar, han sido motivo de cuidado desde tiempos remotos. Antecedentes históricos e información folklórica registran la importancia que adquirieron entre la tribus prehispánicas, por lo que tienen un alto valor étnico y más recientemente científico (Alanís y Velazco, 2008).

Dentro de la importancia que tiene esta familia, está en la gran cantidad de productos y usos que el hombre ha obtenido de ellas pudiendo mencionar: el alimenticio, medicinal, gomas, jabones, entre otros (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

Grupos indígenas como los seris tienen una riqueza de conocimientos sobre las cactáceas, que datan desde épocas prehispánicas. Ellos aprovechan los frutos de las biznagas (*Ferocactus acanthodes*, *F. covillei* y *F. wislizenii*), cholla plateada (*Opuntia fulgida*), cholla brincadora (*Opuntia bigelovvi*), mamilarias (*Mammillaria estebanensis* y *M. microcarpa*), sinita (*Lophocereus schottii*), saguaro (*Carnegiea gigantea*), cardón (*Pachycereus pringlei*), pitayo dulce (*Stenocereus thurberi*), pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) los cuales cosechan alrededor de 20 especies diferentes de cactáceas, la mayoría de los frutos eran consumidos crudos. Parte de los frutos y semillas (sirven para hacer harina) recolectados se secan y almacenan para ser utilizados después, algunas veces las hervían, salaban para mezclarlos con harina de maíz. Se consumen los tallos y exudados gomosos, crudos o cocinados. En primavera, cuando brotan los botones florales de ciertas especies de cactáceas (*Opuntia* y *Echinocarpa*), las cocinaban y horneaban como un manjar (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

Las cactáceas en México han sido utilizadas desde tiempos prehispánicos en la elaboración de bebidas fermentadas, en la actualidad el consumo de las mismas puede considerarse importante tradición. Los seris de los tallos extraían soluciones acuosas como bebidas dulces usando la biznaga y al ser fermentadas en bebidas alcohólicas siendo las principales especies: cardón, pitayo dulce, pitaya agria y saguaro (Herrera y Calderón-Villagómez, 1994; Nobel, 1998).

La biznagas como *Equinocathus platyacanthus* y *Ferocactus histrix* les provén de agua a los pobladores indígenas, así como materia prima para la elaboración de dulces (Nobel, 1998; Fuentes y Jiménez, 2007; Alanís y Velazco, 2008).

Los frutos cosechados de especies como de *Opuntia* son a menudo la única fuente de ingresos de la población indígena en las regiones secas de México (Kunte y Šubík, 2004). Los frutos son consumidos en muchas partes del mundo siendo algunos Estados Unidos, países europeos, África del norte, sureste asiático y Australia. Mientras los tallos de los cactus, principalmente del género *Opuntia* se consumen más al sureste de los Estados Unidos (Nobel, 1998).

Numerosas especies de la familia tienen un uso medicinal (Alanís y Velazco, 2008). Los seris usan cactáceas como biznaga, cardón, cholla plateada, saguaro, mamilarias, pitayo dulce y cholla saltadora para curar malestares y dolores. El reumatismo lo tratan con el saguaro, el jugo del cocimiento del tallo de mamilarias lo usaban para los dolores de oído y con la choya brincadora es un diurético (Nobel, 1998). Mientras en Hidalgo *Myrtillocactus geometrizans* lo utilizan para lesiones o rupturas de hueso (Fuentes y Jiménez, 2007).

Los frutos de las cactáceas tienen aproximadamente un tercio de azúcar es fructosa, para aquellos con diabetes común es más tolerante que la glucosa y la sacarosa. Varias cactáceas tienen una amplia gama de aplicaciones médicas. Los jugos extraídos de los tallos jóvenes macerados de *Opuntia* y *Lophocereus* se usan como agentes antidiabéticos en muchas partes del mundo. Los jugos de los tallos jóvenes de *Opuntia stricta* y *Platyopuntias* diluidas en agua la usan como diurético en Australia, África del Sur y muchos países latinoamericanos. Los extractos de los tallos, de forma local, se usan para curar úlceras y enfermedades renales (Nobel, 1998).

Las cactáceas son utilizadas como forraje ya sea en pie o para corte. El que se usa como de corte es material tosco que se da al ganado vacuno, porcino, equino, ovino, caprino, venados y también para las aves (codorniz y guajolote). Se pica o se queman para retirar las espinas son una fuente de alimento y de agua, principalmente en épocas de sequía. Las cactáceas se usan para prácticas de conservación del suelo (Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

De las cactáceas los seris elaboran contenedores, postes, selladores (lo obtenían de las flores del saguaro) y pintura facial (Nobel, 1998).

Las cactáceas columnares se usan como cercas vivas. El tejido leñoso, que queda después de que se ha desintegrado el tejido suave de los cactáceas columnares, se usan como bastones, y de la cholla plateada, hacen instrumentos

músicas y artesanías incluyendo muebles y lámparas (Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

Los seris efectúan juegos con saguaro, pitayo dulce y sinita, las cascaras de los frutos eran usadas como dardos y los segmentos de tallo sin espinas los utilizaban en un deporte parecido al dodgeball. En la caza y la pesca utilizaban pedazos de cactus como cardón y pitayo dulce. En ceremonias (con secciones de tallo del pitayo dulce son utilizados en la ceremonia de la pubertad de las jóvenes) y rituales religiosos (varios cactus como el cardón, pitayo dulce, cholla brincadora y biznaga, utilizan los tallos para las tumbas e incinerar la tumba de una niña, para iniciar o detener la lluvia, el viento, para la longevidad y en invocaciones religiosas) (Nobel, 1998). Varias cactáceas como peyote (*Lophophora williamsii*) y San pedro (*Trichocereus pachanoi*) son usadas para rituales religiosos por los huicholes, coras y tarahumaras (Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

Otro producto es la obtención de pigmentos obtenida de insectos hembras del género *Dactylopius* que se alimentan de ciertos nopales (*Opuntia ficus-indica* y *O. tomentosa*). De varias flores de *Opuntia* se elaboran perfumes, y de los frutos de *Opuntia phaeacantha* se puede extraer colorantes. Se puede producir biogas (principalmente metano) y gasol (Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

La familia Cactaceae es una especie que se puede encontrar en todo el mundo. El atractivo de esta familia por la forma, tamaño, color de los tallos, espinas y las flores. Al no necesitar muchos cuidados, por las características de la misma familia a la tolerancia. La hace ideal como planta de ornato. Los géneros con mayor demanda en el mercado son: *Mammillaria*, *Ariocarpus*, *Echinocereus*, *Epiphyllum*, *Gymnocalycium*, *Lobivia*, *Notocactus*, *Rebutia* y *Sulcorebutia* (Nobel, 1998; Alanís y Velazco, 2008).

## 2.2. Clasificación taxonómica de los géneros

REINO		Plantae
DIVISION		Magnoliophyta
CLASE		Magnoliopsida o Dicotiledónea
SUBCLASE		Caryophyllidae
ORDEN		Caryophyllales
FAMILIA		Cactaceae
SUB FAMILIA		Cactoideae
TRIBU		Cacteae
GÉNERO	<i>Mammillaria</i>	<i>Echinocactus</i>
ESPECIES	<i>coahuilensis</i>	<i>platyacanthus</i>

### 2.3. *Mammillaria coahuilensis* var. *Coahuilensis* (Boedeker) Moran

Se encuentra distribuida en la laguna de Mayran, laguna de Viseca, en los municipios de General Cepeda, Parras y Viesca en el Estado de Coahuila, México (Figura 2-1); endémica del Desierto Chihuahuense (Flores, 2005).

#### 2.3.1. Sinonimia

- *Porfiria coahuilensis* Boed.
- *Porfiria coahuilensis* var. *albiflora* Boed.
- *Porfiria schwartzii* Frac.
- *Mammillaria schwartzii* (Fric) Backed. (Nominval)
- *Mammillaria heyderi* ssp. *coahuilensis* (Boed.) J. M. Luthy
- *Neomammillaria schwarzii* Fric

#### 2.3.2. Características morfológicas

Planta simple de tubérculos al nivel del suelo, planta cubierta por el suelo "según la estación", la parte enterrada es de color amarillo paja, mientras que la parte que emerge del suelo es de color verde grisáceo; tubérculos de 8-10 (-12) mm de largo,  $\pm$  4 mm de diámetro por encima de la base, la base es de 7.0-10.0 mm de ancho, estrechos, a 3-4 ángulos, colores azul-verde, en 8-13 espiralados; axilas con  $\pm$  lana. Espinas radiales 12-16, 2.5-6.0 mm de largo, frecuentemente combinada con la

punta rojiza; Espina(s) central(es) de 1-2, combinado con colores naranjas y café, mas menos 6.0-8.0 mm de largo; flores a 3 cm de ancho, tépalos externos rosa pálido con anchura mas menos rayas centrales de color café; tépalos internos combinados con rosa de rayas centrales; 5 lóbulos estigmaticos, color amarillo verde, semilla de 1.0 mm de largo, más larga que la *Mammillaria heyderi*, con paredes celulares anticlinales fuertemente prominentes, color amarillo brillante y café. Los suelos claros, rojos aluviales planos temporalmente inundados, algunas veces con *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Flores, 2005).



**Figura 2-1.** Mapa de la distribución de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

## **2.4. *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto**

En México, se extiende desde Coahuila hasta Puebla (Figura 2-2). En estado salvaje, es una de las plantas más abundantes. Denominada biznaga, biznaga burra o burra, utilizan la parte blanda de su tallo para la elaboración del acitrón (Kunte y Šubík, 2004).

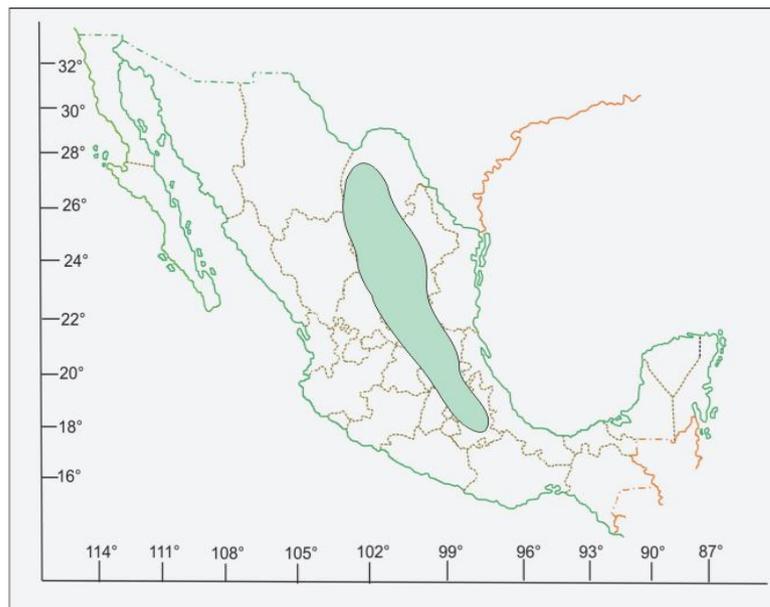
### **2.4.1. Sinonimia**

- *Echinocactus grandis* (Rose)
- *E. helophorus* (Lem.)
- *E. ingens* var. *grandis* (Speg.)
- *E. ingens* var. *saltillensis* (K. Schum)

- *E. ingens* var. *subinermis* (K. Schum)
- *E. ingens* var. *visnaga* (K. Schum)
- *E. ingens* (Zucc. Ex Pfeiff)
- *E. karwinskii* (Zucc. Ex Pfeiff)
- *E. palmeri* (Rose)
- *E. saltillensis* (Poselger)
- *E. visnaga* (Hook)

#### 2.4.2. Características morfológicas

Alcanza aproximadamente los 2.0 m de altura, con un tallo de hasta un metro de diámetro. Estos enormes cactus pueden llegar a pesar más de una tonelada. En cada areola puede hacer de una hasta siete espinas, siempre duras y erectas. De la densa pelusa que cubre la corona de la planta emergen flores amarillas de hasta 8.0 cm de diámetro. Existen distintas variantes de *E. platyacanthus*, aunque muchos especialistas prefieren considerarla como una única variedad. Sus semillas se conservan durante muchos años (Kunte y Šubík, 2004).



**Figura 2-2.** Mapa de la distribución de *E. platyacanthus*.

## **2.5. Norma Oficial de la Federación (NOM-059-ECOL-2001), la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES) y Categorías de Riesgo**

Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. En México han sido sometidas a fuertes presiones antropógenicas por el abuso del uso del suelo y sin una adecuada planificación. Consecuentemente, por el desarrollo humano, la destrucción de los hábitats naturales, provocados principalmente por el crecimiento de las fronteras agrícolas y ganaderas o por la demanda de plantas silvestres con fines ornamentales (*M. coahuilensis* var. *coahuilensis*) para ser usadas en el país o en el extranjero o el uso de ellas para la elaboración de confituras (*E. platyacanthus*), todas estas actividades humanas han ocasionados daños no cuantificados a esta familia. Además de las características biológicas y ecológicas que tiene la familia que la hace más sensible (Hernández y Godínez, 1994; Elizondo *et al.*, 1990; Arias, 1993; Fuentes y Jiménez, 2007; Alanís y Velazco, 2008).

La problemática para la protección de las cactáceas en riesgo ha requerido de la participación de diferentes sectores (organismos gubernamentales e independientes) que impulsan su reproducción controlada, lo cual puede posibilitar su conservación y comercialización. Con la finalidad de regular el uso de especies que pueden tener un valor ornamental, comercial, forestal, medicinal, entre otros (Arias *et al.*, 2005).

A escala mundial, la UICN compila información sobre el estado de conservación de las especies amenazadas y en peligro, que puede ser utilizada por agencias internacionales como CITES o por gobiernos de países específicos. Los criterios utilizados por la UICN se representa por nueve categorías, ver cuadro 2-1 (UICN, 2004; Arias *et al.*, 2005). La UICN maneja nueve categorías, sólo tres se consideran como amenazadas (peligro crítico, peligro y vulnerable).

La CITES tiene como función establecer un marco de referencia legal internacional para la prevención del comercio de las especies amenazadas y su regulación. Las especies son incluidas en tres apéndices de acuerdo con los diferentes niveles de amenaza que resultan de su comercio internacional, ver cuadro 2-1 (CITES, 2009; Arias *et al.*, 2005).

El apéndice I de la CITES ampara las cactáceas en peligro de extinción, y su comercio se autoriza solamente bajo circunstancias excepcionales. En el apéndice II se incluyen todas las especies de la familia Cactaceae, excepto las incluidas en el apéndice I, y su comercio debe ser controlado para evitar la utilización incompatible

con su supervivencia (CITES, 2009; Alanís y Velazco, 2008). El apéndice III permite el comercio internacional bajo determinadas condiciones (CITES, 2009).

En México, en forma oportuna para la protección de la familia Cactaceae y sus componentes, elaboró la normatividad mexicana con relación a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 de protección, ambiental de especies de flora y fauna silvestre de México, en categorías de riesgo (Cuadro 2-1). Siendo su objetivo reconocer las especies o poblaciones silvestres en riesgo en el país mediante un listado. Para la protección, el aprovechamiento y el comercio de las especies. La problemática es la falta de conocimiento de esta norma por parte de la población (Semarnat, 2002; Arias *et al.*, 2005; Alanís y Velazco, 2008).

A pesar de los esfuerzos, muchas especies se encuentran en protección por algunas instancias, la extracción de especies de sus hábitats naturales no ha disminuido, la demanda de estas especies va creciendo, amenazando la familia.

**Cuadro 2-1.** Categorías designadas por CITES, UICN y NOM-059-ECOL-2001.

Categorías de Riesgo		
NOM-059-ECOL-2001	UICN	CITES
Pr-Sujeta a protección de especies	NE-No evaluado	II
	DD-Datos insuficientes	
A-Amenazadas	LC-Preocupación menor	II
	NT-Casi amenazado	
	VU-Vulnerable	
P-Peligro de extinción	EN-En peligro	I
	CR-En peligro crítico	
	EW-Extinto en estado silvestre	
E-Probablemente extinta en el medio silvestre	EX-Extinto	

## 2.6. Formas de conservación de las Cactáceas

Para el éxito en la conservación de la biodiversidad depende de gran medida del conocimiento de las especies, siendo importante organizar un acervo de información básica indispensable, incluyendo aspectos genéticos, reproductivos y fitogeográficos (Hernández y Godínez, 1994).

Es importante desarrollar medios de propagación de las cactáceas mexicanas en el país para poder conservar nuestra biodiversidad y generalmente existen dos tipos de reproducción de las cactáceas:

1. La reproducción sexual: Es el empleo de semilla (Bravo, 1978; Hartman y Kester, 1978; Massa, 2003).
2. La reproducción asexual: es el empleo de cualquier parte de la planta excepto la semilla (Bravo, 1978; Hartman y Kester, 1978; Massa, 2003), los métodos más empleados para esta familia son:
  - a. Estacas: los tallos de algunas cactáceas se cortan en partes y se pueden poner a enraizar como estaca (Hartman y Kester, 1978; Massa, 2003).
  - b. Hijuelos: estos se desarrollan desde la base de la planta, forman con facilidad la raíz (Hartmann y Kester, 1978; Massa, 2003).
  - c. Injertos: en este método se unen dos partes de dos plantas de la misma o diferente especie (Hartmann y Kester, 1978; Massa, 2003).
  - d. Propagación *in vitro*: este método trata de obtener células, tejidos u órganos de la planta para ser colocada en un medio estéril para su propagación (Hartmann y Kester, 1978).

## **2.7. Reproducción de las Cactáceas**

La reproducción de las cactáceas, tiene lugar, como en las demás fanerógamas, por multiplicación vegetativa o por medio de las semillas (Bravo, 1978).

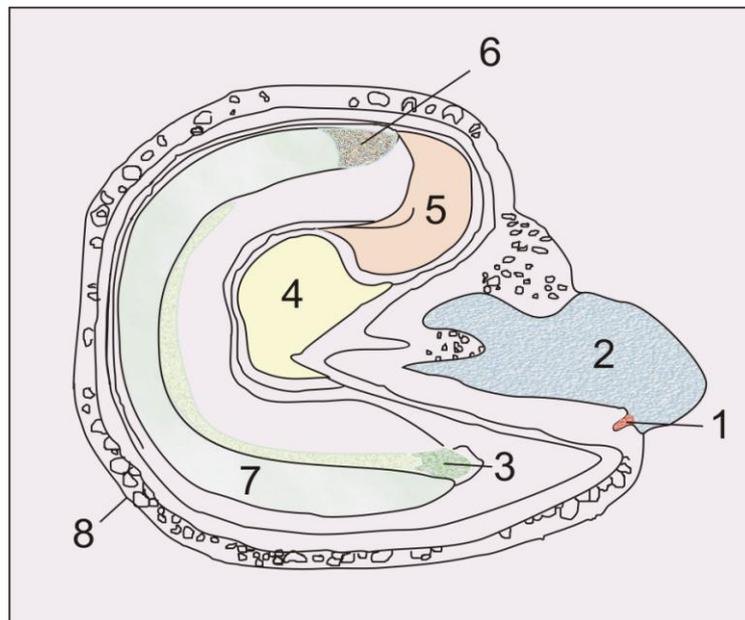
### **2.7.1. Reproducción Sexual**

La semilla es un óvulo maduro que contiene un embrión. (USDA, 1984).

Las semillas presentan variación en la forma, tamaño, estructura y color de la testa; en las características del embrión y de los tejidos almacenadores de sustancias nutritivas. De una semilla madura se tiene que considerar varias partes: el embrión, el perisperma, la testa, el micrópilo, el hilo, así como la carúncula, el estrofiolo y la cobertura funicular que existen en las semillas de algunos géneros (Bravo, 1978).

El embrión es el primordio de la planta y en él están los órganos fundamentales (eje primordial o el tallito, la radícula y los cotiledones). En las cactáceas es grande y ocupa toda la cavidad de la semilla. En las cactáceas primitivas constan de cotiledones grandes y curvos y el hipocótilo delgado (Pereskioideae y Opuntioideae) y ligeramente más reducido en la subfamilia Cereoideae. El endospermo es un tejido

de almacenamiento que es digerido por el embrión durante su desarrollo; persiste como una capa sobre la radícula en algunos géneros de cactáceas. El perisperma es también un tejido de almacenamiento y es digerido durante el desarrollo del embrión. La testa tiene taninos que son los que dan la coloración y dureza. El hilo o cicatriz que deja el funículo en la semilla al desprenderse cuando madura, su forma tamaño y posición varía entre especies; en algunas especies cuando se desprende el funículo deja unos residuos grandes con una estructura esponjosa llamados estrofiolo, ver figura 2-3 (Bravo, 1978).



**Figura 2-3.** Sección de una semilla casi madura de *Toumeyia papyracantha* en donde se muestran las siguientes partes: 1, micropilo; 2, hilo; 3, radícula; 4, perisperma; 5, endosperma; 6, cotiledón; 7, embrión y 8, testa.

### 2.7.2 Germinación

Una semilla consiste en un embrión y su reserva alimenticia almacenada, rodeadas por cubiertas protectoras. Cuando la semilla se separa de la planta en que fue producida, está quiescente, esto es que no muestra signos externos, de la actividad dentro de la semilla. La reanudación del crecimiento activo del embrión, resulta en la ruptura de las cubiertas de la semilla y en la emergencia de una nueva plántula se conoce como germinación (Hartmann y Kester, 1978).

El proceso de germinación comprende una compleja secuencia de cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos, en los cuales pueden reconocerse ciertos estadios (imbibición, actividad enzimática y respiratoria, digestión y translocación,

asimilación y crecimiento). El primer estadio comienza por la imbibición de agua por la semilla seca, el ablandamiento de sus cubiertas y la hidratación del protoplasma. Este es un proceso en gran parte físico y sucede aun en semillas no viables. Como resultado de la absorción de agua se hincha la semilla y su cubierta puede romperse. El segundo estadio principia con la iniciación de la actividad celular e incluye la aparición de enzimas específicas y una elevación de la tasa de respiración. Un tercer estadio es la digestión enzimática de los complejos materiales de reserva insolubles (en su mayor parte los carbohidratos y grasas, a veces proteínas) a formas solubles que son translocadas a las zonas de crecimiento activo. El cuarto estadio es la asimilación de esas sustancias en las regiones meristematicas proporcionando energía para las actividades celulares y de crecimiento, así como de nuevos componentes celulares. En el quinto estadio, la plántula crece por el proceso ordinario de división, crecimiento y división de nuevas células en los puntos de desarrollo (Hartmann y Kester, 1978).

Para que la germinación se realice, se necesita que: la semilla sea viable (que tenga un embrión vivo capaz de crecer), se tenga la temperatura, aereación y humedad adecuada para el proceso y se eliminen los bloqueos fisiológicos presentes en la semilla, que impidan la germinación (Hartmann y Kester, 1978).

El agua lava algunos inhibidores presentes en la testa de la semilla, permitiendo la germinación de las semillas (Rojas, 1993).

### **2.7.3 Germinación en las cactáceas silvestre**

Las semillas de las cactáceas son diseminadas por hormigas al transportarlas a sus nidos, las aves, reptiles y mamíferos cuando las ingieren y están en sus desechos fecales o al adherirse al pelaje de los animales; otra forma de dispersión es a través de la acción de la gravedad, de la lluvia torrencial y los vientos huracanados que desplazan las semillas de los frutos maduros y desecados y las esparcen. Las semillas que son colocadas en lugares donde las condiciones de temperatura, suelo y humedad son adecuadas, germinan después (Bravo, 1978).

La germinación en las cactáceas presentan algunas modalidades: en la subfamilia Pereskioideae es muy semejante a la de otras dicotiledóneas, los cotiledones son grandes y laminares y el hipocótilo delgado; en la subfamilia Opuntioideae los cotiledones son también grandes y laminares, el hipocótilo es más grueso y en la subfamilia Cereoideae dichos órganos son variables (Bravo, 1978).

#### **2.7.4 Reproducción asexual o vegetativa**

La propagación asexual de las cactáceas puede realizarse por medio de los tallos y del pericarpelo de algunos frutos debido a la actividad de las areolas vegetativas, si conservan activos sus tejidos embrionarios.

En el caso de la activación de areolas basales del tallo, se forman clones de ramas más o menos numerosas que pueden a veces estar constituidos por cientos de individuos, ejemplo, en algunos de los miembros de los géneros de *Echinocereus* y *Ferocactus*. Es frecuente que los tallos o fragmentos de tallos desprendidos queden en contacto con el suelo, formen, debido a la activación de las areolas, raíces, y nuevas plantas (Bravo, 1978).

La propagación asexual es la más común en las cactáceas que genera una porción genéticamente idéntica a la planta madre. Mientras que en la sexual es necesario la polinización cruzada para la producción exitosa de semillas, manteniendo la diversidad genética siendo crucial para el cambio evolutivo, el cual es transportado por el viento, principalmente por los animales desde pequeños insectos hasta murciélagos (Nobel, 1998).

#### **2.8. Cultivo de Tejidos en Cactáceas**

Debido a diversos factores la explotación irracional, su consumo como forraje, en algunos casos por su lento desarrollo, las cactáceas se han propagado por diversos métodos y uno de ellos es el empleo de la técnica del cultivo de células, tejidos y órganos vegetales. Mediante el cultivo *in vitro* se han propagado distintas especies de cactáceas que tienen, en su mayoría, un bajo índice de reproducción.

Primordialmente se han propagado usando las areolas y mediante la germinación de semillas. Los tipos de explantes utilizados en el cultivo de las cactáceas son:

##### **a. Semillas**

El fácil manejo de las semillas y la producción de plántulas asépticas. Hace que sea una buena alternativa la utilización de semilla en el cultivo *in vitro* de la familia Cactaceae. Por lo que ha sido utilizada por diversos investigadores: Nava-Esparza y Yáñez (1984) en *Cephalocereus senilis*, Martínez-Vazquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis*, Aparecida *et al.* (1995) en *Cereus peruvianus*, Pérez *et al.* (1998) en 21 especies de cactáceas (de los géneros *Astrophytum* – *Cephalocereus*

– *Coryphanta* – *Echinocactus* – *Echinocereus* – *Ferocactus* – *Mammillaria* – *Echinofossulocactus*), Lechuga *et al.* (1999) en *Echinocactus platyacanthus*, Villavicencio *et al.* (1999) en *Astrophytum myriostigma*, Mata *et al.* (2001) en *Turbinicarpus laui*, Giusti *et al.* (2002) en *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecycphora aselliformis*, Gómez *et al.* (2006) en *Myrtillocactus geometrizans*, Ojeda-Zacarias *et al.* (2008) en *Astrophytum capricorne*.

La germinación de semillas también se utiliza para la inducción de callo y posteriormente la formación de brotes. Esta forma de promover la brotación a partir de callo lo han hecho: Moebius-Goldammer *et al.* (2003) en la organogénesis indirecta de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, después de 6 semanas obtuvieron brotes adventicios con BA, se formaron 6.2-6.3 brotes por explante. Los brotes obtenidos de *Notocactus magnificus* fueron a partir de una organogénesis indirecta (Aira *et al.*, 2006). En *Mammillaria luethyi*, Escobedo *et al.* (2010) obtuvieron brotes a partir de la organogénesis indirecta, con las concentraciones 1.0 y 3.0 mgL<sup>-1</sup> de BA y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de cinetina.

#### b. Areolas

En las areolas se encuentran los meristemas que son puntos de crecimiento, para la formación de espinas, flores, nuevas plantas y raíces. El uso de areolas es importante para generar su activación y así inducir la brotación, algunos investigadores las han utilizado como: Johnson y Emino (1979) en *Mammillaria elongata*, Ortiz-Montiel y Alcántara-García (1997) en *Lophophora williamsii*, Buendía *et al.* (1999) en *Lophophora williamsii*, Pérez *et al.* (1999) en *Schlumbergera truncata*, Choreño-Tapia *et al.* (2002) en *Cephalocereus senilis*, Aliyu y Mustapha (2007) en *Opuntia ficus-indica*, Ramirez-Malagon *et al.* (2007) en diez especies de *Mammillaria*, Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) en *Coryphanta retusa*, Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) en *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* y Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en ocho especies de *Turbinicarpus*.

## 2.9. Medio de Cultivo

Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: compuestos orgánicos, sales inorgánicas, complejos naturales y materiales inertes de soporte (Murashige, 1974).

Compuestos orgánicos: se clasifican en tres grupos los carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos. Las fuentes de carbono utilizadas son la fructosa, el almidón y la sacarosa, esta última es la más utilizada y se emplea a una concentración de 2 a 3 % normalmente. Las sustancias hormonales son las auxinas y las citocininas. Las concentraciones varían entre las especies. Siendo algunas auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico, ácido naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y como citocininas son las siguientes: bencil aminopurina (BA), furfural aminopurina (cinetina), tidiazurón (TDZ), 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2iP) Las giberelinas se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, principalmente en ápices o meristemas. Su adición en el medio de cultivo no es crítica. Las vitaminas se pueden utilizar una o varias, entre estas están: tiamina, inositol, ácido ascórbico, glicina, ácido nicotínico, piridoxina, entre otras. Los aminoácidos o amidas que han tenido un efecto benéfico como: L-arginina, L-asparagina, L-glutamina, L-serina, entre otras (Pierick, 1990; Salisbury y Ross, 1994; Hurtado y Merino, 2000; Jankiewicz, 2003).

Sales inorgánicas: para optimizar las necesidades de plantas específicas ha traído la formulación de varias mezclas salinas, por ejemplo la de Tripathi (1968), Gamborg, Miller y Ojima (1968), Margara, Rancillac y Baouniols (1966), Moler y Muller (1964), Torrey (1964), White (1963), Murashige y Skoog (1962), mencionando algunas mezclas (Pierick, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

La fórmula de Murashige y Skoog (1962) ha demostrado que es un medio adecuado para la familia Cactaceae, así como también para diferentes partes de la planta. Esta fórmula contiene grandes cantidades de macronutrientes; también contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de nitrato de amonio y nitrato de potasio (Hurtado y Merino, 2000). Por esa razón este medio fue el empleado como medio basal para este trabajo complementado con vitaminas (Cuadro 2-2).

**Cuadro 2-2.** Compuestos del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con vitaminas.

Compuestos	g L <sup>-1</sup>
<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1.65
Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	1.9
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.44
Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.17
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.37
<b>Micronutrientes</b>	
Yoduro de potasio (KI)	0.00083
Ácido Bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> )	0.0062
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	0.017
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.0086
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.00025
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	0.000025
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0.000025
<b>Solución Ferrosa</b>	
Ácido etilendiaminotetracético (Sal disódica, Na <sub>2</sub> EDTA)	0.0373
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.0278
<b>Vitaminas</b>	
Inositol	0.1
Ácido nicotínico	0.0005
Piridoxina (HCL)	0.0005
Tiamina (HCL)	0.0001
Glicina	0.002

Complejos naturales: muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo. Algunos son: la pulpa de plátano, la leche de coco, emulsión de pescado, zumos (de tomate, uva, naranja y piña), extractos de levadura y hidrolizado proteico (Pierick, 1990; Hurtado y Merino, 2000).

Materiales inertes de soporte: El agar es el más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo (Pierick, 1990; Hurtado y Merino, 2000)

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Ubicación del experimento

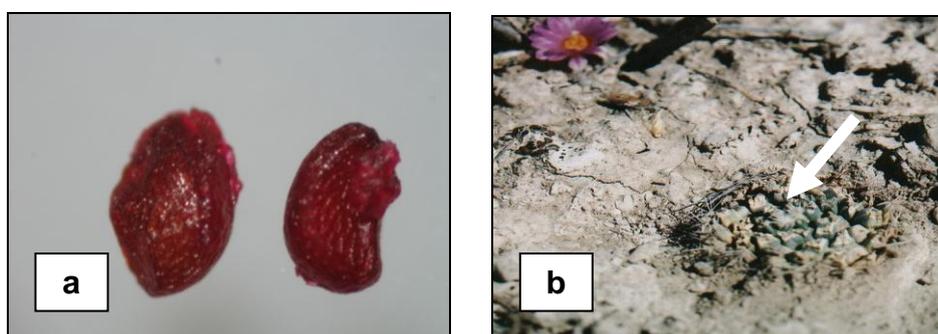
La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Para esta investigación se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) complementado con glicina ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina HCl ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina HCl ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). A esta composición en lo sucesivo le llamaremos medio MS.

#### 3.2. *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*

##### 3.2.1. Material vegetal

En *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* se utilizaron semillas de frutos de plantas que se recolectaron en la laguna de Mayran, Coah. (Figura 3-1). Los frutos se colocaron en la estufa, a una temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 12 d para secarlos y así poder extraer la semilla. Se pretrataron las semillas con Captan (1, 2, 3, 6-tetrahidro-N-(triclorometilitio) thalimida) y Bactrimicin (estreptomicina + oxitetraciclina) y se almacenaron por 42 meses en bolsas porosas.



**Figura 3-1.** *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* (a) semilla y (b) planta.

##### 3.2.2. Germinación

Se utilizaron 440 semillas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*. Las semillas se dividieron en dos lotes para dos siembras. En la primera siembra se utilizaron 150 semillas que se esterilizaron en agua jabonosa por 5 min; enjuagándose con agua

corriente; en seguida se sumergieron en etanol al 70 % por 1 min y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1.2 % por 10 min. Se enjuagaron tres veces en agua desionizada esterilizada. Se sembraron cinco semillas por frasco. En la segunda siembra, se utilizaron 290 semillas, se realizó un mes después. El proceso de esterilización consistió en sumergir la semilla en agua jabonosa por 15 min, se colocaron en etanol al 70 % por 1 min. Posteriormente se introdujeron en hipoclorito de sodio al 1.2 % se aumentó a 15 min y se lavaron tres veces en agua destilada esterilizada. Las semillas se sembraron, 10 semillas por frasco. Las semillas de ambos lotes se colocaron en el medio MS con los macronutrientes al 25 % y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH fue de 5.7-5.8, ajustando con 0.1 de hidróxido de sodio o 0.1 de ácido clorhídrico. Los frascos con 25 mL de medio MS y con tapas de plástico, fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min y se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 27 °C±2 con luz constante y a una intensidad luminosa de 62.5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

La germinación se evaluó durante 50 d para las dos siembras. Se calculó el Índice de Velocidad de Germinación (IVG): donde  $IVG = \sum(n_i/t_i)$ ;  $n_i$ =número de semillas germinadas en el i-ésimo día y  $t_i$ =tiempo de días, para la germinación en el i-ésimo día.

### 3.2.3. Formación de brotes

Se realizaron dos fases. Para la primera fase se emplearon 100 plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, de 0.5 cm de longitud. Como inoculo se utilizó la parte aérea, desechando la raíz. Los explantes se transfieren al medio MS al 100 % como medio basal y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.7-5.8. Los frascos con 25 ml de medio con tapas de plástico esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min. Para los tratamientos se emplearon los reguladores de crecimiento siguientes: 6-(γ, γ-dimetilalilamino) purina (2iP), tidiazurón (TDZ) como citocininas y como auxina el ácido naftalenacético (ANA) que se adicionaron solas o en combinación. Para la segunda fase se sembraron los callos obtenidos en la primera fase y se vario sólo las concentraciones de los reguladores de crecimiento. Las concentraciones se muestran en los cuadros 3-1 y 3-2. Los frascos se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 27 °C±2 con luz constante y a una intensidad luminosa de 62.5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Las variables evaluadas fueron: tipo y color de callo, número de brotes, brotes que formaron raíz y plántulas aclimatadas. El diseño estadístico empleado fue

completamente al azar. Se utilizaron 10 repeticiones (cada frasco fue una unidad experimental). Las variables que mostraron normalidad fueron analizadas mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS.

**Cuadro 3-1.** Concentraciones para la primera fase de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas).

Reguladores			
Auxina (mg L <sup>-1</sup> )		Citocininas (mg L <sup>-1</sup> )	
ANA		TDZ	2iP
0.0		0.0	0.0
0.1		0.1	0.1
0.1		1.0	1.0
0.1		2.0	2.0
1.0		1.0	1.0

**Cuadro 3-2.** Concentraciones para la segunda fase de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas).

Reguladores			
Auxina (mg L <sup>-1</sup> )		Citocininas (mg L <sup>-1</sup> )	
ANA		TDZ	2iP
0.0		0.0	0.0 (T1)
0.0		2.0 (T5)	2.0 (T2)
0.1		2.5 (T6)	2.5 (T3)
0.1		3.0 (T7)	3.0 (T4)

#### 4.2.4. Enraizamiento

Para la formación de raíz se colocaron los brotes en medio MS al 100 % sin reguladores del crecimiento.

#### 4.2.5. Aclimatación

Para la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* los brotes con raíz fueron colocados en un invernadero con una temperatura de 27 °C±2. Se utilizó una mezcla de tezontle y tierra de monte (1:3 partes), esterilizados. Las plantas se regaron con 50 mL de agua cada tercer día. Para evitar la deshidratación de los brotes las macetas se cubrieron con bolsas de plástico durante 21 d. Al día 15 y durante 6 d se les fueron haciendo pequeños orificios a las bolsas hasta retirarlas en el día 21.

### 3.3. *E. platyacanthus*

#### 3.3.1. Material vegetal

Las semillas de *E. platyacanthus* se obtuvieron de frutos secos donados por el Colegio de Postgraduados de Montecillo, Edo. de Méx.

Con un estereoscopio se examinó la semilla extraída de los frutos para separar la semilla dañada, obteniendo un total de 200 semillas (Figura 3-2).



**Figura 3-2.** Fotografías (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto), planta (a), fruto (b) y semilla (c).

#### 3.3.2. Germinación y viabilidad

Se utilizó el medio MS al 100 % y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH fue de 5.7-5.8, ajustando con 0.1 de hidróxido de sodio o 0.1 de ácido clorhídrico. Los frascos con 25 mL de medio MS y con tapas de plástico, fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min, para la prueba de germinación. La siembra se efectuó utilizando 200 semillas, de las cuales se separaron 50 para la prueba de viabilidad de *E. platyacanthus* con una edad de 10 meses. La esterilización de la semilla consistió en: lavar la semilla en una solución jabonosa en agua corriente por 20 min y se enjuagó; posteriormente se sumergió en alcohol al 70 % por 1 min, se pasaron a hipoclorito de sodio al 1.2 % (solución comercial) por 15 min y finalmente se realizaron tres enjuagues de agua destilada estéril. Se sembraron 10 semillas por frasco y se llevaron al área de incubación con temperatura 26 ± 2 °C y luz constante.

La germinación se evaluó durante 116 días. Se calculó el Índice de Velocidad de Germinación (IVG): donde  $IVG = \sum(n_i/t_i)$ ;  $n_i$ =número de semillas germinadas en el  $i$ -ésimo día y  $t_i$ =tiempo de días, para la germinación en el  $i$ -ésimo día.

Se tomaron 50 semillas de *E. platyacanthus* las cuales se colocaron en una caja de petri con agua desionizada esterilizada con captan y bactrimicin (2 g L<sup>-1</sup>) y se

incubaron por 24 horas. Para determinar la viabilidad de la semilla se utilizó la sal de tetrazolio (Cloruro 2, 3, 5, trifenil tetrazolio) con una concentración del 0.1 %. Posteriormente en la campana de flujo laminar se colocó la caja petri con las semillas, retirando el agua y enjuagándolas con agua desionizada esterilizada. De las 50 semillas se seleccionaron 10. Las semillas permanecieron en el cloruro de tetrazolio por 6 días. Se sembraron en medio MS al 100 %, las semillas restantes. Teniendo 190 semillas para la prueba de germinación.

### **3.3.3. Formación de brotes**

Se realizaron dos fases. Para esta primera fase de la investigación se utilizaron 56 plántulas con espinas, de aproximadamente 1 cm. Para la inducción, se colocaron solo los ápices. El inoculo fueron sembrados en medio de cultivo MS al 100 % y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.7-5.8. Los frascos con 25 mL de medio con tapas de plástico esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min. Los tratamientos empleados fueron con los reguladores de crecimiento siguientes: 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2iP), tidiazurón (TDZ) como citocininas y como auxina el ácido naftalenacético (ANA) que se adicionaron solas o en combinación. Las concentraciones se muestran en el cuadro 3-3. Los frascos se colocaron en el área de incubación, a temperatura de 27 °C $\pm$ 2 con luz constante y a una intensidad luminosa de 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Para incrementar el número de brotes, los callos obtenidos en la primera fase se cambiaron de medio basal MS al 100 % y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, se añadieron glutamina (250 mg L<sup>-1</sup>) y arginina (40 mg L<sup>-1</sup>). Se aumentó las concentraciones de las citocininas ya sean solas o combinadas. Las concentraciones se muestran en la cuadro 3-4. El pH se ajustó a 5.7-5.8. Los frascos se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 27 °C $\pm$ 2 con luz constante y a una intensidad luminosa de 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

El diseño experimental empleado fue completamente al azar. Por el número limitado de plántulas se establecieron cinco repeticiones. Se sembró una plántula por frasco que se considero como la unidad experimental. Las variables evaluadas fueron: tipo y color de callo y número de brotes. Las variables fueron tratadas mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS.

**Cuadro 3-3.** Concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas).

Reguladores		
Auxina (mg L <sup>-1</sup> )	Citocinina (mg L <sup>-1</sup> )	
ANA	TDZ	2iP
0.0	0.0	0.0 (T1)
0.0	2.0 (T4)	2.0 (T2)
0.2	3.0 (T5)	3.0 (T3)

**Cuadro 3-4.** Concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxina y citocininas).

Reguladores		
Auxina (mg L <sup>-1</sup> )	Citocininas (mg L <sup>-1</sup> )	
ANA	TDZ	2iP
0.0	0.0	0.0
0.0	3.0	3.0
0.2	3.0	3.0

#### 4.2.6. Enraizamiento

La formación de raíz se obtuvo colocando los brotes en medio MS al 100 % sin reguladores del crecimiento.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

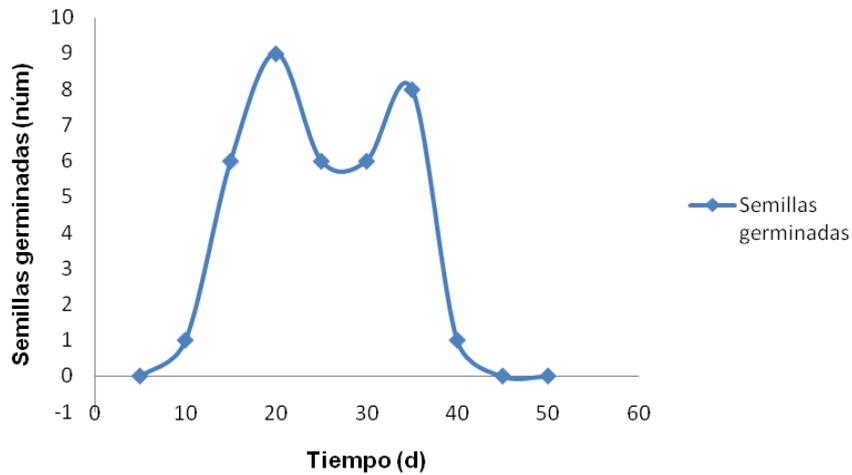
### 4.1. Germinación de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*

La germinación de semillas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* en las dos siembras iniciaron a los 9 d y terminaron de germinar hasta los 50 d (Figura 4-1).

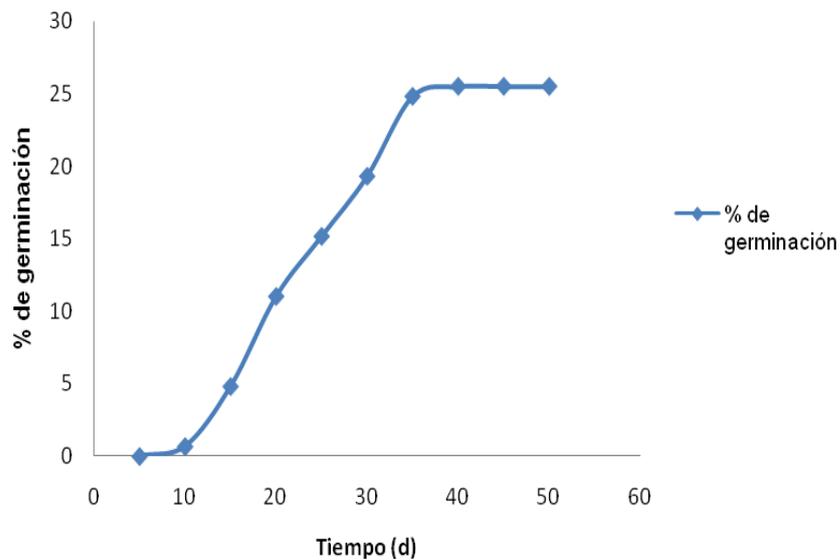


**Figura 4-1.** Plántula germinada de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* a los 50 d.

La germinación en las semillas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* fue baja. En la primera siembra se utilizaron 150 semillas. Se tuvo una pérdida, por contaminación de cinco semillas (3.33 %). De las restantes germinaron 37 (25.51 %). No germinaron 108 (74.48 %) (Figura 4-2 y 4-3). El IVG obtenido fue de 1.64 semillas por día.

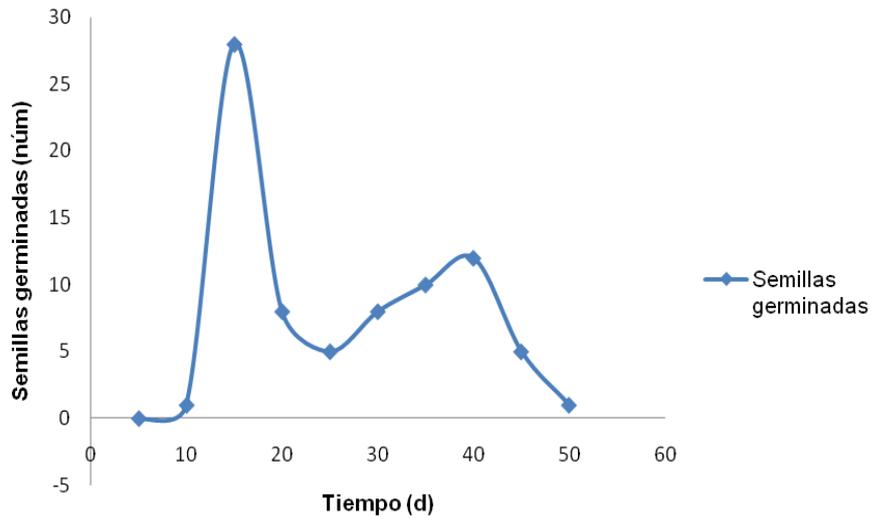


**Figura 4-2.** Número de semillas germinadas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* en medio MS al 25 % de macronutrientes.

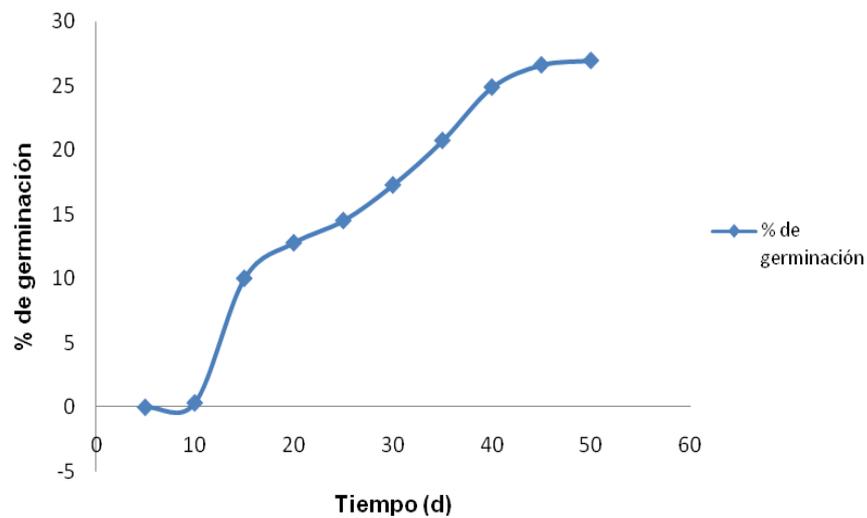


**Figura 4-3.** Porcentaje de germinación de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* en medio MS al 25 % de macronutrientes.

En la segunda siembra se utilizaron 290 semillas. Una semilla se perdió por contaminación (0.34 %). De las 289 semillas germinaron 78 (26.98 %). No germinaron 211 (73.01 %) (Figura 4-4 y 4-5). El IVG obtenido fue de 3.55 semillas por día. Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) encontraron que en un medio sin reguladores y sin escarificación obtuvieron 80 % de germinación, en semillas de 4 meses de edad. Cuellar *et al.* (2006) obtuvo una baja germinación en *Hylocereus undatus* (12.9 %), *Stenocereus griseus* (15.2 %).



**Figura 4-4.** Número de semillas germinadas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* en medio MS al 25 % de macronutrientes.



**Figura 4-5.** Porcentaje de germinación de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* en medio MS al 25 % de macronutrientes.

## 4.2. Inducción de brotes, enraizamiento y aclimatación

### 4.2.1. Establecimiento del inoculo

Para el establecimiento del cultivo aséptico se utilizaron plántulas sin raíz procedentes de la germinación *in vitro*.

#### 4.2.2. Tipo y color de callo

En la formación de callo inició, en todos los tratamientos, a los 10 d y en total duro 122 d. Los callos en TDZ fueron esencialmente friables y en 2iP fueron más compactos. Los callos presentaron una coloración verde en todos los tratamientos. Se presentó una pérdida de material del 20 % por oxidación.

#### 4.2.3. Inducción de brote

En los callos formados en la fase de establecimiento (fase I) se obtuvo una brotación muy baja se muestra en el cuadro 4-1. Estos resultados fueron similares a los reportados por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) quienes obtuvieron poca formación de brotes en *Mammillaria hageana* al utilizar plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*. Mientras que Gómez *et al.* (2006) en *Myrtillocactus geometrizans* encontraron que en plántulas sin raíz, la presencia de citocininas si influye en la formación de brotes. Obteniendo en promedio de 2.1-2.8 brotes, en la concentración de 3.0 mg L<sup>-1</sup>.

**Cuadro 4-1.** Número promedio de brotes obtenidos en inoculos de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* para la primera prueba con la auxina ANA y las citocininas 2iP y TDZ.

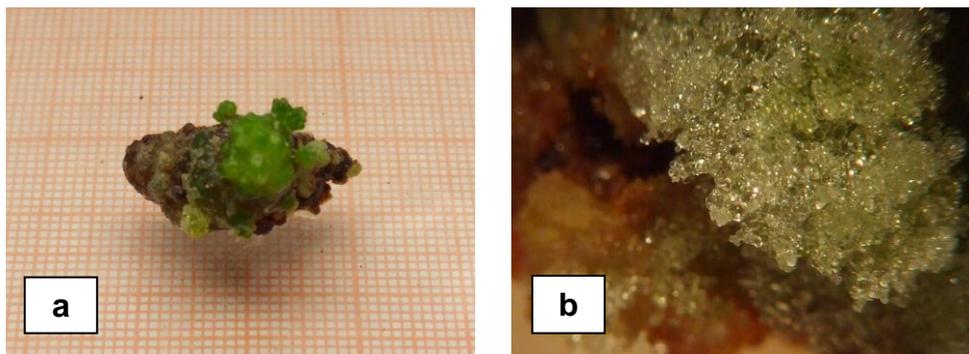
Reguladores		
Auxina (mg L <sup>-1</sup> )	Citocinina (mg L <sup>-1</sup> )	Plantulas completa (cantidad)
<b>ANA</b>	<b>2iP</b>	<b>BROTOS</b>
0.0	0.0	0.0
0.1	0.1	0.0
0.1	1.0	0.2
0.1	2.0	0.6
1.0	1.0	0.0
<b>ANA</b>	<b>TDZ</b>	<b>BROTOS</b>
0.0	0.0	0.0
0.1	0.1	0.0
0.1	1.0	0.0
0.1	2.0	0.1
1.0	1.0	0.0

En la segunda fase se utilizaron los callos obtenidos de la primera fase y los resultados que se observaron fueron los siguientes:

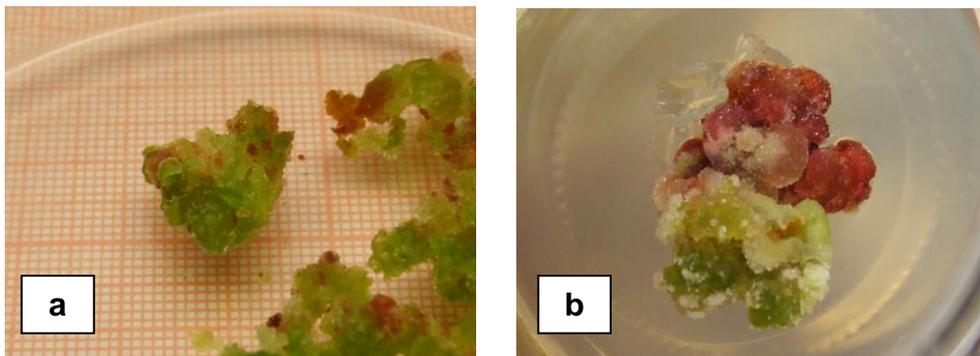
#### 4.2.4. Tipo y color del callo

Los callos formados en el medio MS complementado con 2iP fueron más compactos y se presentaron con mayor frecuencia (Figura 4-6).

Los callos en TDZ fueron esencialmente friables y, sin embargo, los callos formados con TDZ en la concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup> presentaron tonalidades rojizas (Figura 4-7). De acuerdo Domínguez y Domínguez (1976) la tonalidad rojiza se debe a la producción de compuestos nitrogenados llamados betalainas. Esta respuesta fue confirmada por Pérez *et al.* (1998) quienes obtuvieron regiones de callos con coloraciones rojizas de *Mammillaria*, debido a la presencia de betalainas.



**Figura 4-6.** Formación de callos compactos con 2iP (a) y friables con TDZ (b) de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.



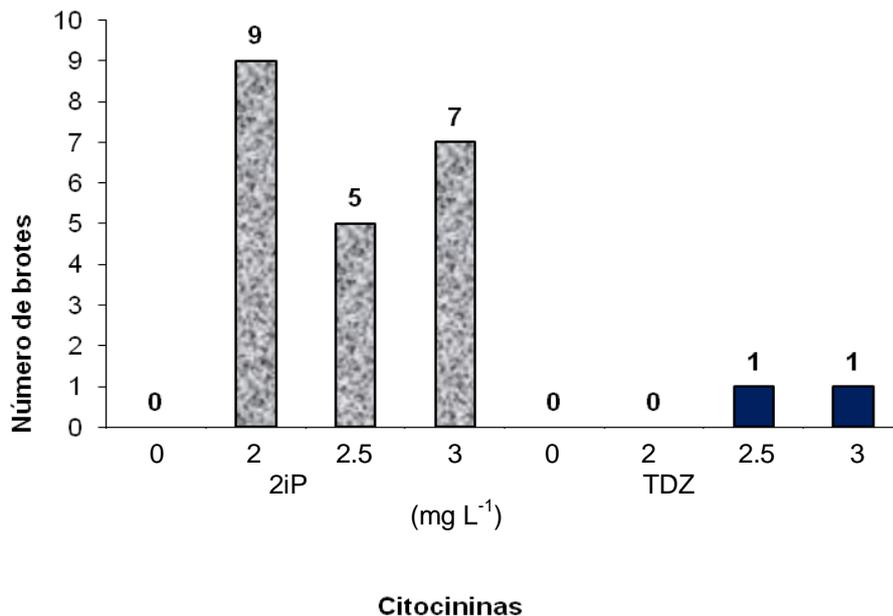
**Figura 4-7.** Formación de callos verdes (a) y con la pigmentación rojiza (b) en el medio con TDZ de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

#### 4.2.5. Número de brotes

La formación de brotes, inició a los 13 d después de colocar los inóculos al medio con 2iP, la última observación se hizo a los 40 d.

La formación de brotes se obtuvo en presencia de altas concentraciones de 2iP (2.0, 2.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>), esto se observa en trabajos realizados por diferentes investigadores como Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis*; Escobedo *et al.* (2010) en *Mammillaria luethyi*; Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en *Turbinicarpus*; Villavicencio *et al.* (1999) en *Astrophytum myriostigma*; Mata *et al.* (2001) en *Turbinicarpus laui* y Aira *et al.* 2006 en *Notocactus magnificus*.

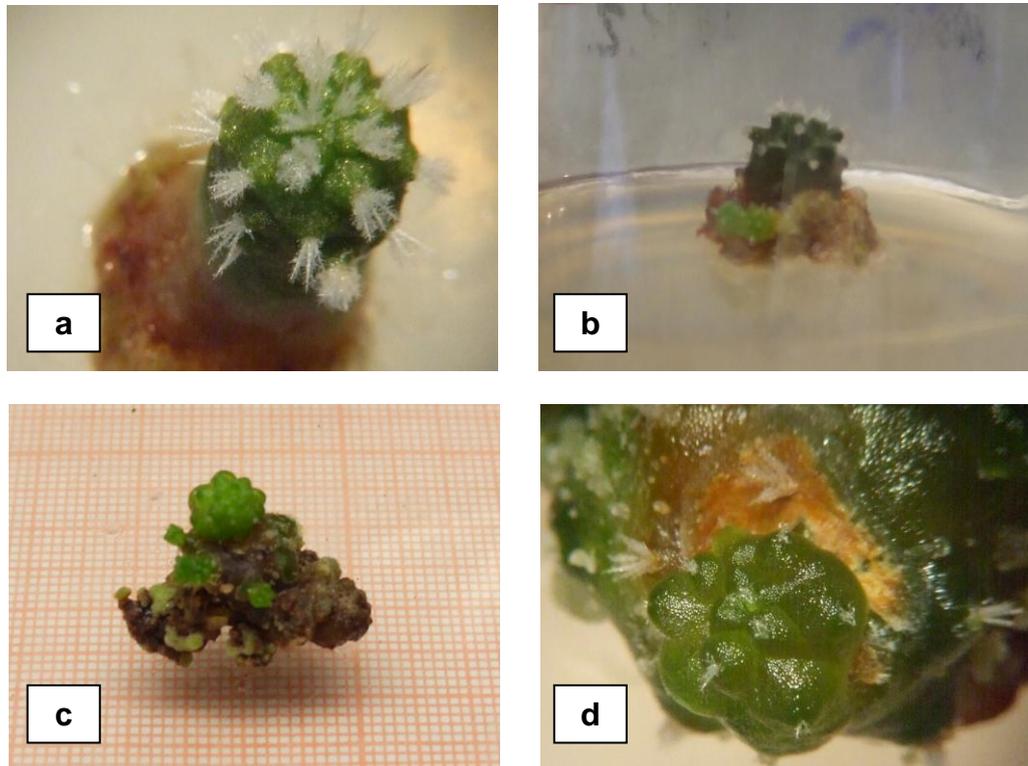
El mayor número de brotes se obtuvieron en los tratamientos con 2iP (Figura 4-8). Aparentemente el empleo de 2iP favorece la formación de brotes como lo menciona Buendía *et al.* (1999) en *Lophophora williamsii* y Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en *Turbinicarpus schmedickeanus* subs. *flaviflorus* y *T. schmedickeanus* subs. *klinkerianus*. El tipo de citocininas va ha depender del tipo de planta y el tejido que se use para propagación como lo demuestran Ramirez-Malagon *et al.* (2007) en *Mammillaria orcutii*, *M. perbella*, *M. picta* y *M. zephyranthoides*; Garnica y Pérez (2010) en *Mammillaria carmenae* y Choreño-Tapia (2002) en *Cephalocereus senilis*. Estos autores utilizaron como citocininas al BA y a la Cinetina, las concentraciones fueron similares a las reportadas en este trabajo.



**Figura 4-8.** Número de brotes obtenidos por tratamientos con citocininas de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

En el caso del TDZ si hubo formación de brotes en las concentraciones 2.0, 2.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>; sin embargo los brotes se vitrificaron (Figura 4-9). Esta respuesta fue reportada por Giusti *et al.* (2002) en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecypora aselliformis* y *Escobaria minima*. La vitrificación, pudiera deberse, no solamente al tipo de

citocinina, sino también a la planta como lo muestra Villavicencio *et al.* (1999) en *Astrophytum myriostigma* y Pérez *et al.* (1998) en seis especies de mamilarias quienes usaron para la propagación a BA. Sin embargo, Pérez *et al.* (1998) considera que, además, la vitrificación pudiera deberse al agar.



**Figura 4-9.** Formación de brotes (a, b y c) normales (d) vitrificado de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

Los tratamientos 2, 4, 3, 6 y 7 son iguales estadísticamente y superiores a los tratamientos 1 (testigo) y 5 ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ) ver cuadro 4-2. Los brotes se originaron por organogénesis indirecta. Esta respuesta fue observada por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis*. Ramirez-Malagon *et al.* (2007) obtuvieron brotación esporádica en la superficie de algunos callos en *Mammillaria*. En *Mammillaria luethyi*, Escobedo *et al.* (2010) obtuvieron brotes a partir de la organogénesis indirecta, con concentraciones de  $1.0$  y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina. Los brotes obtenidos de *Notocactus magnificus* fueron a partir de una organogénesis indirecta (Aira *et al.* 2006). Moebius-Goldammer *et al.* (2003) en la organogénesis indirecta de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, después de 6 semanas obtuvieron brotes adventicios con BA, se formaron 6.2-6.3 brotes por explante. Gómez *et al.* (2006) en concentraciones altas ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) hay mayor cantidad de brotes en *Myrtillocactus geometrizans*.

**Cuadro 4-2.** Comparación de medias para el número de brotes en *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

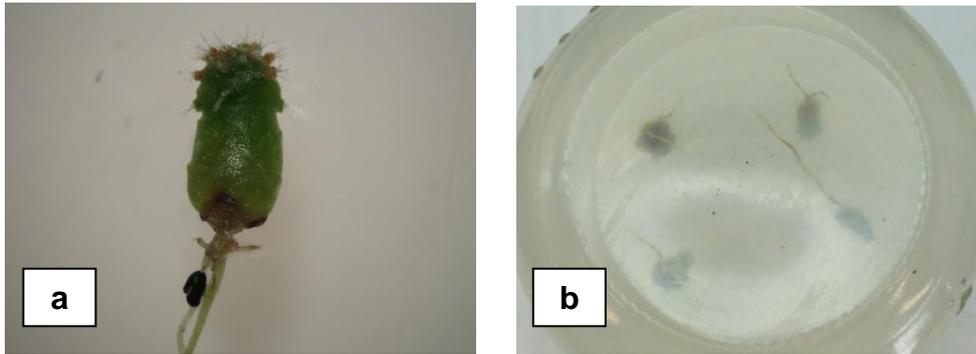
Tratamientos	Número de brotes	Prueba de Tukey <sup>a</sup>
2	9	a
4	5	a
3	7	a
7	1	a
6	1	a
5	0	b
1	0	b

<sup>a</sup> Tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente con un alpha de 0.05 %.

#### 4.2.6. Formación de raíz

La formación de raíz comenzó a los 16 d. Se sembraron 23 brotes de los cuales sólo 13 formaron raíz. Esto equivale el 56.52 %. La formación de raíz se obtuvo al ser transferidos los brotes a un medio MS, para mantener su crecimiento, sin reguladores del crecimiento (Figura 4-10). La respuesta coincide con los resultados reportados por Clayton *et al.* (1990) en 11 especies de la subtribu Cactinae; Ault y Blackmon (1987) en *Ferocactus acanthodes*; Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) en *Coryphantha retusa* y Ojeda-Zacarías *et al.* (2008) en *Astrophytum capricorne*. Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en ocho especies o subespecies de *Turbincarpus* presentaron mayor porcentaje de enraizamiento desde 54.25 % en *T. schmedickeanus* subsp. *flaviflorus* a 94.2 % *T. subterraneus* con el medio basal MS al 100 %. Aira *et al.* (2006) en *Notocactus magnificus* observaron el 45 % de brotes que formaron raíz en un medio MS al 100 %. En general, al inicio presento una raíz principal de color blanco. Posteriormente se formaron raíces secundarias y vellosidades radicales que suponemos que comenzaron a lignificar, por la tonalidad oscura que se formo (Figura 4-10). Sin embargo Pérez *et al.* (1998) reportan que la regeneración de raíz fue obtenida al utilizar las auxinas AIA y AIB.

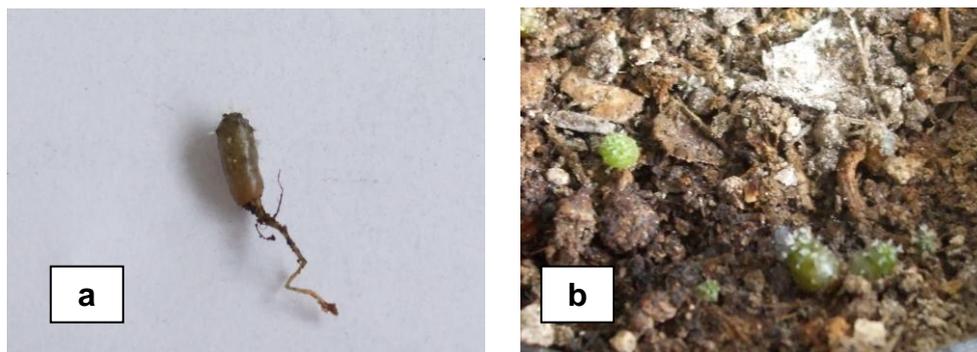
Los brotes vitrificados tomaron la misma tonalidad de los brotes normales al ser transferidos a un medio sin reguladores. Este efecto pudo ser originado por la presencia de los reguladores de crecimiento. Esto fue confirmado por Giusti *et al.* (2002) en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora aselliformis* y *Escobaria minima* y Villavicencio *et al.* (1999) en *Astrophytum myriostigma*.



**Figura 4-10.** Foto de un brote con raíz (a) y raíces lignificadas en el medio MS al 100 % (b) de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

#### 4.2.7. Aclimatación

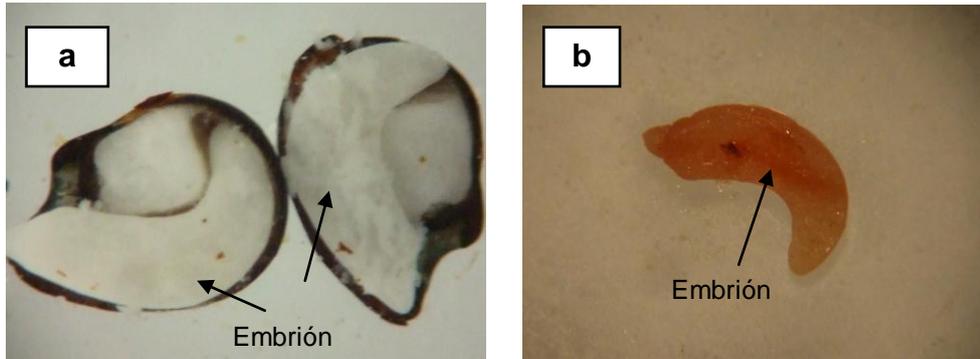
Se tuvo una supervivencia del 92.3 %. En el 0.7 % restante se manifestó la deshidratación y su muerte posterior en aproximadamente 3 d (Figura 4-11). Pérez *et al.* (1998) en las 21 especies presentaron una supervivencia del 50-95 %. Gómez *et al.* (2006) en *Myrtillocactus geometrizans* obtuvo un 84 % de plántulas adaptadas. Aira *et al.* (2006) observaron en *Notocactus magnificus* una sobrevivencia del 20 % de las plántulas. Por lo que es alto el índice de adaptación.



**Figura 4-11.** Foto de una plántula aclimatada (a) y plántulas trasplantadas al sustrato (b) de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

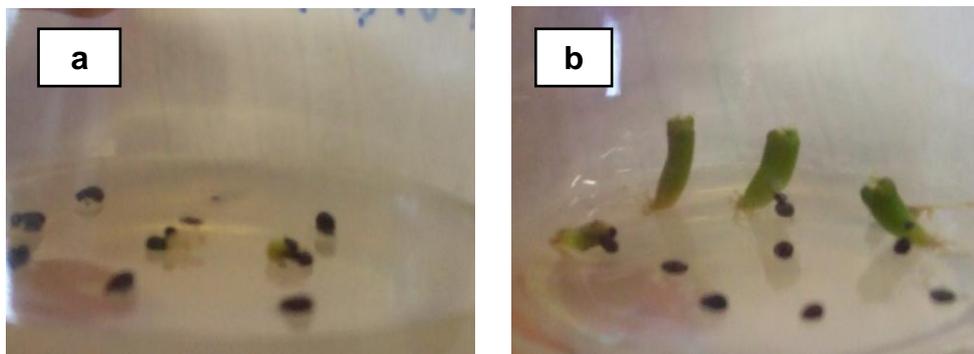
#### 4.3. Germinación y viabilidad de *E. platyacanthus*

La prueba de viabilidad en *E. platyacanthus* mostro una coloración de los embriones rosa pálido (Figura 4-12) lo cual de acuerdo a Moreno (1984) indica una baja viabilidad.



**Figura 4-12.** Embriones de *E. platyacanthus* sin tetrazolio (a) y con tetrazolio después de seis días (b).

De las 190 semillas utilizadas se perdió el 10.5 % por contaminación quedando solo 170 semillas, de las cuales se obtuvieron 56 germinadas, esto es el 32.94 % (Figura 4-13). La prueba de viabilidad indicó correspondencia con la germinación obtenida, al ser ambas bajas. Estos resultados podemos decir que son los esperados considerando que la semilla de *E. platyacanthus* esta considera como semilla de mediana a grande. De acuerdo a Ayala-Cordero *et al.* (2004), el tamaño de la semilla influye en el porcentaje y velocidad de germinación. En *Stenocereus beneckeii* obtuvieron, en semillas intermedias y grandes, los valores más altos de germinación en las dos primeras fechas de siembra. En las semillas pequeñas los valores fueron bajos, lo cual puede indicar que requieren más tiempo para alcanzar su madurez fisiológica.

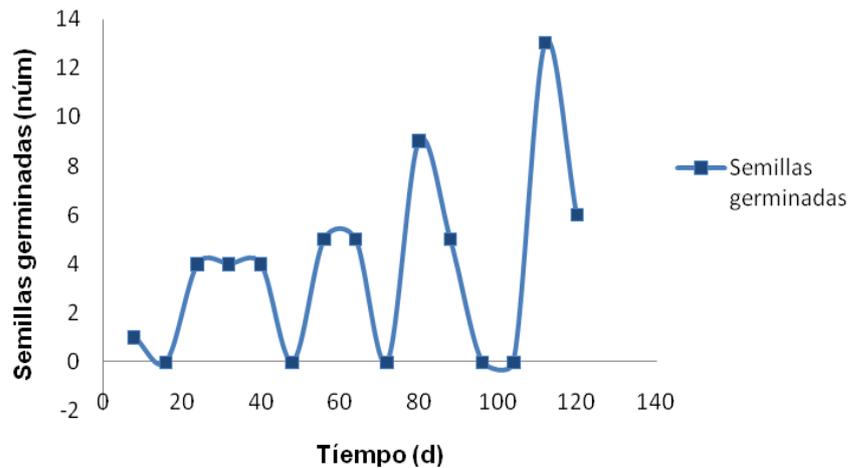


**Figura 4-13.** Semillas germinadas (a) y plántulas (b) de *E. platyacanthus*.

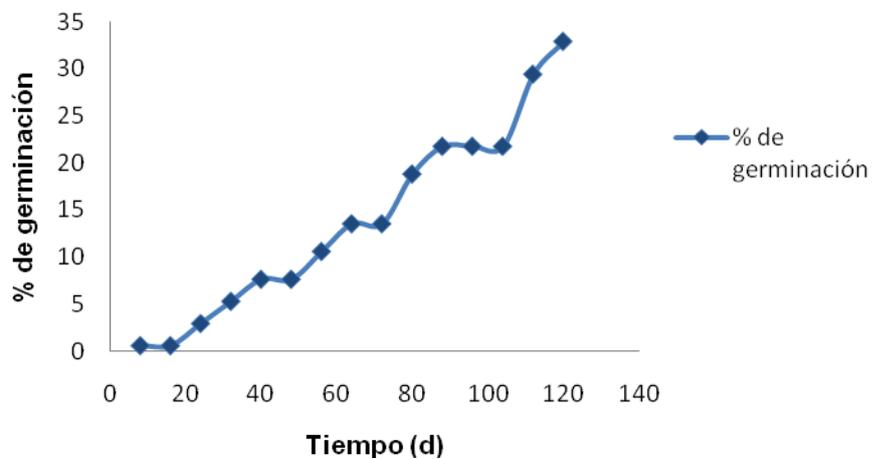
El IVG obtenido fue de 1.02 semillas por día para *E. platyacanthus*.

En *E. platyacanthus*, el inicio de la germinación fue a los 8 d en un medio MS con sales al 100 %. Estos resultados fueron los mismos que obtuvieron Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en semillas de *E. platyacanthus* cultivadas en medio MS con sales al 50 %.

La germinación en las semillas de *E. platyacanthus* fue baja (32.94 %) (Figura 4-14 y 4-15). Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) encontraron que en un medio sin reguladores y sin escarificación obtuvieron 80 % en semillas con 4 meses de edad.



**Figura 4-14.** Número de semillas germinadas de *E. platyacanthus* en un medio MS al 100 %.



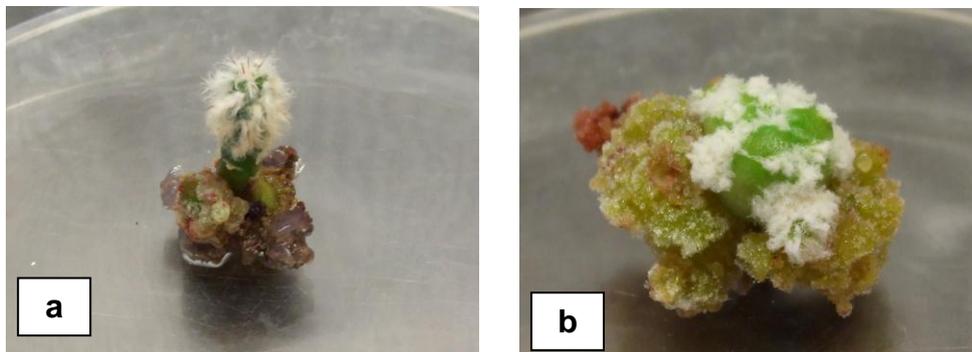
**Figura 4-15.** Porcentajes de germinación *E. platyacanthus* en un medio MS al 100 %.

#### 4.4. Inducción de brotes y formación de raíz.

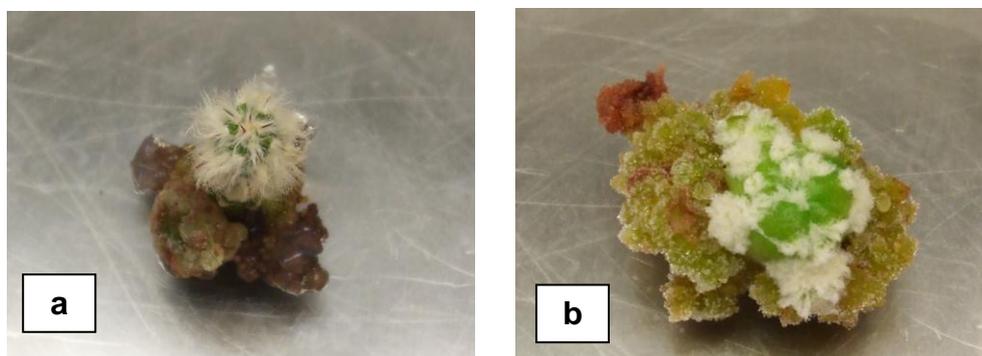
Para el establecimiento del cultivo aséptico se utilizaron la parte apical de plántulas procedentes de la germinación *in vitro*.

##### 4.4.1. Tipo y color de callo

Los callos formados en el medio MS complementado con 2iP fueron más compactos y se presentaron con mayor frecuencia (Figura 4-16). Los callos en TDZ fueron fundamentalmente friables (Figuras 4-16). El color de los callos fue predominantemente verde con presencia de mucha vellosoidad en los callos con TDZ, mientras en los callos con 2iP, la vellosoidad solo fue en los brotes (Figura 4-17).



**Figura 4-16.** Formación de callos compactos con 2iP (a) y friables con TDZ (b) de *E. platyacanthus*.



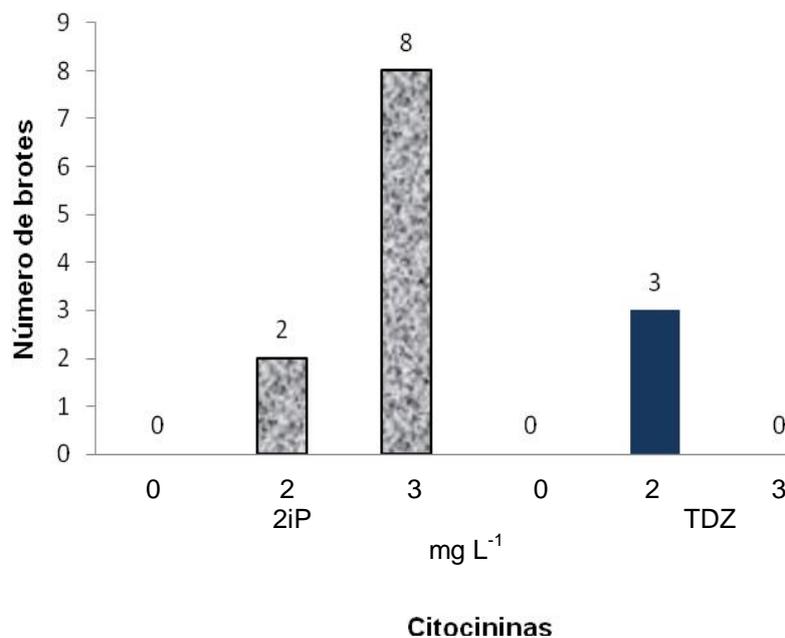
**Figura 4-17.** Formación de callos con tonalidad verde: callo con brote velloso con 2iP (a) y callo con vellosoidad con TDZ (b) de *E. platyacanthus*.

#### 4.4.2. Número de brotes

La formación de brotes, inició a los 60 d después de colocar los inoculos al medio con 2iP, la última observación se hizo a los 34 d.

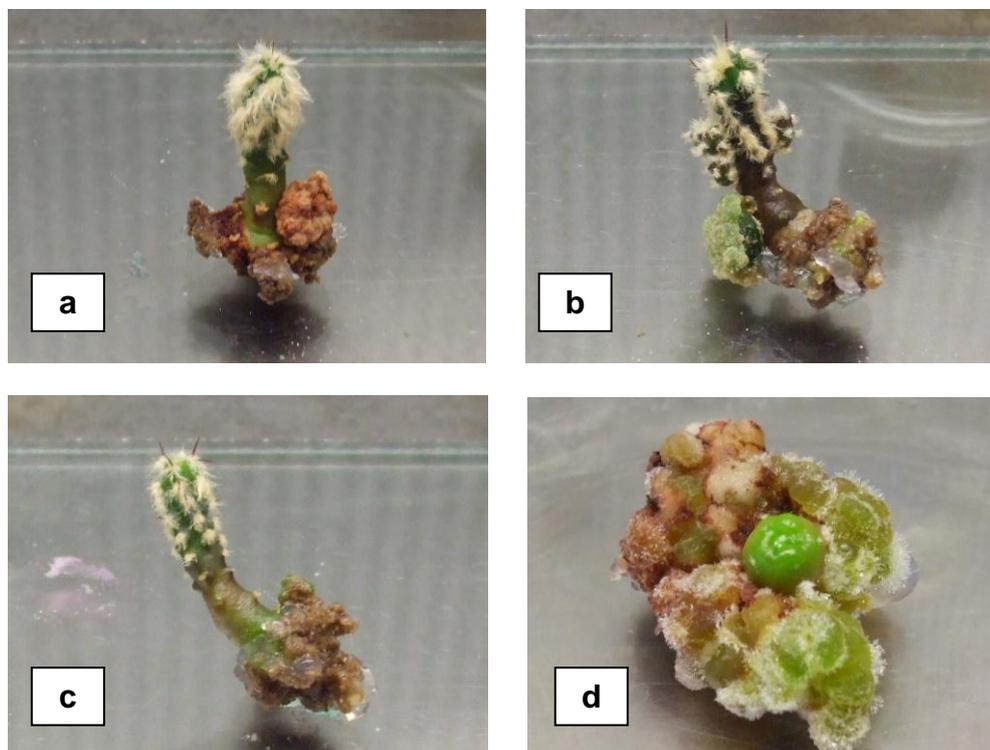
La formación de brotes se obtuvo en presencia de altas concentraciones de 2iP con  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ , esto se observa en trabajos realizados por diferentes investigadores como Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *Mammillaria san-angelensis*; Escobedo *et al.*, (2010) en *Mammillaria luethyi*; Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en *Turbinicarpus*; Villavicencio *et al.* (1999) en *Astrophytum myriostigma*; Mata *et al.* (2001) en *Turbinicarpus laui* y Aira *et al.* 2006 en *Notocactus magnificus*.

El mayor número de brotes se obtuvieron en los tratamientos con 2iP (Figura 4-18 y 4-19). Aparentemente el empleo de 2iP favorece la formación de brotes como lo menciona Buendía *et al.* (1999) en *Lophophora williamsii* y Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en *Turbinicarpus schmedickeanus* subs. *flaviflorus* y *T. schmedickeanus* subs. *klinkerianus*. El tipo de citocininas va ha depender del tipo de planta y el tejido que se use para propagación como lo demuestran Ramirez-Malagon *et al.* (2007) en *Mammillaria orcutii*, *M. perbella*, *M. picta* y *M. zephyranthoides*; Garnica y Pérez (2010) en *Mammillaria carmenae* y Choreño-Tapia (2002) en *Cephalocereus senilis*. Estos autores utilizaron como citocininas al BA y a la Cinetina, las concentraciones fueron similares a las reportadas en este trabajo.



**Figura 4-18.** Número de brotes obtenidos por tratamiento de citocinina de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

En el caso del TDZ si hubo formación de brotes en la concentración 2.0 mg L<sup>-1</sup>, sin presencia de vitrificación (Figura 4-19). Giusti *et al.* (2002) en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecypora aselliformis* y *Escobaria minima* obtuvo brotación con presencia de vitrificación.



**Figura 4-19.** Formación de brotes normales (a, b y c) con 2iP y (d) con TDZ de *M. coahuilensis* var. *coahuilensis*.

Los tratamientos 3, 2 y 4 son iguales estadísticamente y superiores a los tratamientos 1 (testigo) y 5 (3.0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ) ver cuadro 4-3. Los brotes se originaron de plántulas germinadas *in vitro*.

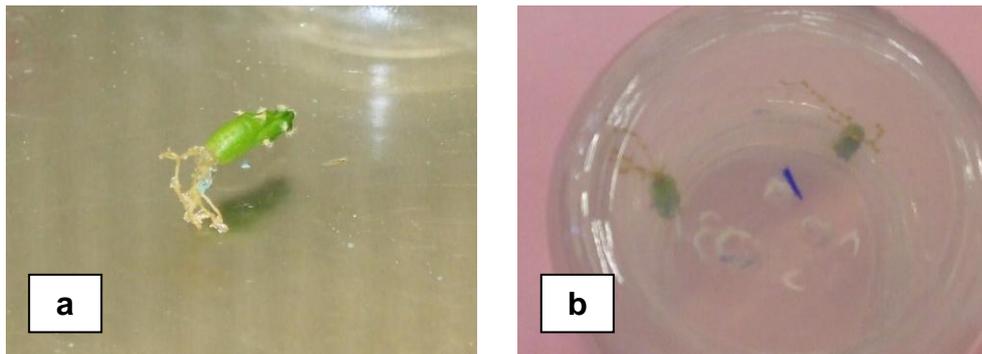
**Cuadro 4-3.** Comparación de medias para el número de brotes en *E. platyacanthus*.

Tratamientos	Número de brotes	Prueba de Tukey <sup>a</sup>
3	8	a
2	2	a
4	3	a
1	0	b
5	0	b

<sup>a</sup> Tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente con un alpha de 0.05 %.

#### 4.4.3. Formación de raíz

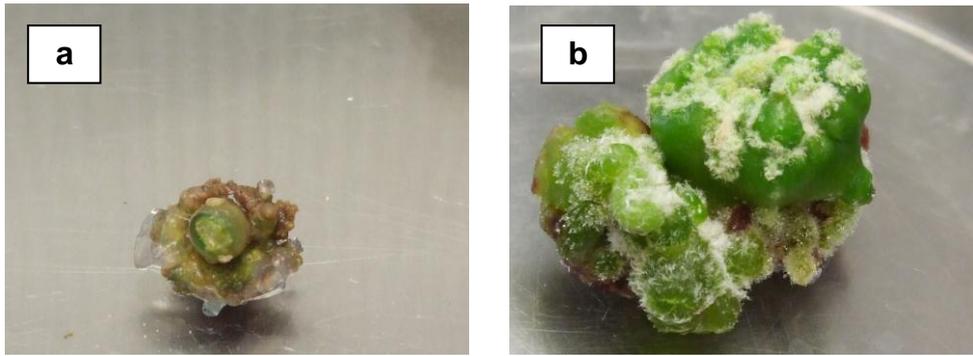
La formación de raíz comenzó a los 25 d. Se sembraron 13 brotes, todas formaron raíz. Esto equivale el 100 %. La formación de raíz se obtuvo al ser transferidos los brotes a un medio MS, para mantener su crecimiento, sin reguladores del crecimiento (Figura 4-20). La respuesta coincide con los resultados reportados por Clayton et al. (1990) en 11 especies de la subtribu Cactinae; Ault y Blackmon (1987) en *Ferocactus acanthodes*; Ruvalcaba-Ruiz et al. (2010) en *Coryphantha retusa* y Ojeda-Zacarías et al. (2008) en *Astrophytum capricorne*. Dávila-Figueroa et al. (2005) en ocho especies o subespecies de *Turbinicarpus* presentaron mayor porcentaje de enraizamiento desde 54.25 % en *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus* a 94.2 % *T. subterraneus* con el medio basal MS al 100 %. Aira et al. (2006) en *Notocactus magnificus* observaron el 45 % de brotes que formaron raíz en un medio MS al 100 %. En general, al inicio presento una raíz principal de color blanco. Posteriormente se formaron raíces secundarias y vellosidades radicales que suponemos que comenzaron a lignificar, por la tonalidad oscura que se formó (Figura 4-20). Sin embargo Pérez et al. (1998) reportan que la regeneración de raíz fue obtenida al utilizar las auxinas AIA y AIB.



**Figura 4-20.** Foto de un brote con raíz (a) y raíces lignificadas en medio MS al 100 % (b) de *E. platyacanthus*.

#### 4.2.7. Tipo y color callo

En el segundo experimento, no hubo brotación, pero si se incrementó el tamaño de los callos y se formó callo en los tejidos donde no tenían diferenciación, esto es en TDZ. Mientras con 2iP no se vio ninguna modificación. No se encontró información en la utilización de la glutamina y la arginina para la formación de brotes en cactáceas (Figuro 4-21).



**Figura 4-21.** Callo con 2iP (a) e incremento de tamaño del callo con TDZ (b) de *E. platyacanthus*.

## V. CONCLUSIONES

### **Para *M. coahuilensis* var. *coahuilensis* se concluyó que:**

El bajo porcentaje de germinación se vio afectado por la edad, el tamaño y el tiempo de reposo o latencia de la semilla.

La formación de brotes se obtuvo por organogénesis indirecta.

La mejor concentración para la formación de brotes sin vitrificación fue con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2iP.

En las concentraciones usadas con TDZ, los brotes formados se vitrificaron.

Se presentó la formación de raíz en un medio basal MS sin la aplicación de reguladores de crecimiento.

Se obtuvo un 92.31 % de plántulas aclimatadas.

### **Para *E. platiacanthus* se concluyó que:**

Los resultados en la prueba de viabilidad correspondieron con los obtenidos en la prueba de germinación.

El bajo porcentaje de germinación y la viabilidad se vieron afectados por la edad, tamaño y tiempo de reposo o latencia de las semillas.

La formación de los brotes se obtuvo por organogénesis indirecta.

La mejor concentración para la formación de brotes sin vitrificación fue 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA con 3.0 mg L<sup>-1</sup> de 2iP.

Se presentó la formación de raíz en un medio basal MS sin la adición de reguladores de crecimiento.

## VI. LITERATURA CITADA

- Aira L. M. de., R. C. R. de. Salvador, L. A. Gallo, E. O. de. Tiago and M. E. S. P. Demattê. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84:165-169.
- Alanís F. G. J. y C. G. M. Velazco. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) 11:5-11.
- Aliyu, S. B. and Y. Mustapha. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. African Journal of Biotechnology 6:1330-1331.
- Alvarado, L. J. 2009. Redacción y preparación del artículo científico. 3<sup>ra</sup>. ed. Colegio de Postgraduados. México.
- Aparecida de O. S., M. de F. P da M. Silva, A. J. Prioli and C. M. Aparecida. 1995. *In vitro* propagation of *cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology* 31:47-50.
- Arias M. Salvador. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 109-115 pp.
- Arias S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. G. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I (Una comparación entre los listados). Cactáceas y Suculentas Mexicanas 50:101-125.
- Ayala-Cordero G., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 30:692-697.
- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *Horticultural Science* 22:126-127.
- Bravo, H. H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. 2<sup>da</sup>. ed. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Buendía L., J. A. Lechuga, M. D. García y F. Cruz. 1999. La propagación *in vitro*, una herramienta en la conservación del peyote (*Lophophora williamsii* Coulter). Cactáceas y otras Plantas Suculentas 40.
- Choreño-Tapia J. M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernandez-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8:183-196.

- CITES 2009. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/resources/especies.html>. Fecha de consulta 25 de septiembre de 2009.
- Clayton P. W., J. F. Hustenberg, G. C. Phillips and A. S. Butler-Nance. 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactine. *Society Horticultural Science* 115:337-343.
- Cuellar C. L., M. E. R. Morales y J. F. N. Treviño. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes de cactáceas. *Zonas Aridas* 10:129-133.
- Dávila-Figueroa C. A., M. de L. de la Rosa-Carrillo and E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagación of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 41:540-545.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA). 1961. Semillas. Editorial Continental. México, D. F.
- Domínguez, S. X. A. y X. A. S. Domínguez, JR. 1976. Aspectos químicos de las cactáceas. *Cactáceas y Suculentas de Mexicanas* 21:39-47.
- Elizondo E. J. L., J. R. Valdés y A. G. Rodríguez. 1990. Cactáceas vulnerables y en peligro de extinción para Coahuila, México. *Biología Ambiental (BIOTAM)* 2:17-22.
- Escobedo B. L., H. T. O. García, R. M. Rojas y F. R. Godina. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G. S. Hinton [en línea]. Consultado en [www.uaaan.mx/DirInV/Resul\\_PI-04/.../LEscobedoBocardo.doc](http://www.uaaan.mx/DirInV/Resul_PI-04/.../LEscobedoBocardo.doc) (revisado el 23 de abril de 2010).
- Flores, A. 2005. Guía de Cactáceas del Estado de Coahuila. ECOAH, SEP, Jardines para la Humanidad y Gobierno de Coahuila. Coahuila, Méx.
- Fuentes J. A. y C. L. S. Jiménez. 2007. Uso y manejo de las cactáceas en la reserva de la biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *Sitientibus Séries Ciencias Biológicas* 7:78-85.
- Garnica, R. L. y M. B. E. Pérez. 2010. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas, agaváceas, nolináceas y especies forestales [en línea]. Consultado en [www.coecyt-coah.gob.mx](http://www.coecyt-coah.gob.mx) (revisado el 20 de marzo de 2010).
- Giusti P. D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95:319-332.

- Gómez J. J. L., J. E. Morales, J. A. C. Lechuga y F. S. Cruz. 2006. Reproducción *in vitro* del garambullo, *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 5:36-45.
- Hartmann, H. T., y D. E. Kester. 1978. Propagación de plantas. 6<sup>ta</sup>. ed. Compañía Editorial Continental. México, D.F.
- Hernández M. H. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- 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* 32:728-734.
- Herrera T. y A. Calderón-Villagómez. 1994. Cactáceas y agaváceas utilizadas en México para la elaboración de bebidas tradicionales. *Cactáceas y Suculentas de México* 39:51-67.
- Hurtado, M. D. V., y M. E. M. Merino. 2000. Cultivo de tejidos vegetales. 5<sup>ta</sup>. ed. Editorial Trillas. México, D.F.
- Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y Ediciones Mundi-Prensa. México, D. F.
- Johnson, L. J. and E. R. Emino. 1979. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongate*. *Horticultural Science* 14:605-606.
- Kunte, L., and R. Šubik. 2004. La enciclopedia de los cactus. Editorial Libsa. Madrid, España.
- Lechuga C. J. A., F. S. Cruz, H. Serrano y M. D. S. García. 1999. El cultivo de tejidos de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto. *Cactáceas y otras Plantas Suculentas* 43 pp.
- Martínez-Vázquez, O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64:99-105.
- Massa, S. A. 2003. Las plantas crasas. Editorial de Vecchi. Barcelona, España.
- Mata R. M., M. A. M. de la Rosa, K. G. Moebius and V. M. A. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 37:400-404.
- Moebius-Goldammer K. G., M. Mata-Rosas and V. M. Chávez-Avila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus*

- (Lem.) K. Schum. (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 39:388-393.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. México, D. F.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 5:473-497.
- Nava-Esparza V. C. y L. L. Yañez. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 29:3-7.
- Nobel, S. P. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas. México, D.F.
- Ojeda-Zacarías M. del C., H. Rodríguez-Fuentes y A. Gutiérrez-Diéz. 2008. Micropropagación de cactáceas. *Salud Pública y Nutrición* 2:143-147.
- Ortiz-Montiel G. J. y R. Alcántara García. 1997. Propagación *in vitro* de peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 42:3-6.
- Pérez C. J., R. Flores y G. Ortiz. 1999. Reproducción *in vitro* del "cactus de navidad" *Schulumbergera truncata* (Hawort) Moran. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44:79-83.
- Pérez M. B. E., M. E. R. Pérez, E. A. Villalobos, E. R. Meza, L. del R. R. Morones y H. J. V. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa and E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the sonoran desert. *Horticultural Science* 37:693-696.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Rojas, G. M. 1993. Fisiología vegetal aplicada. 4<sup>ta</sup>. ed. Interamericana Mc Graw Hill. México, D.F.
- Ramírez-Malagon R, I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Núñez-Palenius and N. Ochoa-Aleho. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 43:660-665.

- Rosas-López, U. and M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *ΦΥton* 213-220.
- Ruvalcaba-Ruiz, D.; D. Rojas-Bravo and A. J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:139-143.
- Salisbury, F. B., y C. W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F.
- Semarnat, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y de especificaciones para su inclusión, exclusión y cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación [en línea]. Consultado en [www.economia.gob.mx/work/normas/noms/2002/059ecol.pdf](http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/2002/059ecol.pdf) (revisado el 25 de septiembre de 2009).
- UICN, 2008. Categorías y criterios de la lista roja [en línea]. Consultado en <http://www.iucn.org/> (revisado el 01 de Junio de 2010).
- Villavicencio G. E. E., A. M. Villegas, G. O. Arellano y J. H. Vargas. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 44:1-4.