



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

MORFOGENESIS *in vitro* DE
CACTACEAS

JANETH TÉLLEZ ROMÁN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: **“Morfogénesis in vitro de cactáceas”**, realizada por la alumna: **Janeth Téllez Román**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



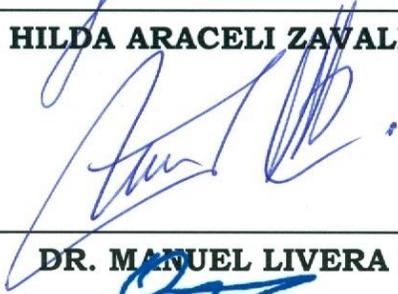
DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

ASESORA



DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

ASESOR



DR. MANUEL LIVERA MUÑOZ

ASESOR



DR. ANDRÉS ADOLFO ESTRADA LUNA

ASESOR



DR. PROMETEO SÁNCHEZ GARCÍA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2012

RESUMEN GENERAL

MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE CACTÁCEAS

Janeth Téllez Román, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

En esta investigación se estudiaron las condiciones de cultivo *in vitro* y las respuestas morfogénicas de tres especies de cactáceas: *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle “aurea”, *Gymnocalycium mihanovichii* cv. Hibotan y *Mammillaria plumosa* Weber ornamentales de importancia económica y la última en peligro de extinción. Con la regeneración de brotes, se establecieron protocolos eficientes para la propagación masiva *in vitro* a partir de la vía organogénica directa e indirecta de *E. chamaecereus* aurea y *M. plumosa*. Finalmente, se evaluaron varios tipos de uniones para el establecimiento de microinjertos compuestos de estas dos especies (injertos) e *Hylocereus undatus* (portainjerto). Durante la micropropagación, los explantes utilizados en todas las especies fueron segmentos de tallo con areolas sembrados en medio básico de Murashige y Skoog (MS) (1962), en el cual se evaluó en cada especie el tipo y concentraciones hormonales. Las respuestas morfogénicas obtenidas en *E. chamaecereus* aurea y *M. plumosa* incluyeron la producción de callos y brotes; sin embargo, los tratamientos evaluados en *G. mihanovichii* cv. Hibotan sólo permitieron la diferenciación de callos. En *M. plumosa* se obtuvieron brotes adventicios y por activación areolar, pero la mayor inducción de brotes adventicios (2.44) y activación areolar (11.4) se obtuvo con 2,4-D 18.0 μM y CIN 9.30 μM . En *E. chamaecereus* aurea la mayor activación areolar se produjo en un medio con BA 13.2 μM y ANA 5.35 μM , con el que se produjeron 12.6 brotes por explante. En *G. mihanovichii* cv. Hibotan se obtuvo la inducción y proliferación de callo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad, pero la mejor respuesta se produjo con CIN: 2,4-D (8.8:4.5 μM). La microinjertación de brotes de *M. plumosa* y *E. chamaecereus* aurea sobre *H. undatus*, fue mejor con un corte tipo C, lográndose la unión fisiológica a los 90 d de hechos los injertos y porcentaje de prendimiento de 90% para *E. chamaecereus* aurea y de 60% para *M. plumosa*. Se concluye que en *M. plumosa* se generaron en promedio 800 plántulas en 170 d de cultivo, el origen histológico de los brotes fue adventicio y por activación areolar; para *E. chamaecereus*, la producción de brotes fue en promedio de 55 por explante a los 120 d, histológicamente siendo su desarrollo por activación areolar; en los microinjertos el análisis histológico permitió la observación de una conexión vascular abundante y normal entre los tejidos. Para *G. mihanovichii* cv. Hibotan sólo se obtuvo la formación de callo y el análisis histológico evidenció únicamente la presencia de tejido fundamental a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

Palabras clave: cactácea, micropropagación, organogénesis indirecta, organogénesis directa, microinjertos.

GENERAL ABSTRACT

In this research, we studied the *in vitro* culture conditions and the morphogenic responses of three plant species: *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle "aurea" *Gymnocalicium mihanovichii* cv. *Mammillaria plumosa* Weber Hibotan, which are ornamental cacti with economic importance and the last one in endanger of extinction. With the information obtained during shoot regeneration, we established efficient protocols for *in vitro* mass propagation via direct or indirect organogenesis of *E. chamaecereus* aurea and *M. plumosa*. Finally, we studied the culture conditions and several types of cuts to establish micrografts between these two plant species (scions) and *Hylocereus undatus* (stock). During the micropropagation, the explants used in all species were stem segments with multiple areoles cultured in basic medium of Murashige and Skoog (MS) (1962). Finally, we studied several types of cuts to establish micrografts between these two plant species (scions) and *Hylocereus undatus* (stock). During the micropropagation, the explants used in all species were stem segments with multiple areoles cultured in basic medium of Murashige and Skoog (MS) (1962), in which varies types of hormones and levels were evaluated in each species. The morphogenic responses observed in *E. chamaecereus* aurea and *M. plumosa* included the production of calli and shoots; however, the treatments evaluated in *G. mihanovichii* cv. Hibotan were not able to regenerate shoots but calli. In *M. plumosa* the regenerated shoots were adventitious and through areolar activation but the greater induction of adventitious buds (2.44) and areolar activation (114.) was obtained with 2.4-D 18.0 μM and 9.30 μM CIN. In *E. chamaecereus* aurea highest areolar activation was produced in a medium supplemented with BA 13.2 μM and NAA 5.35 μM , which produced 12.6 shoots per explant (12.6). In *G. mihanovichii* cv. Hibotan the treatments evaluated were only able to induce calli formation and proliferation under both photoperiod and dark conditions, however, the best treatment was CIN:2,4-D (8.8:4.5 μM). Micrografting *M. plumosa* and *E. chamaecereus* aurea on *H. undatus*, as alternative method of *in vitro* propagation, was better when a type C cut was used for the graft union and because achieved 90% of success after 90 d of culture for *E. chamaecereus* aurea and 60% for *M. plumosa*. We conclude that the protocol established for *M. plumosa* can produce in average 800 plantlets after 170 d of culture, which are histologically arised as adventitious shoots. In *E. chamaecereus* aurea, shoot production was on average 55 per explant after 120 d, which are histologically originated through areolar activation. In the micrografts, histological analysis allowed the observation of many normal vascular connections between the stock and the scions. For *G. mihanovichii* cv. Hibotan, which was able to regenerate solely calli, the histological analysis showed the presence only of fundamental tissue at 90 d of culture.

Keywords: cactus, micropropagation, indirect organogenesis, direct organogenesis, micrografts.

Dedicatoria

Con profundo amor y recuerdo para la mujer que siempre fomento en mi el deseo de superación, demostrando su inmenso amor y apoyo incondicional.

Quien estara siempre junto a mí.

Maria Feliz Román Medina[†]

Con amor y agradecimiento para quien siempre ha estado dispuesto a ayudarme con paciencia y animo en cada una de las cosas que realizo, incluso en la distancia

Humberto Flores Bustamante

A mi padre (Alfonso Téllez Zamora), hermanos (Israel, Gabriel, Hugo y Moisés) y a mis cuñadas (Margarita, Claudia, Estrella y Guadalupe) por apoyarme y estar siempre que los necesito y nunca olviden que ¡los logros de uno son los logros de todos!

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado y financiado para lograr la consolidación de mis estudios de postgrado.

Con especial cariño a la Dra. Ma. Cristina Gpe. López Peralta por todo lo que me ha brindado en este tiempo, ya que no encuentro palabras para agradecerle todo el cariño, las enseñanzas, consejos y apoyo moral en todas las situaciones que se me han presentado. Gracias por abrirme su casa y su corazón.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por todo el apoyo en la realización de esta investigación, su amabilidad y atención hacia mí.

Al Dr. Manuel Livera Muñoz por haberme invitado a participar en este maravilloso mundo de las cactáceas.

Dr. Andrés A. Estrada Luna por su inigualable ayuda y todo el tiempo invertido en la escritura y corrección de esta investigación.

Dr. Prometeo Sánchez García por haber participado como miembro de mi comité revisor y estar siempre pendiente de lo que se necesite.

Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas por haber aceptado participar como mi sinodal.

A los compañeros y amigos del laboratorio Don Juanito, Laura, Eleodoro, Monica y Claudia por compartir muchos momentos felices y de trabajo, por la convivencia y ayuda.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE APÉNDICES	xvi
INTRODUCCION GENERAL	1
1. Objetivos generales	3
2. Hipótesis generales	4
3. Revisión de literatura	6
3.1 Generalidades de cactáceas.....	6
3.2 Injertos	8
3.2.1 Microinjertos <i>in vitro</i>	11
3.3. Morfogénesis <i>in vitro</i>	12
3.3.1 Organogénesis	13
3.3.1.1 Organogénesis en Cactáceas	13
3.3.2 Embriogénesis somática.....	14
CAPITULO I. MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> DE <i>Mammillaria plumosa</i> W. .	16
RESUMEN	17
ABSTRACT	18
1.1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1.2.1 Material vegetal.....	24
1.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico.	24
1.2.2.1 Explantes.....	24
1.2.2.2 Medios de cultivo	25
1.2.2.3 Condiciones de incubación.....	26
1.2.2.4 Variables cuantificadas	26
1.2.3 Inducción de brotes.....	26
1.2.3.1 Variables cuantificadas	27
1.2.4 Multiplicación de brotes	27
1.2.4.1 Variables cuantificadas	28
1.2.5 Enraizamiento de brotes, transferencia, acondicionamiento y establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas.....	28
1.2.6 Análisis Histológico	29
1.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico	29
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
1.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico	31

1.3.2	Inducción de brotes.....	32
1.3.3	Multiplicación de brotes	36
1.3.4	Enraizamiento de brotes, transferencia, acondicionamiento y establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas	43
1.3.5	Análisis histológico.....	45
1.4.	CONCLUSIONES	47
1.5.	LITERATURA CITADA.....	49
1.6.	APÉNDICE.....	54
CAPITULO II. PRODUCCIÓN <i>in vitro</i> DE BROTES Y CALLOS DE <i>Echinopsis chamaecereus</i> Friedrich & Glaetzle <i>aurea</i>.....		58
RESUMEN		59
ABSTRACT		60
2.1.	INTRODUCCIÓN.....	61
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
2.2.1	Material vegetal.....	67
2.2.2	Establecimiento del cultivo aséptico	68
2.2.2.1	Explantos.....	68
2.2.2.2	Medio de cultivo básico	69
2.2.2.3	Condiciones de incubación.....	70
2.2.2.4	Variables cuantificadas	70
2.2.3	Inducción de brotes y callo	70
2.2.3.1	Variables cuantificadas	71
2.2.4	Multiplicación de brotes y callo	71
2.2.4.1	Variables cuantificadas	72
2.2.5	Análisis histológico.....	72
2.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico	73
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
2.3.1	Establecimiento del cultivo aséptico.	75
2.3.2	Inducción de brotes y callo	77
2.3.3	Multiplicación de brotes y callo	83
2.3.4	Análisis histológico.....	91
2.4.	CONCLUSIONES	93
2.5.	LITERATURA CITADA.....	94
2.6.	APÉNDICE.....	98
CAPITULO III. Histología de la microinjertación <i>in vitro</i> de <i>Echinopsis chamaecereus aurea</i> y <i>Mammillaria plumosa</i> Weber (injertos) sobre <i>Hylocereus undatus</i> (portainjerto).....		101

RESUMEN	102
ABSTRACT	103
3.1. INTRODUCCIÓN.....	104
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
3.2.1 Material vegetal.....	107
3.2.2 Selección y preparación de las plantas para la etapa de microinjertación.....	107
3.2.3 Microinjertación <i>in vitro</i>	109
3.2.3.1 Medio de cultivo.....	109
3.2.3.2 Condiciones de incubación.....	110
3.2.3.3 Tipos de corte de los microinjertos	110
3.2.3.4 Variables cuantificadas	111
3.2.4 Acondicionamiento y establecimiento <i>ex vitro</i> de microinjertos.....	111
3.2.5 Análisis Histológico	112
3.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	112
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
3.3.1 Microinjertos <i>in vitro</i>	114
3.3.1.1 Establecimiento del cultivo.....	114
3.3.2 Prendimiento del microinjerto y tipos de corte	114
3.3.3 Crecimiento del vástago injertado.....	121
3.3.4 Acondicionamiento y establecimiento <i>ex vitro</i> de microinjertos.....	122
3.3.5 Análisis histológico.....	124
3.4. CONCLUSIONES	127
3.5. LITERATURA CITADA.....	128
3.6. APÉNDICE	131
CAPITULO IV. Callogénesis en <i>Gymnocalycium mihanovichii</i> cv. Hibotan.....	134
RESUMEN	135
ABSTRACT	136
4.1. INTRODUCCIÓN.....	137
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	143
4.2.1 Material vegetal.....	143
4.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico	144
4.2.2.1 Tipo de Explante y desinfección del material	144
4.2.2.2 Medio de cultivo básico	145
4.2.2.3 Condiciones de incubación.....	146
4.2.2.4 Variables cuantificadas	146

4.2.3	Inducción de callos	146
4.2.3.1	Medio de cultivo	146
4.2.3.1	Variables cuantificadas	148
4.2.3.2	Condiciones de incubación.....	147
4.2.4	Proliferación de callos	148
4.2.4.1	Variables cuantificadas	148
4.2.5	Análisis Histológico	148
4.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico	149
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
4.3.1	Establecimiento del cultivo Aséptico	151
4.3.2	Inducción de callos	153
4.3.3	Proliferación de callos	156
4.3.4	Análisis anatómico.....	160
4.4.	CONCLUSIONES	161
4.5.	LITERATURA CITADA.....	162
4.6.	APÉNDICE.....	165
	CONCLUSIONES GENERALES	170

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber

Cuadro 1. 1. Clasificación botánica de <i>M. plumosa</i> Weber.....	20
Cuadro 1. 2. Tratamientos de desinfección para evaluar la contaminación del tubérculo con areola vegetativa de <i>M. plumosa</i>	25
Cuadro 1. 3. Relación de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962).	27
Cuadro 1. 4. Porcentaje de supervivencia, oscurecimiento y contaminación de <i>M. plumosa</i> p a los 10 d.....	32
Cuadro 1. 5. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) a los 30 d	33
Cuadro 1. 6. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) a los 60 d	37
Cuadro 1. 7. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) los 90 d	39
Cuadro 1. 8. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) a los 120 d	40
Cuadro 1. 9. Efecto de en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces a los 90 d después de la siembra <i>in vitro</i>	41
Cuadro 1. 10. Efecto en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces a los 120 d después de la siembra <i>in vitro</i>	42

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS DE *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea

Cuadro 2. 1. Clasificación botánica de <i>E. chamaecereus</i>	61
Cuadro 2. 2. Tratamientos de desinfección de <i>E. chamaecereus</i> aurea.	69
Cuadro 2. 3. Relación de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio básico de MS (1962).	71
Cuadro 2. 4. Porcentajes de supervivencia, oscurecimiento y contaminación de tallos con areolas de <i>E. chamaecereus</i> aurea a los 10 d.....	76
Cuadro 2. 5. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la inducción a los 30 d.....	79
Cuadro 2. 6. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) a los 60 d.....	83
Cuadro 2. 7. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) a los 90 d.....	84

Cuadro 2. 8. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) a los 120 d.....	86
--	----

CAPITULO IV. Callogénesis en *Gymnocalycium mihanovichii* cv.Hibotan

Cuadro 4. 1. Clasificación botánica de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan.....	139
Cuadro 4. 2. Tratamientos de desinfección para evaluar la contaminación de explantes de tallos con areolas de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan.	145
Cuadro 4. 3. Relación de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962).	147
Cuadro 4. 4. Porcentajes de supervivencia, contaminación y oscurecimiento de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan p a los 10 d.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber

Figura 1. 1. Planta de <i>M. plumosa</i> Weber.	20
Figura 1. 2. Explantes obtenidos de plantas de <i>M. plumosa</i>	26
Figura 1. 3. Esquema de las etapas de la regeneración <i>in vitro</i> de <i>M. plumosa</i> vía organogénesis directa e indirecta.	30
Figura 1. 4 Morfología de <i>M. plumosa</i> . A) Planta adulta; B) Areola usada como explante en los cultivos asépticos; C) Callo y brotes adventicios	35
Figura 1. 5 Organogénesis indirecta en callo de <i>M. plumosa</i> en 18.0 μM de 2,4-D y 9.30 μM CIN A) Estadio 1 inicial, callo verde.	46

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS DE *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea

Figura 2. 1. Injerto de <i>E. chamaecereus</i> aurea (injerto).	63
Figura 2. 2. Planta obtenida del germoplasma del Colegio de Postgraduados, <i>Campus Montecillo</i>	64
Figura 2. 3 Planta de <i>E. chamaecereus</i> aurea donadora de explantes.	67
Figura 2. 4. Explantes de <i>E. chamaecereus</i> aurea.	68
Figura 2. 5. Esquema de las etapas de la regeneración <i>in vitro</i> de <i>E. chamaecereus</i> aurea vía organogénesis directa e indirecta	74
Figura 2. 6 Explantes de <i>E. chamaecereus</i> aurea cultivados <i>in vitro</i> con múltiples areolas. A) Explante libre de contaminación	76
Figura 2. 7. Explantes con areolas de <i>E. chamaecereus</i> aurea. A) Explante con callo; B) Explante con brotes.	78
Figura 2. 8. Explantes de <i>E. chamaecereus</i> aurea sembrado en medio líquido MS (1962) a los 30 d.	82
Figura 2. 9. Multiplicación de brotes de <i>E. chamaecereus</i> aurea en medio MS (1962) suplementado con BA (13.2 μM) y ANA (16.05 μM).	85
Figura 2. 10. Multiplicación de brotes de <i>E. chamaecereus</i> aurea en el medio MS (1962)	88
Figura 2. 11. Brote de <i>E. chamaecereus</i> aurea con desarrollo de raíz a los 90 d después de la siembra <i>in vitro</i>	90
Figura 2. 12. Morfología y anatomía de los brotes y callos obtenidos de <i>E. chamaecereus</i> aurea.	92

CAPITULO III. Histología de la microinjertación *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus aurea* y *Mammillaria plumosa* Weber (injertos) sobre *Hylocereus sp.* (portainjerto).

Figura 3. 1. Brotes de <i>E. chamaecereus aurea</i> obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> . b:brotes; ar:areolas; ex: explante; cll:callos; es: espinas gl:gloquidios.	108
Figura 3. 2. Plántulas de <i>M. plumosa</i> obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> y seleccionadas para la injertación. ar:areolas.	108
Figura 3. 3. Plantas típicas de <i>H. undatus</i> obtenidas en cultivo <i>in vitro</i> . ar:areolas; r:raíces.	109
Figura 3. 4. Tipos de corte del patrón <i>H. undatus</i> para microinjertos <i>in vitro</i>	111
Figura 3. 5. Esquema de las tapas de micronjertación <i>in vitro</i> de <i>E. chamaecereus aurea</i> y <i>M. plumosa</i> Weber sobre <i>Hylocereus undatus</i>	113
Figura 3. 6. Microinjerto en corte tipo C, de <i>M. plumosa</i> sobre <i>Hylocereus undatus</i> a los 60 d.	116
Figura 3. 7. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre <i>H. undatus</i> con <i>E. chamaecereus</i> y <i>M. plumosa</i> a los 30 d de cultivo <i>in vitro</i>	117
Figura 3. 8. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre <i>H. undatus</i> con <i>E. chamaecereus</i> y <i>M. plumosa</i> a los 60 d de cultivo <i>in vitro</i>	118
Figura 3. 9. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre <i>H. undatus</i> con <i>E. chamaecereus</i> y <i>M. plumosa</i> a los 90 d de cultivo <i>in vitro</i>	118
Figura 3. 10. Microinjertos sobre <i>H. undatus</i> . A) <i>E. chamaecereus</i> (90 d); B) <i>M. plumosa</i> (90 d).	119
Figura 3. 11. Crecimiento de brotes de los microinjertos entre <i>H. undatus</i> con <i>E. chamaecereus</i> y <i>M. plumosa</i> a los 30, 60 y 90 d de cultivo <i>in vitro</i>	121
Figura 3. 12. Microinjertos. a) Panorámica del cultivo <i>in vitro</i> de microinjertos.	123
Figura 3. 13. Análisis histológico de Microinjertos.	126

CAPITULO IV. Callogénesis en *Gymnocalycium mihanovichii* cv. Hibotan

Figura 4. 1. Injerto de <i>G. mihanovichii</i> (injerto) sobre <i>Hylocereus undatus</i> sp. Briton & Rose (portainjerto)	138
Figura 4. 2. Plantas de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan donadoras de explantes.	143
Figura 4. 3. Segmentos de tallos con areolas de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan.	144
Figura 4. 4. Esquema de las etapas de la regeneración <i>in vitro</i> de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan vía organogénesis indirecta.	150
Figura 4. 5. Segmento de tallo con areolas de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan (Explante) libre de contaminación sembrado <i>in vitro</i>	151
Figura 4. 6. Efecto de evaluar su efecto en la inducción de callo en <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan a los 30 d.	153

Figura 4. 7. Explantes de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan que generaron callo con CIN: 2,4-D (8.8:4.5 μ M) a los 30 d d	155
Figura 4. 8. Explantes de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan con callo a los 90 d <i>in vitro</i> en la fase de proliferación	157
Figura 4. 9. Efecto de la inducción de callo en <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan a los 60 d de cultivo en fotoperiodo.	158
Figura 4. 10. Efecto de a inducción de callo en <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan a los 90 d de cultivo en fotoperiodo.....	159
Figura 4. 11. Análisis histológico de callo de <i>G. mihanovichii</i> cv. Hibotan cultivado <i>in vitro</i>	160

ÍNDICE DE APÉNDICES

CAPITULO I. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber

- 1. 1. A. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza en la tasa de supervivencia, contaminación y oscurecimiento.54
- 1. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la inducción de callo y brote areolar d a los 30 d54
- 1. 3. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos.....55
- 1. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la multiplicación de callo y brotes a los 90 d55
- 1. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la longitud de brotes a los 90 d.....56
- 1. 6. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de en la multiplicación de callo y brotes a los 120 d.56
- 1. 7. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de en la longitud de brotes a los 120 d57

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS DE *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea

- 2. 1. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia, oscurecimiento y contaminación *in vitro*).98
- 2. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la inducción de brotes areolares y callo a los 30 d).98
- 2. 3. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la formación de brotes por explante, longitud a los 60 d.99
- 2. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en formación de brotes por explante, longitud de explantes a los 90 d.99
- 2. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la formación de brotes por explante, longitud de explantes a los 120 d.100

CAPITULO III. Histología de la microinjertación *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus aurea* y *Mammillaria plumosa* Weber (injertos) sobre *Hylocereus* spp. (portainjerto).

- 3. 1. A. Porcentaje de prendimiento de microinjertos a los 30 d131
- 3. 2. A Porcentaje de prendimiento de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 60 d después de la siembra *in vitro*.....131

3. 3. A. Porcentaje de prendimiento de microinjertos entre <i>Hylocereus undatus</i> con <i>E. chamaecereus</i> y <i>M. plumosa</i> a los 90 d después de la siembra <i>in vitro</i>	132
3. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos durante 30 d de cultivo <i>in vitro</i>	132
3. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos a los 60 d de cultivo <i>in vitro</i>	133
3. 6. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos a los 90 d de cultivo <i>in vitro</i>	133

CAPITULO IV. Callogénesis en *Gymnocalycium mihanovichii* cv.Hibotan

4. 1. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia, contaminación y oscurecimiento.	165
4. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la inducción de callo a los 30 d	165
4. 3. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) a los 30 d	166
4. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza para evaluar su efecto en la proliferación de callo a los 60 d.....	167
4. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza en la proliferación de callo a los 90 d	167
4. 6. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) a los 60 d	168
4. 7. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) a los 90 d.	169

INTRODUCCION GENERAL

La familia Cactaceae, originaria del Continente Americano, agrupa cerca de 2,000 especies, las cuales se encuentran distribuidas, desde el norte de Canadá hasta la Patagonia, y desde el nivel del mar, hasta dunas costeras (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). En general son las plantas más representativas del paisaje mexicano, y algunos de sus principales atractivos son la belleza de sus formas, sus flores exóticas y, en muchos casos, los colores brillantes que presentan (Jiménez-Sierra, 2011).

De los países de América, México es el que mayor riqueza posee en cuanto a recursos genéticos con 913 taxones, de los cuales el 80% son endémicos (Arias *et al*, 1997). Debido a esto, en los ecosistemas áridos de México constituidos por los desiertos Sonorense, Chihuahuense, Queretano y Oaxaqueño, así como las Selvas Bajas Caducifolias y la zona de depresión del Balsas se puede apreciar un gran espectáculo debido a la diversidad de cactus que ahí crecen, aunque las regiones con mayor riqueza genética se encuentra en el la región central correspondiente al sur del desierto Chihuahuense, destacando el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la Barranca de Metztitlán, y el altiplano Potosino-Zacatecano (Jiménez-Sierra, 2011). A pesar de la posición privilegiada de México como centro de origen de muchas especies, en el ámbito del comercio internacional de estas especies vegetales muy poca es la contribución de los viveristas y propagadores nacionales, quienes lamentablemente no han sabido aprovechar esta situación para la conservación de los recursos naturales ni su explotación para la generación de recursos económicos.

La demanda de cactus se ha incrementando paulatinamente, especialmente de especies consideradas como raras, las cuales son comercializadas por coleccionistas nacionales e internacionales (CITES, 2002). Debido a esta demanda de especies ornamentales es necesario recurrir a

sistemas de propagación de cactáceas que puedan abastecer la demanda comercial asegurando su conservación y explotación sustentable.

Los métodos de propagación convencionales son adecuados pero ineficientes en la multiplicación de cactáceas debido a que son especies de lento crecimiento y producen escasos brotes (Quiala *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Un problema frecuente que se ha reportado en la reproducción asexual es la segregación y el largo estado juvenil, por lo que Hudstenberger *et al.* (1992) propusieron la propagación clonal mediante la regeneración de plantas por medio de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para satisfacer la demanda de plantas, tomando como principio la totipotencialidad y plasticidad de las células vegetales, manteniéndose bajo condiciones físicas y químicas controladas, para dar origen a nuevas plantas en menos tiempo (Malda-Barrera y García-Rubio, 2009, Quiala, *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista científico y con el análisis de la información reportada durante varios años, se puede señalar que no existe un protocolo general para la propagación de cactáceas, ya que la mayoría de las respuestas de una planta al cultivo de tejidos *in vitro* son dependientes del genotipo. Con base en el efecto específico de hormonas, su combinación y el empleo de diferentes concentraciones; se puede controlar la producción de plantas a través de los fenómenos de embriogénesis somática (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Al-Ramamneh *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006) y organogénesis (Pelah *et al.*, 2002; Santos-Díaz *et al.*, 2005; Wyka *et al.*, 2006; Ramirez-Malagon *et al.*, 2007; Rubalcava-Ruiz *et al.*, 2010; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Han sido una solución real a la problemática de las cactáceas, ya que los protocolos establecidos han permitido multiplicar y establecer bancos de germoplasma para explotar y conservar especies de importancia económica o en vías de extinción.

Mammillaria plumosa Weber, *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle “aurea” y *Gymnocalidium mihanovichii* cv. Hibotan, son cactus considerados raros y con alto valor en el mercado como especies ornamentales de gran belleza, que presentan características atractivas como espinas radiales modificadas en *M. plumosa*, las cuales le dan la apariencia de estar cubierta por nieve o lana. De la misma manera, los colores brillantes (amarillo y rojo) que presentan los mutantes *E. chamaecereus* aurea y *G. mihanovichii* cv. Hibotan, los hacen muy llamativos. En particular, los mutantes cromáticos caracterizados por su ausencia de clorofila a, son difíciles de cultivar en sus propias raíces y presentan gran sensibilidad a la humedad, además expresan crecimiento lento y difícil floración. De estos genotipos no se han reportado trabajos de micropropagación *in vitro* que mejoren características fisiológicas importantes como: el tamaño de la planta, colores, nutrición e injertos, de manera que éstas crezcan más rápidamente en menor tiempo.

En la injertación *in vitro* o microinjertación tanto el patrón como el vástago son producidos asépticamente y por consiguiente de tamaño pequeño, siendo que esta técnica cuenta con muchos beneficios en la producción de plantas, ya que es factible obtener crecimiento rápido del injerto, formación de numerosos brotes de la planta injertada y combinaciones específicas entre genotipos (Estrada *et al.*, 2002), y esto ayuda a incrementar su potencial como plantas de ornato.

Con base en lo antes expuesto los objetivos generales e hipótesis del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Objetivos generales

1.- Estudiar la propagación *in vitro* vía organogénesis de *M. plumosa* a partir de la brotación directa de aréolas provenientes de plantas juveniles.

2.- Investigar si el mutante cromático (aclorofílico) *E. chamaecereus aurea* que se identificó en el germoplasma del Colegio de Postgraduados puede crecer, cultivarse y propagarse artificialmente mediante el uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* sin la interacción con un patrón en un injerto, así como establecer las condiciones específicas de propagación para inducir el desarrollo de brotes y callos *in vitro*.

3.- Multiplicar material *in vitro* vía microinjertos de *E. chamaecereus aurea* (aclorofílica, cromática) y *M. plumosa*, cactáceas de crecimiento lento y escaso sistema radical, sobre patrones selectos de *Hylocereus undatus* obtenidos *in vitro*.

4.- Inducir la organogénesis indirecta *in vitro* de *G. mihanovichii* cv. Hibotan.

5.- Estudiar la organogénesis de los brotes a partir de callo en las tres especies mediante el análisis anatómico y evaluar histológicamente el prendimiento de los microinjertos de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* sobre *Hylocereus undatus*.

2. Hipótesis generales

1.- La respuesta morfogénica de *M. plumosa* está regulada por diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D: ácido diclorofenociacético) y citocininas (CIN: cinetina) como sucede con otras especies de cactáceas.

2.- *E. chamaecereus aurea* puede crecer y multiplicarse bajo condiciones *in vitro*, ya que en el medio de cultivo se incluyen los nutrimentos y compuestos orgánicos requeridos para asegurar su nutrición heteróloga y sus respuestas morfogénicas (callo o brotes) *in vitro* son afectadas por la

consistencia física del medio de cultivo y la concentración y combinación específica de 6-benciladenina y ácido α -naftalenacético.

3.- El desarrollo de microinjertos de cactus durante el cultivo *in vitro*, varían en función de la especie injertada y el portainjerto.

4.- La respuesta morfogénica (organogénesis indirecta) de *G. mihanovichii* cv. Hibotan varía en función del tipo y concentración hormonal adicionada al medio de cultivo *in vitro* y depende de las condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

5.- El estudio histológico de los brotes y callos de *M. plumosa*, *E. chamaecereus aurea* y *G. mihanovichii* cv. Hibotan; permitirá reconocer el origen de los brotes y callos, así como el éxito del prendimiento de los microinjertos de *M. plumosa*, *E. chamaecereus aurea* sobre *Hylocereus undatus*.

3. Revisión de literatura

3.1 Generalidades de cactáceas

El continente Americano es uno de los centros de origen y distribución de un importante grupo vegetal: la familia Cactaceae (Jiménez-Sierra, 2011). Bravo-Hollis y Scheinvar (1999), señalan que existen más de 2,000 especies originarias de América, las cuales se distribuyen desde Canadá hasta la Patagonia en Argentina. Alrededor de 55 géneros y 850 especies se encuentran en territorio mexicano (Mandujano *et al.*, 2002).

México es el centro más importante del mundo en concentración de cactáceas. Se reconoce la existencia de 913 taxones, conformando 669 especies, las cuales se encuentran agrupadas en 63 géneros y 244 subespecies. El estado de San Luis Potosí es el que posee una mayor diversidad, con un registro de 151 especies; seguido de los estados de Coahuila con 126 especies y Nuevo León y Oaxaca con 118 especies cada uno. San Luis Potosí también es el estado con mayor riqueza de géneros (33), seguido por Oaxaca (32) y Tamaulipas (31) (Guzmán *et al.*, 2003).

Por regiones geográficas, la más alta diversidad se localiza en el valle de Tehuacán–Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), seguida por la Barranca de Metztitlán y la depresión del Balsas, y no solo albergan sino que son centro de distribución de un elevado número de especies, ya que sus regiones áridas y semiáridas, por haber estado aisladas climática y geográficamente del resto del país, han sido escenario de procesos evolutivos que han dado origen a un rico repertorio de miembros de esta interesante familia. La importancia biológica y fitogeográfica de estas regiones radica en que una proporción significativa de las especies de cactáceas que viven dentro de sus límites son endémicas (no existen en ninguna otra región del planeta) (Jiménez Sierra, 2011).

Las cactáceas son plantas perennes, suculentas; por lo general espinosas, terrestres o rupícolas, geófitas, rastreras, arbustivas, arborescentes o epífitas. Su epidermis es glabra o pubescente. Desarrollan raíces fibrosas o tuberosas. El tallo puede ser globoso, cilíndrico, columnar o aplanado, con tubérculos o mamilas dispuestas en series espiraladas, cuyo número es más o menos constante para cada especie; otras veces con tubérculos coalescentes que forman costillas, alas, o son aplanados y verdes (filocladodios). Las hojas son laminares en los géneros considerados más primitivos y efímeras o ausentes en los demás géneros. Las aréolas con meristemos vegetativos y reproductores, equivalentes a las yemas axilares, con lana, fieltro, cerdas, pelos, espinas, glóquidios, glándulas y pueden producir ramas o flores (Scheinvar, 2004).

Las flores son zoófilas, generalmente sésiles, solitarias y raramente agrupadas en inflorescencias, en panículas o cimosas (*Pereskia*) o terminales (*Pterocactus*); son hermafroditas aunque raras veces unisexuales, casi siempre actinomorfas con betalainas. El pericarpelo, tejido del tallo ubicado alrededor del ovario o tubo receptacular que puede estar presente o ausente, es glabro o recubierto de aréolas dispuestas en series espiraladas sobre nodarios más o menos marcados. Normalmente están provistos de escamas basales que en la parte superior se integran con los segmentos exteriores del perianto y a veces presentan lana, glóquidios, cerdas y espinas. El perianto está constituido de segmentos exteriores e interiores petaloides (tépalos), dispuestos en series espiraladas, por lo general numerosos. Se ha encontrado ovario súpero sólo en *Pereskia aculeata*, pero en la mayoría éste es ínfero o semi-ínfero, con 3 a 20 carpelos uniloculares. Las flores poseen estilo único y el estigma desarrolla numerosos lóbulos que van de 3 a 20 dependiendo de la especie. Los óvulos se caracterizan por sus largos funículos, a veces concrecentes en fascículos (Scheinvar, 2004).

El fruto puede ser carnosos, semiseco o seco, indehisciente o dehiscente, a veces glabro o con aréolas provistas de escamas, pelos, espinas o cerdas; la

suculencia está dada por los funículos que acumulan azúcares durante la maduración. Las semillas diferencian perisperma como sistema de almacenamiento de reserva del embrión y rara vez se observan restos del endosperma; su testa es delgada o gruesa, con o sin arilo que se originan en el funículo. Los cotiledones son foliáceos en los géneros más primitivos y reducidos o vestigiales en la mayoría de las especies (Scheinvar, 2004).

En México, las cactáceas son plantas endémicas que desempeñan un papel importante desde el punto de vista biológico, social y económico, y han sido un blanco de intenso saqueo tanto de plántulas como de plantas adultas y de las semillas con el fin de satisfacer el mercado internacional, especialmente en Estados Unidos, Japón y varios países europeos (CITES, 2002). Durante los últimos años, la demanda de cactus se ha ido incrementando paulatinamente, especialmente de especies consideradas como raras, las cuales son comercializadas por coleccionistas nacionales e internacionales y realizan extracciones en los sitios nativos sometiendo a una gran presión a las poblaciones silvestres, ya que requieren satisfacer el mercado ornamental. Esto ha provocado una red de comercio ilegal que ha afectado en forma determinante las poblaciones naturales y ha colocado a muchas especies en situación de riesgo (Barcenás, 2003) por lo que es necesario proteger sobre todo las especies más codiciadas y sobreexplotadas. También se requiere de investigación científica y la generación de datos experimentales para profundizar en el conocimiento de su ecología, fisiología, formas de conservación sustentable y el establecimiento de las bases del conocimiento de su reproducción sexual y vegetativa.

3.2 Injertos

Existe o se practica injerto cuando tejidos vegetales de un individuo se colocan natural o artificialmente en contacto con los de otro o con los de él mismo, soldándose mutuamente y formando una sola unidad biológica desde el

punto de vista estructural y fisiológico, pero reteniendo cada uno su patrimonio genético. En esta definición quedan contemplados tanto el injerto como práctica de propagación así como el injerto natural que existe no sólo entre ramas sino también entre raíces. Es de destacar también que una planta injertada es una unidad biológica diferente con características fisiológicas propias que le otorgan un fenotipo particular pero sin cambiar su base genética.

El injerto es una práctica muy antigua y se hizo en forma empírica mucho antes de conocer la anatomía y el proceso de unión de los tejidos de una planta, hay referencias que los Chinos lo utilizaban desde 1000 A.C, así también los Griegos y los Romanos, mas tarde en el Renacimiento adquirió importancia para la multiplicación de variedades selectas de frutales y plantas ornamentales para los jardines de Europa. Una planta injertada consta de dos partes, cada una con un genotipo distinto, una forma el sistema radicular, el cuello y una pequeña porción del tronco y se denomina patrón o portainjerto y el resto de la parte superior se llama púa, cultivar o injerto (Flores-Pérez, 2009).

Entre los usos y ventajas que tiene el injerto se pueden citar los siguientes:

1. Propagar clones: Este es el uso principal de esta técnica, es factible decir que es fundamental para especies que no es fácil la utilización de otros métodos de propagación vegetativa.

2. Mejorar el sistema radicular: En muchas ocasiones se ha citado que el sistema radicular de una planta de semilla es mejor que el de una planta de multiplicación vegetativa, debido fundamentalmente a un mejor anclaje.

3. Aprovechar los beneficios de determinados portainjertos: Esta también es una razón principal debido a la gran posibilidad de mejorar el sistema radicular

y los cultivares, además de las influencias que ejercen uno sobre el otro. Entre las ventajas están las siguientes: a) Modificar el vigor de un cultivar: La reducción de vigor puede ir acompañada de otros beneficios como anticipar la entrada en producción, mejorar la calidad de fruta y anticipar la maduración. b) Resistencia a plagas y enfermedades. c) Adaptación a suelos.

4. Cambiar especies o cultivares: Existen muchas razones para cambiar un cultivar, entre ellas se puede citar: a) Económicas: Por caída de la demanda debida a cambios en los hábitos de consumo o por la aparición de nuevos cultivares más productivos o de mejor calidad y comercialización. b) Sanitarias: Por la aparición de nuevas plagas y enfermedades, teniendo la posibilidad de cambiar por cultivares resistentes o tolerantes. c) Mejorar la polinización.

5. Combinar especies o cultivares: Es factible para pequeños huertos o jardines producir plantas con varios cultivares de una especie o aún cultivares de distintas especies como por ejemplo de los géneros Citrus o Prunus.

6. Provocar monoicismo en plantas dioicas: En especies donde los sexos se dan en plantas separadas como el Pistacho, se puede producir una planta monoica por medio del injerto de una rama macho.

7. Acelerar el desarrollo: Aquí habría que separar tres efectos. El injerto comparte con las otras formas de propagación vegetativa el hecho de que se está multiplicando una porción adulta de la planta, pero además puede haber un efecto del portainjerto como se ha mencionado y algunos autores han citado (Casierra-Posada y Guzmán, 2009) que el injerto de por sí disminuye el período juvenil de una planta.

8. Reparar partes dañadas de una planta: Es factible reconstruir la corteza dañada mediante la colocación de púas con un injerto denominado puente que corresponde a un doble injerto de aproximación terminal.

9. Hacer pruebas de virus: Una desventaja de la multiplicación asexual es aquí usada en beneficio ya que se pueden transmitir fácilmente virus a plantas indicadoras para detectar que está actuando.

10. Poblar de vegetación a una planta: Mediante el injerto se puede hacer brotar ramas en lugares que naturalmente no ocurriría por no presentar yemas adventicias.

11. Colocar tirantes o refuerzos: A través de un doble injerto de aproximación es posible colocar un trozo de madera que conecte dos ramas para evitar que se abran.

12. Hacer injertos intermediarios: Con el establecimiento de dos uniones de injerto se tiene la posibilidad de contar con una combinación.

3.2.1 Microinjertos *in vitro*

Se refiere a la colocación del injerto y el portainjerto bajo condiciones asépticas en un frasco conteniendo medio de cultivo para que se conecten y se desarrolle como una planta completa.

La técnica de microinjertación o injertación *in vitro* es una variante de la injertación convencional donde el injerto y el portainjerto son pequeños (5-10 mm) (Estrada *et al.*, 2002).

Pocos han sido los estudios enfocados a la microinjertación *in vitro* de cactáceas cromáticas (aclorofilicas) (*Gymnocalycium mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* y *Parodia scopa* etc.), siendo que esta técnica ofrece una alternativa para su propagación y ofrece la ventaja de que se pueden comercializar las plantas con un valor agregado como ornamentales, dentro de un frasco con el medio que va a proporcionarle lo necesario y puedan vivir cerca de una año

3.3. Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis *in vitro* puede definirse como la génesis o iniciación de la forma y función de organismos vivos. Su estudio tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta. Tomando como base tres aspectos fundamentales: se define como el desarrollo biológico junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular (Pierick, 1990; Taiz y Zaiger, 2006).

La morfogénesis depende de la capacidad de las células somáticas, particularmente de las de tejido parenquimatoso para regenerar una planta completa. Dichas células son totipotentes y son las más abundantes en las primeras etapas de crecimiento en las plantas, por lo que el cultivo *in vitro* de tejidos jóvenes presenta mayores posibilidades de regeneración. La morfogénesis *in vitro* se lleva a cabo mediante la utilización de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, en el cual el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de las plantas se efectúa bajo condiciones controladas de asepsia, en un medio de cultivo artificial y adecuado, con el balance de hormonas y otros suplementos orgánicos e inorgánicos así como un estricto control de los factores ambientales (luz y temperatura) que inciden en la generación del óptimo desarrollo, a fin de lograr las respuestas morfogénicas requeridas a partir de un explante adecuado. La morfogénesis *in vitro* puede seguir dos rutas distintas: a. La organogénesis que representa la diferenciación de meristemo caulinar y radicular y b. La embriogénesis somática, con la formación de embriones somáticos que siguen cambios estructurales y organizacionales semejantes a los que ocurre en el cigoto (Laux y Jürgens, 1997).

3.3.1 Organogénesis

La organogénesis o diferenciación de brotes adventicios, es un proceso mediante el cual ocurre la formación de estructuras adventicias a partir de tejido ya diferenciado no meristemático el cual lleva implícito un proceso de desdiferenciación y diferenciación celular. Esta formación de órganos de *novo* puede ocurrir directamente a partir del explante (organogénesis directa) o bien indirectamente a partir de la formación de callos (organogénesis indirecta). Una amplia aplicación de esta estrategia consiste en la obtención de plantas libres de virus através del aislamiento de estructuras meristemáticas y su activación; además de la producción de plantas sin variación genética alguna (clonación).

3.3.1.1 Organogénesis en Cactáceas

En cactáceas la organogénesis indirecta se ha derivado de hipocotilos tomados de plántulas germinadas *in vitro*, brotes, tallo y yemas vegetativas, en las que se ha inducido la formación de callo y, posteriormente, brotes adventicios.

A pesar de que se han utilizado varios medios de cultivo, Ludwig *et al* (1992) menciona que el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) es el más utilizado, y ha servido como modelo para estudiar la formación de callo organogénico, aunque también se han establecido *in vitro* especies en medios como el B5 (Gamborg *et al.* 1968), Nitsch (Nitsch, 1969), N6 (Chu *et al.* 1975) y White (White, 1963), entre otros más.

Ludwig *et al* (1992), mencionaron que la multiplicación de brotes a partir de yemas puede darse utilizando explantes con mamilas o areolas obtenidos de plantas de campo o generadas *in vitro*. La brotación de yemas axilares se da mediante la activación de areolas o mamilas; ambos son centros meristemáticos que presentan diferentes grados de letargo, pero tienen la capacidad de desarrollar uno o más brotes idénticos a la planta que les dio

origen, debido a que contienen meristemos preexistentes, que al activarse rompen el letargo de las yemas laterales haciendo que éstas se alarguen. Este efecto es inducido por la acción de auxinas y citocininas que orientan la emergencia de un brote.

Martínez-Vázquez, y Rublo en 1989 utilizaron diferentes explantes en la activación de areolas; tomaron explantes de la parte basal media y apical de plántulas germinadas *in vitro* de *Mammillaria*, encontrando a los cuatro meses de incubación una mejor respuesta con los explantes tomados de la parte media explicado por el cambio del balance hormonal y en los demás explantes se obtuvo callo. Santos-Díaz *et al.* (2006) describieron para *Ariocarpus kotschoubeyanus*, que sembrando en medio MS con 2 mg L⁻¹ de zeatina y agua de coco en condiciones de oscuridad, los explantes generaron callo y después de 84 días formaron brotes. En recientes estudios, Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) lograron la regeneración vía organogénesis indirecta de brotes en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. “Blanco sin espinas”, donde el mejor tratamiento para la inducción de callos fue la combinación de 2,4-D y BA (2.26 y 2.21 µM respectivamente) y formaron nuevos brotes en medio basal MS con 0.5 µM BA.

A pesar de que se han desarrollado trabajos con diferentes géneros existen deficiencias de información en cuanto a la capacidad de multiplicación y ha sido difícil determinar la factibilidad del cultivo de yemas axilares como vía de regeneración, en lo que sí se coincide es que esta forma de proliferación de brotes axilares y apicales es una forma eficiente de propagación en cactáceas ya que se reduce la variabilidad genética.

3.3.2 Embriogénesis somática

Se refiere al proceso de diferenciación y desarrollo de embriones a partir de células somáticas, los embriones generados tienen las mismas

características básicas que presenta un embrión cigótico pero la diferencia fundamental es que no tienen su origen en la fusión de gametos por lo cual se espera que tengan la misma información genética de la planta de donde fue tomado el explante (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

En cactáceas la respuesta morfogénica se da entre 8 y 10 semanas, sin embargo, la respuesta esta fuertemente influenciada por el tipo y concentración hormonal (Al-Ramamneh *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006).

**CAPITULO I. MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Mammillaria*
plumosa Weber**

CAPITULO I. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber

RESUMEN

Mammillaria plumosa es un cactus mexicano apreciado como ornamental por su extraña y bella morfología, ya que desarrolla espinas radiales modificadas que le dan la apariencia de estar cubierto por nieve o lana. Esta especie esta clasificada como en peligro de extinción. Ante esta situación, se planteó el presente trabajo con el propósito de estudiar el efecto de fitohormonas para controlar las respuestas morfogénicas y con ello establecer las bases de un sistema de micropropagación. Inicialmente, se sembraron segmentos de tallos con areolas vegetativas en medio de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con combinaciones de auxinas y citocininas [2,4-D (0, 9.0, 13.5 y 18.0 μM) y CIN (0, 4.65, 9.30 y 13.95 μM)]. Los subcultivos de proliferación se realizaron en los mismos cultivos empleados para la inducción. Finalmente, los brotes obtenidos se enraizaron y las plántulas regeneradas se trasplantaron para evaluar su supervivencia. Las respuestas iniciales incluyeron la diferenciación de callos, la activación de las yemas axilares de la areola que resultó en el desarrollo de brotes y la producción de raíces. Todos los tratamientos evaluados indujeron la producción de callo pero la mejor activación areolar se produjo al usar 2,4-D (18.0 $\mu\text{M L}^{-1}$) y CIN (13.95 $\mu\text{M L}^{-1}$). Durante la etapa de multiplicación, los callos crecieron activamente y mediante análisis histológico se observó que la diferenciación de brotes se produjo a partir de activación areolar y la diferenciación de brotes adventicios de *novo*. Las plántulas obtenidas a partir del enraizamiento espontáneo de brotes se trasplantaron y aclimataron logrando el 85% de supervivencia. Se concluye que durante la micropropagación de *M. plumosa* se pueden generar en promedio 800 plántulas en 170 d de cultivo, los cuales podrían ser reintroducidos a su hábitat, o bien, para su comercialización.

Palabras clave: *Mammillaria plumosa*, cactácea, micropropagación, organogénesis indirecta, Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Cinetina (CIN).

ABSTRACT

Mammillaria plumosa is a mexican cactus appreciated as ornamental by virtue of its strange and spectacular morphology as it produces modified radial spines that provide the appearance of being covered by snow or wool. Unfortunately, it has being classified as endangered plant species. Due to this critical situation, we carry out this research with the purpose of studing the effects of varies phytohormones to control the morphogenic responses to establish the basis of an efficient micropropagation system. Initially, stem sections including areoles were cultured in a Murashige and Skoog (MS) (1962) medium, which was supplemented with several combinations of auxins and cytokinins [2,4-D (0, 9.0, 13.5 and 18.0 μM) and CIN (0, 4.65, 9.30 and 13.95 μM)]. The proliferation sub-cultures were performed by using the same treatments for the induction stage. The shoots obtained during the process were rooted and the plants transferred and evaluated for survival. The morphogenic responses observed during culture initiation included calli differentiation, areole activation that resulted in shoot development, and root production. All experimental treatments tested induced calli differentiation but the areole activation was only produced by some treatments, however, the combination 2, 4-D (18.0 $\mu\text{M L}^{-1}$) and CIN (13.95 $\mu\text{M L}^{-1}$) was considered the best. During the multiplication stage, the caulogenic structures showed a very active growth and shoot differentiation was produced through areole activation and differentiation of adventitious shoots, whose origin was confirmed by histological analysis. The plantlets obtained by spontaneous rooting achieved 85% of survivance after acclimatization. We conclude that during micropropagation of *M. plumosa* an average of 800 plants can be produced in about 170 d of culture, which could be reintroduced to natural habitats or for commercial purposes.

Key words: *Mammillaria plumosa*, Cactaceae, micropropagation, indirect organogenesis, 2,4-Diclorofenoxiacetic acid (2,4-D), Kinetin (CIN).

1.1. INTRODUCCIÓN

Mammillaria plumosa Weber es una cactácea nativa del Norte de México, que tiene tallo cespitoso y esférico verde claro de 6-7 cm de altura y diámetro, tubérculos dispuestos irregularmente en 8-13 series, espiralados, cilíndricos, de 12 mm de altura y 2-3 mm de espesor en la base, de consistencia suave con jugo acuoso. *Mammillaria* es uno de los géneros de cactus más grandes de la familia Cactaceae, contiene más de 350 especies y variedades reconocidas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Su especie fue descrita por vez primera por Linnaeus como *Cactus mammillaris* en 1753, nombre derivado del latín *mammilla*=tubérculo, en alusión a los tubérculos que son una de las características del género. La mayoría son nativas de México (Butterworth y Wallace 2004). La característica distintiva del género es el desarrollo de la areola, que está dividida en dos partes claramente separadas, una en el ápice y otra en la base o axila. La parte axilar no es espinosa y es la parte de la areola que produce las flores y frutos y es el punto de ramificación (areola reproductiva). La parte apical presenta a las areolas vegetativas circulares con espinas radiales modificadas en forma de pluma de color blanco, sin espinas centrales que en ciertas condiciones puede funcionar también como punto de ramificación, aunque sin producir flores. Las flores son blancas, amarillas-blanquecinas de hasta 14 mm de largo (Figura 1.1, Cuadro 1.1) (Nobel, 2002; Wallace y Gibson, 2002). Las areolas vegetativas plumosas le dan una apariencia algodonosa que simula estar cubierta por nieve, lo que la hace atractiva y otorga un alto valor comercial (Arias *et al.*, 2005).



Figura 1. 1. Planta de *M. plumosa* Weber.

Cuadro 1. 1. Clasificación botánica de *M. plumosa* Weber.

Reino. *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden. *Caryophyllales*

Familia: *Cactaceae*

Subfamilia: *Cactoideae*

Tribu: *Trichocereae*

Genero: *Mammillaria* Haw

Especie: *M. plumosa*

Fuente: International Plant Names Index (2011)

La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010), cuyo objetivo es identificar las especies o poblaciones de vida silvestre en peligro en México, clasifica a *M. plumosa* dentro de la categoría de especies amenazadas, es decir, que podría estar en peligro de desaparecer en un corto o mediano plazo. Esta categorización implica que si diversos factores naturales (bajas tasas de germinación y sobrevivencia de plántulas, incompatibilidad y producción

reducida de brotes) así como el impacto negativo de ciertas actividades antropogénicas (apertura de tierras a la agricultura, la degradación y contaminación de suelos y hábitats naturales, la sobre colección de semillas y plantas) continúan actuando, el deterioro ecológico sería irreversible y como consecuencia se pueden perder las poblaciones nativas. Para lograr el rescate y conservación de estos recursos naturales, así como su explotación comercial sustentable, es necesario estudiar la biología de su reproducción para con ello establecer técnicas más eficientes y exitosas de propagación que permitan la producción masiva de plantas, las cuales podrían ser re-introducidas o vendidas a viveristas autorizados para su comercialización y con ello evitar la recolección clandestina.

Los métodos de propagación convencionales son adecuados pero ineficientes en la multiplicación de cactáceas debido a que son plantas de lento crecimiento, escasa producción de brotes (Quiala *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Un problema frecuente que se ha reportado en la reproducción asexual, es la segregación y el largo estado juvenil, por lo que Hudstenberger *et al.* (1992) propusieron la propagación clonal mediante la regeneración de plantas por medio de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para satisfacer la demanda de plantas, haciendo que el peligro de extinción de las que ahora se encuentran catalogadas como amenazadas, sea injustificable. Con base en la información disponible, se estima que dichas técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* han permitido el mejoramiento de alrededor de 600 cultivares y 40 especies ornamentales de cactáceas (Balén *et al.*, 2002; Gusti *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Davila-Figueroa, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Davila-Figueroa *et al.*, 2005; García-Saucedo *et al.*, 2005; Ramírez- Santos-Díaz *et al.*, 2005; Aíra de Madeiros *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2006; Ezz *et al.*, 2006; Wyka *et al.*, 2006; Malagon *et al.*, 2007; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010; Shedbalkar *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* puede ser eficiente para especies útiles y de importancia económica y sus ventajas dependen de varios factores tales como: el mercado, potencial de la especie que se desea propagar, la condición fitosanitaria y su fisiología, considerando que el proceso de propagación *in vitro* se lleva a cabo a partir del empleo de órganos o fracciones de tejido (explante) sin depender necesariamente de la disponibilidad de semillas (Mauseth 1979; Pérez *et al.*, 1999; Giusti *et al.*, 2002). El desarrollo de las plantas se debe llevar a cabo bajo condiciones de asepsia, con un tamaño y tipo de tejido determinado, constituyentes básicos en el medio de cultivo y condiciones de incubación óptimas, para que la interacción entre estos factores químicos y físicos promuevan la generación del óptimo desarrollo (crecimiento y diferenciación) de la morfogénesis celular de los explantes.

Para establecer un sistema de propagación *in vitro* en cactáceas se han empleado diversos tejidos, órganos o explantes, los cuales dependiendo del género y la especie, pueden ser brotes terminales de plántulas (Mohamed-Yasseen, 2002; Gómez-Juárez *et al.*, 2006), secciones laterales o verticales de cladodios (Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Estrada-Luna *et al.*, 2002); areola simple (Perez-Molphe-Balch y Davila-Figueroa, 2002; Quiala *et al.*, 2009); semillas (Choreño-Tapia *et al.*, 2002; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Aíra de Madeiros *et al.*, 2006) y brotes florales (Wyka *et al.*, 2006), entre otros, los cuales son sometidos al efecto de diferentes hormonas, como auxinas, citocininas y giberelinas, mismas que son requeridas para inducir las respuestas morfogénicas deseadas.

Desde el punto de vista científico y con el análisis de la información reportada durante varios años, se puede concluir que no existe un protocolo general para la propagación de cactáceas, ya que la mayoría de las respuestas de una planta al cultivo de tejidos *in vitro*, son dependientes de la especie y el genotipo. Con base en el efecto específico de dos hormonas (auxinas y citocininas), su combinación y el empleo de diferentes concentraciones; se

puede controlar la producción de plantas a través de los fenómenos de embriogénesis somática (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Al-Ramamneh *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006) y organogénesis (Pelah *et al.*, 2002; Santos-Díaz *et al.*, 2005; Wyka *et al.*, 2006; Ramirez-Malagon *et al.*, 2007; Rubalcava-Ruiz *et al.*, 2010; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Por lo que, el objetivo principal de esta investigación fue establecer un proceso de propagación *in vitro* de *M. plumosa* vía organogénesis a partir de la brotación directa de tubérculos con areola provenientes de plantas juveniles, para conservarla y propagarla intensivamente, por su valor ecológico y gran potencial de mercado. Los objetivos específicos fueron: 1. Evaluar el efecto de la combinación de las hormonas 2, 4-D (auxina; 2,4-D: ácido diclorofenociacético) y CIN (citocinina; cinetina,) en diferentes concentraciones para promover la inducción y multiplicación areolar; 2. Incrementar el potencial de propagación de esta especie a través de subcultivos de brotes; 3. Regenerar plantas completas para el trasplante a condiciones de invernadero y 4. Identificar el origen de los brotes generados mediante un estudio histológico.

Las hipótesis de la investigación fueron: 1. La respuesta morfogénica de *M. plumosa* está regulada por la proporción de auxina (2,4-D) y citocinina (CIN) como sucede con otras especies de cactáceas; 2. El estudio histológico permite reconocer el origen celular de los brotes de *M. plumosa*.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética y en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, México.

1.2.1 Material vegetal

Como material biológico experimental se usaron plantas proporcionadas por el Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados.

1.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico.

1.2.2.1 Explantes

Plantas madres provenientes de vivero sanas, vigorosas y jóvenes se lavaron con detergente y agua corriente por 25 min para eliminar algunos contaminantes superficiales. Posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado (PYREX®) de 250 mL con 150 mL agua destilada.

Posteriormente se probaron nueve tratamientos de desinfección conformados por diferentes desinfectantes y tiempos de aplicación (Cuadro 1.2).

Cuadro 1. 2. Tratamientos de desinfección para evaluar la contaminación del tubérculo con areola vegetativa de *M. plumosa*.

Tratamientos (núm.)	Desinfectantes	Tiempos (min.)
1	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	20
2	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	30
3	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	35
4	Cloralex® 30% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
5	Cloralex® 35% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
6	Cloralex® 40% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
7	Alcohol al 70%	3
8	Alcohol al 70%	5
9	Alcohol al 70%	10

Bajo condiciones asépticas (campana de flujo laminar horizontal, VECO®) se retiró el agua destilada y se lavaron con agua destilada estéril. Después se sometieron los diferentes desinfectantes.

Durante el tiempo de desinfección, se agitó constantemente el recipiente que contenía los explantes para favorecer el contacto con el tejido. Al finalizar cada tratamiento, se enjuagó el explante con agua destilada estéril y en el primer enjuague, los explantes estuvieron sumergidos durante 10 min.

1.2.2.2 Medios de cultivo

Los explantes se cortaron (Figura 1.2) y se colocaron en medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), agar (0.6%, p/v; Merck®). Se ajustó el pH con un potenciómetro (Orión® modelo 611) a 5.7± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N. Se sirvieron 10 mL en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. La esterilización del medio de cultivo se hizo en autoclave vertical (AESAS®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² presión durante 20 min.

Los explantes libres de contaminantes se disecaron en segmentos de 5-8 mm de longitud de tubérculo con areola (Figura 1.2), colocando un explante en cada frasco con 30 repeticiones por tratamiento.

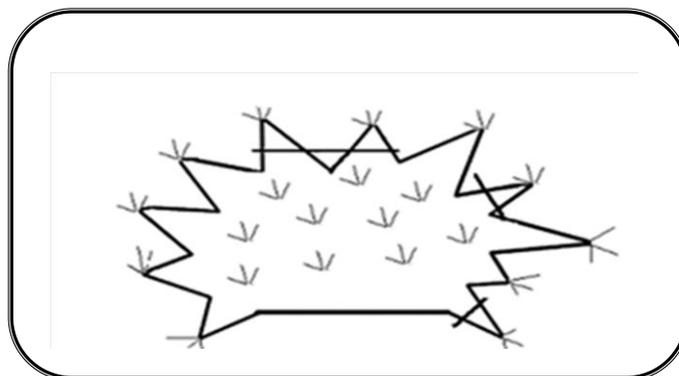


Figura 1. 2. Explantes obtenidos de plantas de *M. plumosa*.

1.2.2.3 Condiciones de incubación

Los frascos con un explante fueron colocados bajo condiciones de incubación durante 10 d a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen de fotoperíodo de 16/8 h luz proporcionadas por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W (2500 lux), en una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $45 \text{ moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 30%.

1.2.2.4 Variables cuantificadas

Las variables cuantificadas fueron: contaminación por microorganismos (%), oscurecimiento del explante (%) y supervivencia de explantes (%) a los 10 d después de la siembra.

1.2.3 Inducción de brotes

Con la finalidad de estudiar la respuesta morfogénica en la inducción de brotes mediante activación areolar se evaluaron 10 tratamientos hormonales

constituidos por la unión de: 2,4-D (Sigma®) + CIN (Sigma®) (Cuadro 1.3). El medio de cultivo que se empleó fue el medio básico MS (1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) y con agar (0.6% p/v, Merck®). Se ajustó el pH a 5.7± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N, en un potenciómetro (Orión® modelo 611). Se sirvieron 10 mL del medio en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. La esterilización del medio se efectuó como se mencionó anteriormente (inciso 1.2.2.2). Los explantes se incubaron en las condiciones descritas en el inciso 1.2.2.3.

Cuadro 1. 3. Relación de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962).

Tratamiento (núm.)	2,4-D + CIN (mg L⁻¹)	2,4-D + CIN (µM)
1 Testigo	0	0
2	2 + 1	9.0 + 4.65
3	2 + 2	9.0 + 9.30
4	2 + 3	9.0 + 13.95
5	3 + 1	13.5 + 4.65
6	3 + 2	13.5 + 9.30
7	3 + 3	13.5 + 13.95
8	4 + 1	18.0 + 4.65
9	4 + 2	18.0 + 9.30
10	4 + 3	18.0 + 13.95

1.2.3.1 Variables cuantificadas

Las variables evaluadas fueron las respuestas morfogénicas: formación de callo por explante (núm), activación areolar (núm), crecimiento de callos determinado como peso de materia fresca (PFC; g) a los 30 d de inducción.

1.2.4 Multiplicación de brotes

Después de la etapa de inducción, los explantes con brotes se pasaron a la etapa de multiplicación de brotes empleando el mismo medio de cultivo de inducción (inciso 1.2.3) durante 12 semanas, con subcultivos a medio fresco

cada 4 semanas. Los explantes se incubaron en las condiciones descritas en el inciso 1.2.2.3.

1.2.4.1 Variables cuantificadas

Las variables medidas fueron: explantes con callo (%); crecimiento de callos determinado como peso de materia fresca (PFC; g); explantes con brotes organogénicos (EO; %); explantes con brotes por activación areolar (EAR; %) brotes por explante organogénico de *novo* (BEO; %); brotes por explante por activación areolar (BEAR; %); longitud de los brotes de *novo* (LBO; mm) y por activación areolar (LBAR; mm); número de raíces (NR; %); longitud de raíces (LR; mm); cuantificadas a los 60, 90 y 120 d de cultivo en medio de multiplicación.

1.2.5 Enraizamiento de brotes, transferencia, acondicionamiento y establecimiento *ex vitro* de plántulas

Los brotes de *M. plumosa* se subcultivaron en un medio MS (1962) al 50% de su concentración, con 15 g de sacarosa y 0.6% (p/v) de agar (Merck®), ajustados a un pH de 5.8. Se seleccionaron 20 plántulas de 1-1.5 cm de diámetro y que presentaban de 2 a 4 raíces para evaluar el trasplante y supervivencia. Las raíces se lavaron con agua destilada estéril y se transfirieron a vasos de poliestireno de 150 mL de capacidad; 10 de esas plántulas se colocaron en vasos llenos con sustrato estéril: peat-moss:arena de río (1:1) y las otras 10 plántulas en sustrato estéril: peat-moss:tierra de hoja (1:1). Después del trasplante, las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno y se colocaron en una cámara de crecimiento a 26 ± 2 °C con un fotoperíodo de 12 h para su aclimatación. Los primeros 5 d se proporcionaron riegos diarios con agua destilada estéril y después espaciaron cada tercer día. La supervivencia (%) se evaluó a los 30 y 60 d después del trasplante.

1.2.6 Análisis Histológico

Durante la etapa de multiplicación (60 d), se muestrearon callos y explantes con brotes. Las muestras se fijaron en una solución FAA (3.6% de formaldehído, 50% de etanol al 96%, 5% de ácido acético en 35% de agua destilada) (Ruzin, 1999). Los tejidos fijados se lavaron con agua destilada y se deshidrataron mediante un procesador de tejidos automático secuencial: etanol (50, 70, 96 y 100%), xilol (100%) y xilol:etanol (1:1), por 30 min en cada cambio. Las muestras se procesaron e incluyeron en parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific®) orientadas para su corte longitudinal. Se obtuvieron cortes (10 µm) transversales y anticlinales con un micrótopo rotatorio (Spencer® de American Optical Company). Los cortes se adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina “0” y verde fijo FCF (Zavaleta y Engleman, 1994). Los cortes se observaron en un microscopio óptico (Axioskop 2 Plus, ZEISS®) y se fotografiaron con una cámara digital (Axioskop MRc5, ZEISS®).

Las etapas experimentales establecidas para determinar la respuesta morfogénica de *M. plumosa* se resumen en la Figura 1.3.

1.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada variable de cada experimento se analizaron en un diseño completamente al azar, con 30 repeticiones y la unidad experimental estuvo constituida por un explante en cada frasco. El análisis de varianza se hizo con el sistema de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) se usó para comparar las medias.

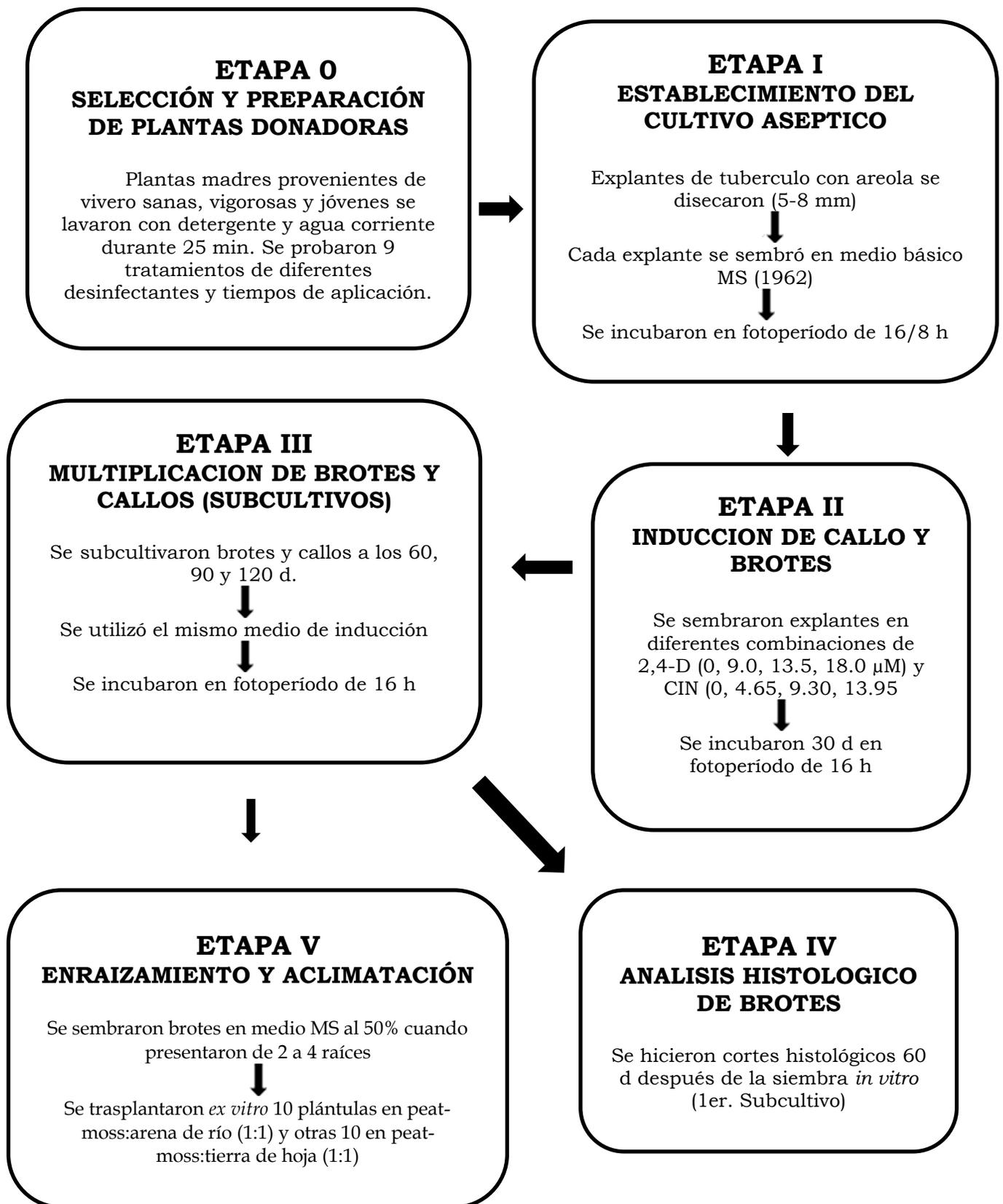


Figura 1. 3. Esquema de las etapas de regeneración *in vitro* de *M. plumosa* vía organogénesis directa e indirecta y análisis histológico de los brotes y callos.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico

El método de desinfección empleado tuvo efectos significativos sobre los porcentajes de supervivencia, oscurecimiento y contaminación ($p \leq 0.05$) (Apéndice 1.1A). El establecimiento del cultivo aséptico de *M. plumosa* Weber fue exitoso en el tratamiento con Cloralex® (35%) + Microdyn® (1.5% v/v) durante 10 min donde se obtuvo una supervivencia de 84% y oscurecimiento de 5%; seguido del tratamiento con Cloralex® (40%) + Microdyn® (1.5% v/v) por 10 min, donde se alcanzó 76% de supervivencia y 7% de oscurecimiento. Estos porcentajes altos de esterilización son el resultado del tratamiento de desinfección, y el cuidado, manejo y control fitosanitario de la planta madre antes de aislar los explantes.

El método de Cloralex® (35%) + Microdyn® (1.5% v/v) durante 10 min se considero como el optimo para la desinfección de explantes de 5-8 mm de longitud de tubérculo con areola en *M. plumosa*, Los tratamientos con Captan® + Benlate® (4g L⁻¹) a diferentes tiempos de exposición resultaron tóxicos para los explantes de *M. plumosa*; ya que ocasionarán 34% de oscurecimiento y 33% de muerte de los mismos (Cuadro 1.4). Estos resultados son comparables a los obtenidos con cactus silvestres adultos o cultivados en invernaderos como fuente de explantes, en los que se presentó contaminación superior al 60% y oscurecimiento de 50% (Aparecida de Oliveira *et al.*, 1995).

Cuadro 1. 4. Porcentaje de supervivencia, oscurecimiento y contaminación de tubérculo con areola de *M. plumosa* proveniente de tratamientos de desinfección a los 10 d después de la siembra *in vitro*.

Desinfectantes	Supervivencia (%)		Oscurecimiento (%)		Contaminación (%)	
Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹) 20min.	24	c	34	ba	24	bdac
Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹) 30 min.	34	bc	24	bac	24	bdac
Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹) 35 min.	16	c	34	ba	33	ba
Cloralex® 30% + Microdyn® 1.5% (v/v) 10 min.	64	ba	13	bc	10	bdc
Cloralex® 35% + Microdyn® 1.5% (v/v) 10 min.	84	a	5	c	5	d
Cloralex® 40% + Microdyn® 1.5% (v/v) 10 min.	76	a	7	c	8	dc
Alcohol al 70% 5 min.	34	bc	18	bac	30	bac
Alcohol al 70% 5 min.	16	c	43	a	24	bdac
Alcohol al 70% 10 min.	30	bc	13	bc	40	a

² Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 30.

La efectividad del tratamiento de desinfección y el daño de los tejidos de los explantes durante los tratamientos de limpieza aumentan en relación al tiempo de exposición y la concentración del desinfectante, la condición de las plantas donadoras, el tamaño y tipo, así como la fisiología de los explantes son factores críticos durante el inicio de los cultivos (Quiala *et al.*, 2004), de manera que en *M. plumosa* se logró encontrar un equilibrio en estos aspectos. Esta etapa es esencial para la obtención de las respuestas morfogénicas (Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011).

1.3.2 Inducción de brotes

Las dosis combinadas de 2,4-D + CIN afectaron significativamente el número de explantes con brotes y el peso fresco de callos (p≤0.05) (Apéndice 1.2A). Se observaron dos respuestas morfogénicas: la diferenciación de tejidos desorganizados o caulogénesis (organogénesis indirecta) y la diferenciación de estructuras organizadas u órganos (organogénesis directa): brotes y raíces (Cuadro 1.5). Estas respuestas son similares a las reportadas en cultivos de

Notocactus magnificus (Aira de Medeiros *et al.*, 2006), genotipos de *Opuntia* (Juárez y Passera, 2002; Estrada-Luna *et al.*, 2008); *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010); *Turbiniacarpus spp.* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) y *M. albicoma* (Wyka *et al.*, 2006). Varios cactus se han cultivado exitosamente en diferentes medios de cultivo y tipos de sales minerales (Vidican y Cachita-Cosma, 2010). El primer intento para propagar cactus *in vitro* fue en 1957 cuando King reportó la inducción de callo de varias especies, en medio de cultivo de White (1963), pero otros estudios demostraron que el medio L2 (Lin y Staba, 1961) y MS (1962) indujeron satisfactoriamente el desarrollo de cactáceas, coincidiendo con lo encontrado en esta investigación.

Cuadro 1. 5. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la inducción de callo y brote areolar de *M plumosa* a los 30 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (mg L ⁻¹)	2,4-D + CIN (μM)	Callos (%)	Explantes con brotes areolares (núm.)	Peso fresco de callo (g)
0	0	0	0	0.00
2 + 1	9.0 + 4.65	8	0	0.06
2 + 2	9.0 + 9.30	8	0	0.05
2 + 3	9.0 + 13.95	8	0	0.04
3 + 1	13.5 + 4.65	16	2.16	0.07
3 + 2	13.5 + 9.30	84	0	0.22
3 + 3	13.5 + 13.95	56	0	0.79
4 + 1	18.0 + 4.65	58	0	1.09
4 + 2	18.0 + 9.30	98	2.75	2.04
4 + 2	18.0 + 13.95	50	2.53	0.81

^aMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 30.

Durante los subcultivos se observó que los callos producidos variaron en su coloración (blanco a verde), textura (firme y compacto a friable) y tasa de crecimiento (Figura 1.4 C). Los callos verdes (friables) que tuvieron mejor respuesta crecieron en la superficie del corte y base de los explantes, lo cual coincide con las observaciones hechas en *M carmenae*, ya que los callos

crecidos en presencia de 2,4-D presentaron un mejor aspecto (Mata-Rosas *et al.*, 2001). En general, se pudo observar una clara tendencia de incremento en el desarrollo de callos conforme se elevó la concentración de auxina en el medio, de tal forma que en los tratamientos con 13.5 y 18.0 μM 84 y 98% de los explantes desarrollaron callo en las condiciones empleadas (fotoperiodo 16 h) a los 30 d de inducción (Cuadro 1.5). Además, los mejores resultados para el peso promedio de callo fueron obtenidos con 18.0 μM de 2,4-D y 9.30 μM de CIN con 2.04 g seguida del tratamiento de 18.0 μM de 2,4-D y 13.95 μM de CIN con 1.09 g en el promedio de peso fresco de callo (Figura 1.4). Resultados similares fueron obtenidos en otras cactáceas con concentraciones de 2.67 y 26.7 μM de ácido naftalenacético usadas para diferenciar callos en *M. albicoma* y *Coryphantha retusa* (Wyka, 2006; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). La acción individual de las auxinas que tienen la capacidad de inducir agrandamiento y alargamiento celular o su interacción con citocininas que promueven la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos, así como su concentración y el tipo de compuesto usado determinan el éxito de las respuestas organogénicas observadas durante las diversas técnicas de propagación (Quiala *et al.*, 2004).

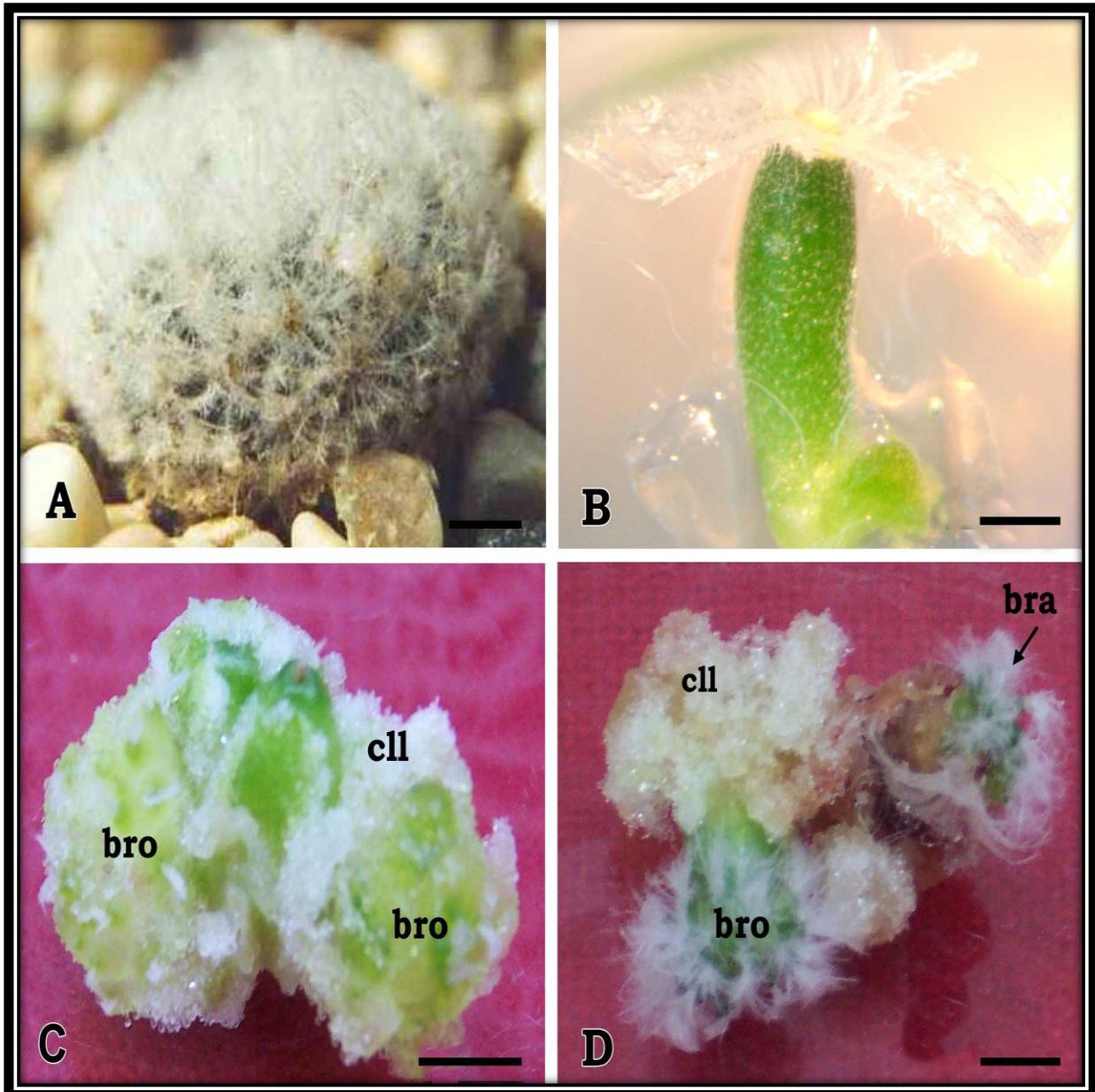


Figura 1. 4 Morfología de *M. plumosa*. A) Planta adulta; B) Areola usada como explante en los cultivos asépticos; C) Callo y brotes adventicios regenerados con 2,4-D (18.0 μM) y CIN (9.30 μM) después de 30 d en fotoperíodo 16 h; D) Callo organogénico, brote desarrollado de areola y brote organogénico después de 90 d con 2,4-D (18.0 μM) y cinetina (9.30 μM). barra= 0.2 mm. cll: callo; bra: brote areolar; bro: brote organogénico.

La producción de brotes en esta etapa del estudio fue resultado de la activación de yemas axilares de los explantes; sin embargo, esta respuesta fue baja a los 30 d de cultivo *in vitro*. La combinación de 2,4-D (18.0 μM) y CIN (9.30 μM) logró regenerar un promedio de número explantes con brotes areolares de 2.75 (Cuadro 1.5). No se observó organogénesis indirecta. Además, no todos los tratamientos que incluyeron citocininas lograron la generación de brotes, pero las dosis pudieron romper la dormancia de las yemas axilares y activaron los meristemas de la areola de los explantes como se esperaba. También durante la inducción se logró la diferenciación de raíces adventicias.

1.3.3 Multiplicación de brotes

Las dosis combinadas de 2,4-D + CIN afectaron significativamente la multiplicación de brotes por explante (núm.) organogénicos y por activación areolar, peso fresco de callo (g) a los 60, 90 y 120 d ($p \leq 0.05$) así como el número de raíces y longitud de raíces (mm) a los 90 y 120 d (Apéndice 1.3A-7A). Los brotes y callos regenerados en la etapa de inducción fueron subcultivados tres veces cada 30 d (60, 90 y 120 d) para evaluar la tasa de multiplicación. Los explantes que lograron regenerar los mejores callos de apariencia friable y crecimiento se obtuvieron con 2,4-D (18.0 μM) y CIN (9.30 μM), ya que a los 60 d triplicaron el crecimiento promedio obtenido a los 30 d (6.02 g; 200% de incremento) (Cuadro 1.6).

Cuadro 1. 6. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M plumosa* a los 60 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (μ M)	Callo (%)	Peso fresco de callo (g) ^z	Explantes con brotes areolares (núm.) ^z	Brotes areolares por explante (núm.) ^z	Explantes con brotes organogenicos (núm.) ^z	Brotes organogenicos por explante (núm.) ^z
0	0	0.00	0.0	0.00	0	0.0
9.0	4.65	2.15	0.8	0.11	0.5	0.3
9.0	9.30	1.78	0.8	0.09	0.5	0.2
9.0	13.95	1.94	0.8	0.09	0.5	0.6
13.5	4.65	1.87	4.3	0.88	2.0	0.3
13.5	9.30	2.12	0.8	0.13	1.0	0.2
13.5	13.95	3.40	0.8	0.11	0.5	0.2
18.0	4.65	4.51	1.8	0.33	0.5	1.1
18.0	9.30	6.02	7.6	2.68	4.6	0.4
18.0	13.95	4.63	5.4	1.36	1.5	0.0

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 30$.

Durante esta etapa de proliferación, se observó que la producción de brotes se dio a partir de dos fenómenos: la activación areolar, como sucedió en los cultivos de inducción y la diferenciación de primordios de brotes a partir de organogénesis adventicia indirecta proveniente de células desdiferenciadas después de 60 d de iniciados los cultivos y con una frecuencia de 0.2 a 1.1 brotes por callo en promedio en los tratamientos que incluyeron 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (4.65 μ M; 9.30 μ M) (Cuadro 1.6). Estos datos de regeneración de brotes son similares a los reportados para otras especies y géneros de cactus, que indujeron la organogénesis indirecta de brotes en *Coryphantha elephantidens* cultivadas *in vitro* en medio básico MS (1962) suplementado con 2,4-D (2.3 μ M) y CIN (6.9 μ M). Angulo Bejarano-y Paredes-López (2011) desarrollaron un protocolo para la regeneración vía organogénesis indirecta de brotes en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, donde la mejor respuesta para la inducción de callos se obtuvo con la combinación de 2,4-D (2.26 μ M) y BA

(2.21 μM) y desarrollaron un rango de 2 a 3 brotes; cantidad de brotes similar al obtenido en este trabajo.

Estos resultados son similares a los reportados por Ramirez-Malagon *et al.* (2007), quienes aplicaron tratamientos hormonales de CIN + AIA en concentraciones de 27.9 y 46.5 μM , respectivamente, las cuales fueron capaces de inducir la formación de brotes de *novo* en *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. pectinifera*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, y *M. zephyranthoides* en un promedio de 4.8 brotes por explante.

A los 90 d de multiplicación la tasa de crecimiento de estos callos se mantuvo acelerada, ya que se lograron incrementos en el promedio de peso fresco (6.5 g) en 300%. La activación del crecimiento de las yemas areolares de cada tubérculo a los 90 d en algunos explantes de los tratamientos con 2,4-D (18.0 μM) y CIN (4.65, 9.30 y 18.0 μM) aumentó de 1.00 a 6.24, pero lo que se incremento considerablemente fue el numero de explantes que presentaron la activación areolar (58.8) ya que en cada subcultivo cada brote areolar generado del explante inicial iba generando más brotes areolares (Cuadro 1.7).

Cuadro 1. 7. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M. plumosa* a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (μ M)	Callo (%)	Peso fresco de callo (g) ^z	Explantes con brotes areolares (núm.) ^z	Brotes areolares (núm.) ^z	Explantes con brotes organogénicos (núm.) ^z	Brotes organogénicos (núm.) ^z
0	0	0	1.0	0.00	0	0.44
9.0	4.65	2.2	2.0	0.37	1.2	0.45
9.0	9.30	2	3.0	0.36	1.0	0.40
9.0	13.95	2.2	3.0	0.38	0.5	0.92
13.5	4.65	2.5	4.8	1.83	3.7	0.58
13.5	9.30	2.2	0.6	0.64	2.0	0.57
13.5	13.95	3.4	2.0	0.49	2.1	0.68
18.0	4.65	4.4	2.4	1.00	3.0	1.60
18.0	9.30	6.5	58.8	6.24	8.0	0.87
18.0	13.95	4.4	7.0	2.15	4.4	0.31

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 30$.

A los 120 d se observaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el de mayor peso fresco de callo el tratamiento con la combinación de 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (9.30 μ M) con 6.9 g de peso promedio (Cuadro 1.8). No se observaron daños por hiperhidratación u oscurecimiento y los nuevos brotes que se produjeron tenían apariencia normal. La activación del crecimiento de las yemas areolares se expresó mejor con 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (9.30 μ M) donde se generó el mayor número de brotes en promedio (11.4), seguido del tratamiento con 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (13.95 μ M) que sólo produjo 2-3 brotes (Cuadro 1.8). La respuesta de producción de brotes en este estudio es elevada; sin embargo, en un reporte de *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* se lograron 13.7 y 12.3 brotes por explante respectivamente con medios suplementados con BA (8.8 μ M) (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002). Asimismo, Mata-Rosas *et al.* (2001), determinaron que la mayor proliferación de brotes de *Turbinicarpus laui* se obtuvo en cultivos con 8.8 ± 13.32 μ M de BA con 0-2.68 μ M de ácido naftalenacético.

Cuadro 1. 8. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M. plumosa* a los 120 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (μ M)	Callo (%)	Peso fresco de callo (g) ^z	Explantos con brotes areolares (núm.)	Brotes areolares por explanete (núm.) ^z	Explantos con brotes organogénicos (núm.) ^z	Brotes organogénicos por explanete (núm.) ^z							
0	0	0	b	0.4	d	0	d	0.0	d	0.5	c	0.64	c
9.0	4.65	90	a	3.4	bc	0.8	cb	0.5	d	0.8	c	0.76	c
9.0	9.30	90	a	2.9	c	0.7	cb	0.5	d	0.9	c	0.73	c
9.0	13.95	90	a	3.5	bc	0.7	cb	0.8	cd	1.8	bc	1.07	bc
13.5	4.65	90	a	3.1	bc	12.0	cb	2.6	cb	1.7	bc	1.07	bc
13.5	9.30	90	a	3.5	bc	1.0	cbd	0.8	cd	1.1	c	0.86	c
13.5	13.95	90	a	4.6	bac	1.0	cb	1.1	cbd	2.1	bc	1.12	bc
18.0	4.65	90	a	4.9	ba	4.0	cbd	1.4	cbd	6.1	ba	1.98	ba
18.0	9.30	100	a	6.9	a	116	a	11.4	a	10.0	a	2.44	a
18.0	13.95	90	a	5.0	ba	16.0	b	3.3	b	1.5	bc	0.98	bc

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 30$.

En cuanto al mayor crecimiento de brotes se observó que el mejor tratamiento para ambos (areolares y organogénicos de *novo*) se obtuvo en el medio suplementado con 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (9.30 μ M) (Cuadro 1.9-10) a los 90 y 120 d en cultivo. A los 90d los brotes areolares presentaron una longitud en un promedio de 18.54 mm y en los brotes organogénicos de *novo* de 12.59 mm (Cuadro1.9). Esta longitud fue superior a la reportada por Mata-Rosas *et al.* (2001), donde la mayoría de los brotes de *Turbinicarpus laui*, alcanzaron una longitud promedio de brotes de 10 mm. Otra de las respuestas morfogénicas observadas al hacer esta investigación fue la formación de raíces en todos los tratamientos con hormonas siendo el medio suplementado con la concentración de 2,4-D (13.5 μ M) y CIN (13.95 μ M) en el que se desarrollaron mayor cantidad de raíces, tanto a los 90 como a los 120 d (Cuadro1.9 y 1.10). A los 90 d la mayor cantidad de raíces fue 1.31 pero debido al reducido tamaño que presentaban no se cuantificaron pero la mayor longitud de raíces en promedio de 2.9 mm se obtuvo con 2,4-D (18.0 μ M) y CIN (4.65 μ M) (Cuadro1.9).

Cuadro 1. 9. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) de *M plumosa* en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (μM)		Longitud de brotes areolares (mm) ^z		Longitud de brotes organogénicos (mm) ^z		Raíces (núm.) ^z		Longitud de raíz (mm) ^z	
0	0	0.00	h	0.00	c	0.35	b	0.0	c
9.0	4.65	6.80	fg	4.45	c	0.55	ba	0.0	c
9.0	9.30	7.99	fe	7.65	b	0.62	ba	0.0	c
9.0	13.95	5.35	g	8.10	b	0.90	ba	0.0	c
13.5	4.65	9.63	de	8.58	b	0.89	ba	2.0	b
13.5	9.30	14.89	b	12.04	a	0.88	ba	0.0	c
13.5	13.95	11.03	dc	12.29	a	1.31	a	0.0	c
18.0	4.65	12.55	c	8.69	b	1.05	ba	2.9	a
18.0	9.30	18.54	a	12.59	a	0.85	ba	0.0	c
18.0	13.95	16.03	ba	9.14	b	0.47	ba	2.4	ba

^z Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 30$.

A los 120d los brotes areolares presentaron una longitud promedio de 18.5 mm y en los brotes organogénicos de *novo* de 15.4 mm. La mayor formación de raíces generadas fue 2.5 raíces pero la mayor longitud promedio de raíces (16.6 mm) se alcanzo con 2,4-D (18.0 μM) y CIN (4.65 μM) (Cuadro 1.10). Estos resultados coinciden con lo reportado por Moebius-Goldammer *et al.* (2003) donde el enraizamiento de *Ariocarpus kotschoubeyanus* se presentó de manera espontánea sin que haya existido una correlación entre el desarrollo de la raíz y la concentración de auxinas utilizadas. Este hecho se ha observado en algunas especies de cactáceas donde la formación de raíces se presenta de manera espontánea en medios de cultivo libres de auxinas (Hustenberger *et al.* 1992).

Cuadro 1. 10. Efecto de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) de *M plumosa* en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces a los 120 d después de la siembra *in vitro*.

2,4-D + CIN (μ M)		Longitud de brotes areolares (mm) ^z		Longitud de brotes organogénicos (mm) ^z		Raíces (núm.) ^z		Longitud de raíz (mm) ^z	
0		0.00	i	0.00	c	0.74	b	5.21	b
9.0	4.65	7.00	hg	10.04	b	1.46	ba	9.19	ba
9.0	9.30	8.18	fg	10.55	b	1.51	ba	11.88	ba
9.0	13.95	5.57	h	10.71	b	2.37	ba	11.88	ba
13.5	4.65	9.80	fe	14.84	a	2.08	ba	15.21	ba
13.5	9.30	14.97	bc	15.42	a	1.77	ba	12.88	ba
13.5	13.95	11.44	de	13.43	a	2.53	a	9.32	ba
18.0	4.65	12.74	dc	13.11	a	2.36	ba	16.61	a
18.0	9.30	18.57	a	15.45	a	2.45	ba	10.56	ba
18.0	13.95	16.38	ba	13.76	a	1.56	ba	6.47	ba

^z Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 30$.

Con base en lo antes mencionado se confirma que para controlar el proceso morfogénico juegan un papel clave las hormonas (Taiz y Zeiger, 2006), el fotoperíodo y la luz (longitud de onda e intensidad) (Coca-Soriano *et al.*, 2007; Vitória Resende *et al.*, 2010). Aira de Medeiros *et al.*, (2006) concluyen que estos factores influyen de manera importante en la síntesis y acumulación de almidón y hormonas endógenas, por lo que constituyen un disparador de las respuestas durante la morfogénesis en cultivos *in vitro* (Estrada-Luna *et al.*, 2008; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

En todo proceso morfogénico, el número de brotes producido, es considerado como el potencial de multiplicación de la especie, y es la variable más importante a medir y los datos de la respuesta que se obtuvieron en *M. plumosa* Weber en este estudio mostraron que el número promedio de brotes por explante después 120 d en cultivo fue de 800 aproximadamente. Estos resultados indican que la formación de brotes mediante la activación de yemas areolares, registra excelentes resultados similares a los que se han obtenido en

Opuntia Fragilis Var. *Fragilis* (Vidican y Cachita-cosma, 2010), donde principalmente utilizan ápices de brotes que contienen grandes cantidades de areolas (Giusti *et al.* 2002).

1.3.4 Enraizamiento de brotes, transferencia, acondicionamiento y establecimiento *ex vitro* de plántulas

Los brotes de *M. plumosa* producidos regeneraron raíces de forma espontánea y continuaron produciendo aun cuando se subcultivaron en un medio MS al 50% de su concentración normal, 15 g de sacarosa y agar (Merck®) a una concentración de 0.6% (p/v), ajustados a un pH de 5.8., condición que favoreció la obtención de plantas completas. Cuando las raíces se alargaron y constituyeron un sistema radical con 2 a 4 raíces, se seleccionaron las mejores 20 plantas con diámetros de 1-1.5 cm para evaluar el trasplante y porcentaje de supervivencia. Las plantas se sacaron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada estéril para luego transferirlas a vasos de poliestireno de 150 ml de capacidad, previamente llenos con uno de dos tipos de sustratos estériles: 10 plántulas en peat-moss + arena de río (1:1) y 10 plántulas en peat-moss + tierra de hoja (1:1). Después del trasplante, las plantas se cubrieron con una bolsa de polietileno y se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h luz a 26 ± 2 °C para su aclimatación. Durante los cinco primeros días se proporcionaron riegos diarios con agua destilada estéril y después se espaciaron cada tercer día. Los porcentajes de supervivencia de las plántulas se evaluaron a los 30 y 60 d después del trasplante.

Es factible considerar que *M. plumosa* es una especie de respuesta morfogénica eficiente, debido a que formaron espontáneamente raíces en brotes desarrollados en condiciones *in vitro* durante todo el periodo del proceso morfogénico y esta característica favoreció la supervivencia *ex vitro* y la posible reducción en los costos de un sistema de producción de plantas (Coca-Soriano

et al., 2007; Vitória Resende *et al.*, 2010). Se ha reportado que los cactus en general son especies fáciles de enraizar tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* y que, de la misma manera, pueden diferenciar raíces adventicias sin la presencia de auxinas. Dávila-Figueroa *et al.* (2005), indican que el enraizamiento de los brotes de *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus* y *T. subterraneus* generados *in vitro* se logró en medio basal MS (1962) con 54.2 y 94.2 % respectivamente. Comparativamente en *Pilocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) y *T. laui* (Mata-Rosas *et al.* 2001), reportan una eficiencia de enraizamiento de 94 a 100% en medio basal MS (1962) con la mitad de nutrientes y en ausencia de fitohormonas. Muchas especies vegetales logran regenerar raíces cuando sus brotes son cultivados *in vitro* sin la presencia de auxinas; sin embargo, en otras especies se requiere de la adición de éstas para lograr la regeneración o para mejorar las respuestas en cuanto al número y longitud de las raíces regeneradas. Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) evaluaron el uso de auxinas para el enraizamiento de *P. aselliformis* y *P. strobiliformis*, alcanzado valores del 87 y 89%, respectivamente.

En la etapa de aclimatación se utilizaron brotes enraizados *in vitro* y el porcentaje de supervivencia que se logró fue de 85% de plántulas de *M. plumosa* utilizando como sustrato partes iguales de peat-moss y arena de río (1:1), controlando las condiciones de humedad y temperatura tanto *in vitro* como *ex vitro*. En la aclimatación con peat-moss y tierra de hoja (1:1) se reportó un 20% de supervivencia de plántulas. En otras especies de cactus los porcentajes de supervivencia son variables: 70 % en *Schlumbergera truncata*; 88% en *P. aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002) y 94-100% en *Turbinicarpus laui*, *Coryphantha elephantidens* y *M. carmenae* (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Coca-Soriano *et al.*, 2007). Sin embargo, para tener una estimación precisa de la supervivencia *ex vitro* es importante tener en cuenta la cantidad de plantas establecidas y los tiempos de evaluación considerados y, hasta la fecha, pocos trabajos detallan esta información.

1.3.5 Análisis histológico

El análisis histológico permitió caracterizar el desarrollo de los brotes a partir de los callos organogénicos. Se logró identificar tres etapas en el desarrollo de estos brotes: estadio 1 (inicial; 60 d); estadio 2 (intermedio; 90 d) y estadio 3 (diferenciado; 120 d). En el estadio inicial, el callo está formado por células de parénquima, isodiamétricas de paredes delgadas con granos de almidón. En este estadio se observó actividad meristemática sub epidérmica que promovió el levantamiento de una protuberancia globosa, caracterizada por la diferenciación de procambium en la parte central (Fig. 1.5, A-B). En el estadio intermedio, el callo se hace más verde, aumenta el número de brotes con mayor grado de diferenciación, se forma un meristemo apical y la diferenciación de una areola juvenil, con primordios de espinas e irrigada por un haz de xilema y floema bien diferenciado y funcional (Fig. 1.5, C-D). El estadio diferenciado presentó un callo con numerosos brotes verdes claramente diferenciados; el parénquima del callo desarrolló numerosos haces vasculares de tipo anficribal (floema externo y xilema interno) con ramales orientados hacia los brotes. Estos brotes presentaron espinas modificadas en el centro de la areola y haces vasculares maduros (Fig. 1.5, E-F). Finalmente estos brotes se alargaron, aumentando de tamaño y la base del nuevo brote se adelgaza y estrangula para después desprenderse del callo y desarrollar una nueva planta.

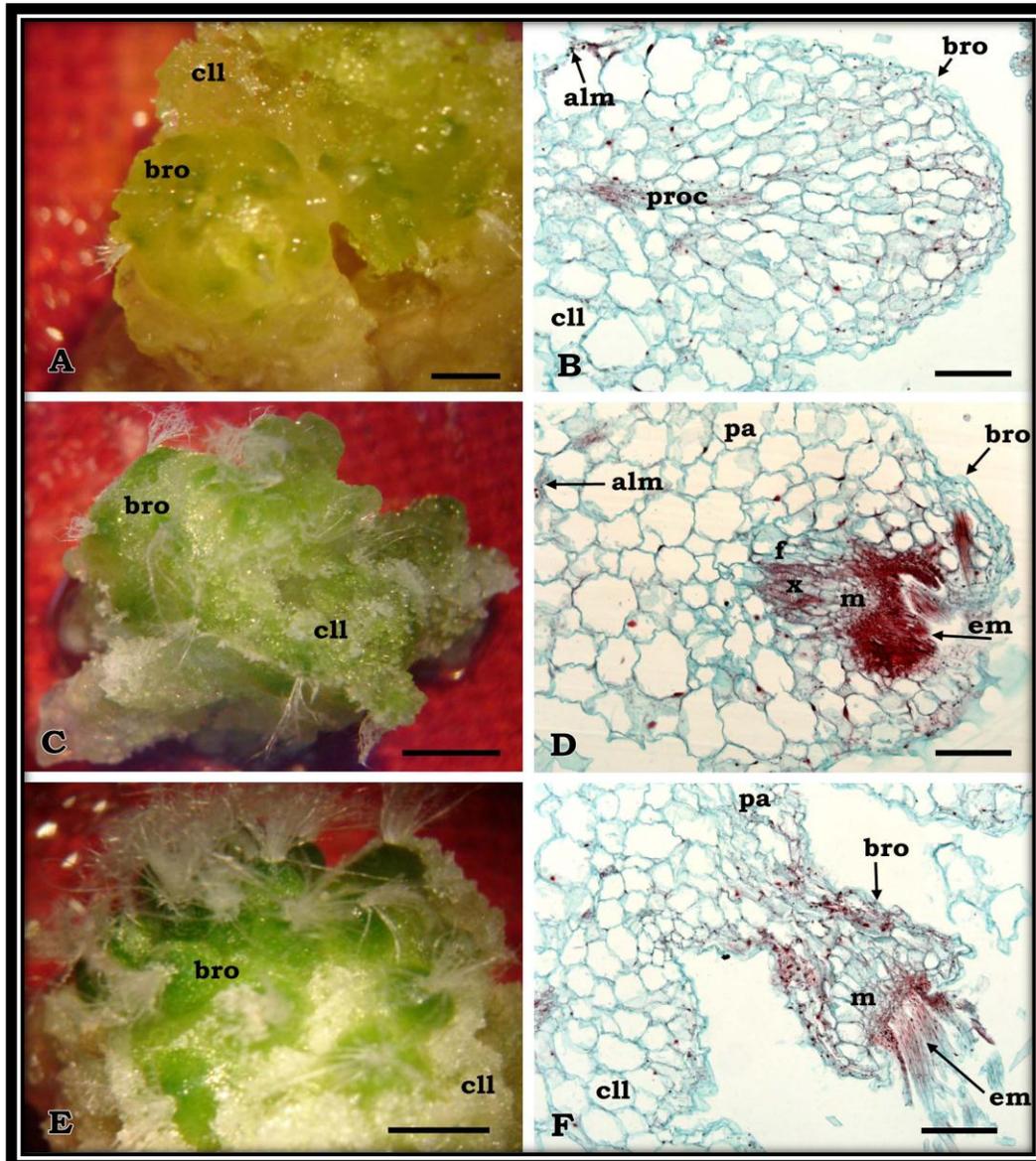


Figura 1. 5 Organogénesis indirecta en callo de *M. plumosa* en 18.0 μ M de 2,4-D y 9.30 μ M CIN A) Estadio 1 inicial, callo verde con primordio de brote; B) Anatomía del primordio de brote a los 60 d; C) Estadio 2, intermedio del brote; D) Corte longitudinal del brote intermedio a los 90 d; E) Estadio 3, diferenciado del brote; F) Brote diferenciado cortado longitudinalmente a los 120d. A, C y E barra=0.5mm; B, D y F barra=100 μ m; cll: células de callo; br: brote; alm: almidón; pa: parénquima; proc: procambium; m: meristemo; x: xilema; f: floema; em: espinas modificadas.

1.4. CONCLUSIONES

Se estableció el proceso morfogénico para *M. plumosa* en el que se produjeron dos respuestas: diferenciación de tejidos desorganizados o caulogénesis y la diferenciación de estructuras organizadas u órganos (organogénesis directa e indirecta): brotes y raíces a partir del cultivo de areola.

El promedio de brotes producidos fue de 11 y el potencial de proliferación es de 800 brotes en promedio después de 20 semanas de cultivo, incrementando el número de plantas al aumentar los subcultivos.

La regeneración de brotes para ambas rutas estuvo bajo el control de la combinación auxina + citocinina (2,4-D + CIN), pero el mejor tratamiento fue 2,4-D 18.0 μM y CIN 9.30 μM tanto en la etapa de inducción como en la de multiplicación.

La diferenciación de callos fue aumentando su biomasa en cada subcultivo dando la posibilidad de aumentar el número de brotes organogénicos.

Para la producción de plantas completas de *M. plumosa*, no se necesitó modificar el medio de cultivo MS (1962) ya que espontáneamente los brotes desarrollaron raíces antes de separarse del explante o del callo.

En la fase de aclimatación, la supervivencia de explantes fue del 85% utilizando como sustrato partes iguales de peat-moss: arena de río y controlando las condiciones de humedad y temperatura tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Los resultados obtenidos para propagación masiva de *M. plumosa* permitirán satisfacer la demanda comercial para proteger y rescatar a las poblaciones silvestres.

En el estudio histológico de los callos con brotes se pudo reconocer el origen adventicio de los brotes.

1.5. LITERATURA CITADA

- Al-Ramamneh E, Sriskandarajah S, Serek M (2006) Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 333-342.
- Angulo-Bejarano PI, Paredes-López O (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in *prickly pear cactus (Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae* 128: 283-288.
- Aparecida de Oliveira S, Machado MFPS, Prioli AJ, Mangolin CA (1995) *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol* 37:47-50.
- Aria de Madeiros L, Cássia R, Gallo LA, Tiago de Oliveira E, Payão MÊS (2006) *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 84: 165-169.
- Arias S, Guzmán U, Mandujano MC, Soto M, Golubov J (2005) Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cact Suc Mex* 50: 100-125.
- Balen B, Milosevic J, Krsnik-Rasol M (2002) Protein and glycoprotein patterns related morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. *Tissue culture Food Technology Biotechnol* 40:275-280.
- Chávez R, Sánchez E, Hernández M, Hernández-Oria JG, Hernández R (2006) Propagación de especies amenazadas de la familia Cactaceae del Semidesierto Queretano. *Bol. Soc. Latinam Carib Cact Suc* 3: 9-13.
- Choreño-Tapia JM, González-Rosas H, Terrazas-Salgado T, Hernández-Livera A (2002) Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areola. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8: 183-196.
- Coca-Soriano E, Ortiz-Montiel JG, Sánchez-Correa S, Pérez-Crisanto J (2007) Efecto de la irradiación luminosa en la aclimatación de *Mammillaria carmenae* Castañeda (Cactaceae) proveniente de cultivo *in vitro*. *Cactáceas Suculentas Mexicanas* 72: 101-108.
- Davila-Figueroa CA, Rosa- Carrillo ML. Perez-Molphe-Balch E (2005) *In vitro* Propagation of Eight Species or Subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 41: 540-545.

- Estrada-Luna AA, López-Peralta C, Cárdenas-Soriano E (2002) *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp.*). *Scientia Horticulturae* 92: 317-327.
- Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ, Torres-Torres ME, Chablé-Moreno F (2008) *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck. and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385.
- Ezz AA, Sriskandarajah S, Serek M (2006) Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncata*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 84: 333-342.
- García-Saucedo PA, Valdez-Morales M, Valverde ME, Cruz-Hernández A, Paredes-López A (2005) Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 215-219.
- Gomes FLAF, Heredia FF, Silva PBE, Facó O, Campos FDADP (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*). *Scientia Horticulturae* 108:15-21.
- Gómez-Juárez JL, Morales JE, Lechuga-Corchado JÁ, Cruz-Sosa F (2006) Reproducción *in vitro* de garambullo *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 51: 36-45.
- Gusti P, Vitti C, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F, Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Hubstenberger J, F.; Clayton PW, Phillips GC (1992) Micropropagation of cacti (*Cactaceae*), *Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation IV.* Springer- Verlag. Berlin, Germany.
- Juárez MC, Passera CB (2002) *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica* 26 3:319-324.
- Mata-Rosas M, Monroy de la Rosa M, Moebius-Goldammer K, Chavez-Avila VM (2001) Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant* 37:400-404.

- Mauseth DJ (1979) A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus & Succulent journal* 51:186-187.
- Moebius-Goldammer K, Mata M, Chavez V (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus*(Lem.)K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:388-393.
- Mohamed-Yasseen Y (2002) Micropropagation of pitaya (*hylocereus undatus* britton et rose). *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38:427-429.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-493.
- Nobel PS (2002) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, 280 p.
- Pelah D, Kaushik RA, Mizrahi Y, Sitrit Y (2002) Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.
- Pérez E, Pérez M, Villalobos E, Meza E, Morones L, Lizalde H (1999) Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular Development Biology Plant*. 34: 131-135.
- Perez-Molphe-Balch E. y Davila-Figueroa CA (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora Aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae) *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 38:73-78.
- Quiala E, Matos J, Montalvo G, de Feria M, Chavez M, Capote A, Pérez N, Barbón R, Kowalski B (2009) *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11: 18-25.
- Quiala E, Montalvo G, Matos J (2004) Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4:195-199.
- Ramirez-Malagon R, Aguilar-Ramírez I, Borodanenko A, Pérez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 660-665.
- Rodríguez-Garay B, Rubluo A (1992) *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium Ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Society of America*,64: 116-120.

- Rubluo A, Marín-Hernández T, Duval K, Vargas A, Márquez-Guzmán J (2002) Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95: 341-349.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D., Valencia-Botin, AJ (2010) Propagación *in vitro* de *Coryphanta Retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:139-143.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique Microscopy*. Oxford University Press and 322 pag.
- Sánchez E, Chávez R, Hernández-Oria JG, Hernández MM (2006) Especies de Cactáceas prioritarias para la conservación en la zona árida Queretano-Hidalguense. Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Querétaro. 97 pp.
- Santos-Díaz MS, Velásquez-García Y, González-Chávez MM (2005) Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria Candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 619-626.
- SAS Institute (2003) *SAS/STAT User's Guide*. Release 9.1 Ed. Cary, NC. USA.
- Secretaria de Recursos Naturales (SEMARNAT 2002) Reglamento de la Ley General de Equilibrio Ecológico y La Protección al Medio Ambiente. Subsecretaria de Gestión para la Protección Ambiental; Dirección General de Impactos y Riesgo Ambiental, SEMARNAT, México 115p.
- Shedbalkar UU, Adki VS, Jadhav JP and Bapat VA (2010) *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol* 3:136–150.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. 4 ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 690 p.
- Velázquez-Enciso LE, Soltero-Quintana R (2001) Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber *ex* Britton *et* Rose, var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46: 56-62.
- Vidican TI, Cachita-Cosma D (2010) initiation of *opuntia fragilis* var. *fragilis in vitro* cultures. *Seria stiintele vietii* 20: 35-40.
- Vitória Resende S, Lima-Brito A, Raniere-Ferreira de Santana J (2010) Effect of substrate and rooting on acclimatization of *in vitro* propagated *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo. *Revista Ceres* 57: 803-809

- Wallace RC, Gibson AC (2002) Evolution and systematic. In park S. Nobel (Ed.).Cacti: Biology and Uses. Ed. University of California Press. California, EUA. 280 p.
- Wyka TP, Hamerska M, Wroblewska M (2006) Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae) Plant Cell Tissue Organ Culture 87:27–32.
- Zavaleta-Mancera HA, Engleman EM (1994) Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). Phytomorphology 44:169-175.

1.6. APÉNDICE

1. 1. A. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza en la tasa de supervivencia, contaminación y oscurecimiento *in vitro* de explantes de *M. plumosa* en diferentes tratamientos de desinfección adicionados al medio MS (1962) a los 10 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Supervivencia (%)	Oscurecimiento (%)	Contaminación (%)
Desinfectantes	0.51*	0.18 *	0.15 *
Error	0.05	0.03	0.03
C.V.	24.04	22.35	21.30
R ²	0.32	0.40	0.47
Media	95%	84%	84%

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la inducción de callo y brote areolar de *M. plumosa*, a los 30 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Callos (%)	Explantos con brotes areolares (núm.)	Peso fresco de callo (g)
Hormonas	1.03 *	43.74	2.73*
Error	0.34	0.37	0.05
C.V.	20.03	82.22	24.75
R ²	0.51	0.80	0.62
Media	92%	0.74	0.96

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 3. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacetico (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M. plumosa*, a los 60 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Callos (%)	Peso fresco de callo (g)	Explantos con brotes areolares (núm.)	Brotes areolares por explante (núm.)	Explantos con brotes organogénicos (núm.)	Brotes organogénicos por explante (núm.)
Hormonas	0.63 *	7.19 *	0.59 *	3.70 *	0.25 *	0.66 *
Error	0.02	0.16	0.03	0.15	0.01	0.07
C.V.	13.34	22.77	22.64	40.32	17.58	29.80
R ²	0.60	0.68	0.40	0.48	0.41	0.75
Media	98	1.78	0.84	0.98	0.76	0.93

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacetico (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M. plumosa*, a los 90 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Callo (%)	Peso fresco de callo (g)	Explantos con brotes areolares (núm.)	Brotes areolares (núm.)	Explantos con brotes organogénicos (núm.)	Brotes organogénicos (núm.)
Hormonas	0.65 *	8.19 *	154.55 *	9.10 *	0.48 *	0.77 *
Error	0.01	0.22	8.16	0.38	0.06	0.12
C.V.	10.65	26.99	166.13	49.16	29.28	32.33
R ²	0.69	0.63	0.46	0.48	0.31	0.68
Media	100%	1.81	1.72	1.25	0.86	1.07

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacetico (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces de *M. plumosa*, a los 90 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Longitud de brotes areolares (mm)	Longitud de brotes organogénicos (mm)	Raíces (núm.)	Longitud de raíz (mm)
Hormonas	33.34 *	3.04 *	1.16 *	8.42*
Error	0.13	0.15	0.50	3.70
C.V.	11.80	10.90	46.15	57.99
R ²	0.91	0.90	0.17	0.17
Media	3.15	3.61	1.53	3.32

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 6. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacetico (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la multiplicación de callo y brotes areolares y organogénicos de *M. plumosa*, a los 120 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Callo (%)	Peso fresco de callo (g)^z	Explantos con brotes areolares (núm.)	Brotes areolares (núm.)	Explantos con brotes organogénicos (núm.)	Brotes organogénicos (núm.)
Hormonas	0.64 *	9.17 *	308.14 *	18.41*	15.11 *	1.31*
Error	0.01	0.25	14.79	0.73	2.54	0.23
C.V.	12.09	28.33	155.10	50.82	97.64	37.95
R ²	0.63	0.60	0.48	0.50	0.59	0.59
Media	100%	1.96	2.48	1.47	1.63	1.27

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

1. 7. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (CIN) adicionados al medio MS (1962) en la longitud de brotes areolares y organogénicos, número y longitud de raíces de *M. plumosa*, a los 120 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Longitud de brotes areolares (mm)	Longitud de brotes organogénicos (mm)	Raíces (núm.)	Longitud de raíz (mm)
Hormonas	33.34 *	3.04 *	1.16 *	8.42*
Error	0.13	0.15	0.50	3.70
C.V.	11.80	10.90	46.15	57.99
R ²	0.91	0.90	0.17	0.17
Media	3.15	3.61	1.53	3.32

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS DE
Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle *aurea

CAPITULO II. PRODUCCIÓN *in vitro* DE BROTES Y CALLOS DE *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea

RESUMEN

Echinopsis chamaecereus Friedrich & Glaetzle aurea es un mutante cromático (aclorofílico) de *E. chamaecereus*, el cual está afectado en la síntesis de clorofila, por lo que sus tallos presentan una coloración amarilla. Este género es originario de sudamerica (Bolivia y Argentina) y el mutante es apreciado como ornamental por su rareza y gran belleza, lo cual hace que alcance un alto valor comercial. Se encuentra catalogada como planta artificial por la Convención del Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES); el promedio total de estos cactus registrados en el comercio anual en siete países es de más de 10,000, pese a que uno de los países que tiene cactus autóctonos y un comercio incomparable de esas plantas es México con una media de exportación anual de 50,168, de las cuales menos del 1% se declaran como reproducidos artificialmente. Una posible solución a la problemática de las cactáceas es buscar protocolos que permitan multiplicar y conservar ejemplares de importancia económica. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede considerarse como un método de propagación alternativo para esta especie el cual permitirá obtener brotes del mutante para la generación de plantas sanas, de calidad, difíciles de propagar o raras. La finalidad de esta investigación fue establecer una metodología para la inducción de brotes y callos de *E. chamaecereus* aurea. Segmentos de tallo con areolas se esterilizaron con 6% v/v de cloro activo y 0.048% plata coloidal, se sembraron en medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con benciladenina (BA; 4.4, 8.8 y 13.2 μM) y ácido naftalenacético (ANA; 5.35, 10.7 y 16.05 μM), sacarosa (30 g L⁻¹) y agente solidificante agar (Merck®) (6 g L⁻¹) y en medio líquido. Los frascos de cultivo se mantuvieron en fotoperíodo de 16 h. El material fue subcultivado cada 30 d para su multiplicación en el mismo medio de inducción. Se presentó una contaminación del 7% y supervivencia del 85% a los 10 d después de la siembra. A los 30 d en el medio sólido se detectó una respuesta tanto en la inducción de callo con BA + ANA (13.+ 16.05 μM) de 3.01 g de peso fresco, el cual disminuyó durante la multiplicación a 2.7 g a los 90 d, así como en la mejor activación de las areolas (12.6) al usar BA + ANA (13.2 + 5.35 μM). Desde las primeras semanas, el material sembrado en medio líquido presentó ennegrecimiento en el explante e hiperhidratación dificultando su manejo *in vitro*. El análisis histológico del callo evidencia que no hubo generación de brotes o de embriones adventicios. Se concluye que los explantes proporcionaron una fuente excelente para la activación areolar y producción de brotes con 13.2 μM de BA y 5.35 μM de ANA, obteniéndose una media de 55 brotes por explante a los 120 d. Por lo tanto, en la micropropagación de *E. chamaecereus* aurea se pueden generar en promedio 550 plántulas a partir de 10 explantes sembrados *in vitro*, los cuales podrían ser parte de un programa de producción masiva para su comercialización.

Palabras clave: *Lobivia silvestrii* aurea, Cactaceae, micropropagación, mutante cromático (aclorofílico), brotes, callos.

ABSTRACT

Echinopsis chamaecereus Friedrich & Glaetzle aurea is a chromatic mutant (without chlorophyll) of *E. chamaecereus* affected in the synthesis of chlorophyll, which result in plants colored yellow. This genus is native to South America (Bolivia and Argentina) and this mutant is valued as an ornamental because of its rarity and great beauty, which makes achievement of a high commercial value. *E. chamaecereus* aurea is classified as artificial plant by the Convention on International Trade in Endangered Species of Fauna and Flora (CITES), the average total registered cactus annual trade in seven countries is over 10,000, although one of the countries that have native cacti and an unparalleled commerce of these plants is Mexico with an average annual export of 50,168, of which less than 1% are reported as artificially propagated. One possible solution to the problem of the cactus is to generate protocols to multiply and rescue economically important plant species. The plant tissue culture *in vitro* as an alternative method of propagation may allow obtaining mutant buds for the generation of healthy and high quality plants, or rare genotypes. The purpose of this research was to establish a methodology for shoot and callus induction of *E. chamaecereus* aurea. Areole stem segments were surface disinfected with 6% v / v of active chlorine and 0.048% colloidal silver, established on Murashige and Skoog (MS) (1962) supplemented with benzyladenine (BA, 4.4, 8.8 and 13.2 μM) and naphthaleneacetic acid (NAA, 5.35, 10.7 and 16.05 μM), sucrose (commercial sugar 30 g L^{-1}) and cultured on solidified media with agar (Merck®) (6 g L^{-1}) or in liquid medium. Culture flasks were maintained on a photoperiod of 16 h. The material was subcultured every 30 d for multiplication in the same induction medium. We recorded 7% of contamination and 85% of explant survival 10 d after sowing. After 30 d of culture on solid medium, it was determined a response in callus induction with BA + NAA (13.2 + 16.05 M) of 3.01 g fresh weight, which decreased during the growth to 2.7 g at 90 d, and the best activation of the areole (12.6) using BA + ANA (13.2 + 5.35 M). After the first weeks, the material cultured in liquid medium became brown and hyperhydrated, which make difficult to handle *in vitro*. Histological analysis of callus evidenced that no adventitious buds or embryos were produced. It is concluded that the explants provided an excellent source for activation areolar and shoot production with 13.2 μM of BA and 5.35 μM of ANA, obtaining an average of 55 shoots per explant at 120 d. Therefore, the micropropagation of *E. chamaecereus* aurea can be generated on average 550 plantlets from 10 explants grown *in vitro*, which could be part of a program of mass production to commercialization.

Key words: *Lobivia silvestrii* aurea, Cactaceae, micropropagation, chromatic mutant, shoots, callus.

2.1 INTRODUCCIÓN

Echinopsis es un género de cactácea perteneciente a la subfamilia Cactoideae nativo de Sudamérica (Argentina, Bolivia y Perú). Sus especies, cuyo número gira ampliamente en alrededor de los 150, varían desde grandes y arbóreas hasta pequeñas y globosas. El nombre deriva de *echinos*, erizo o erizo de mar, y *opsis*, apariencia, en referencia a la cubierta densa de espinas que algunas de estas plantas presentan (Anderson, 2001). El género fue creado por el botánico alemán Joseph Gerhard Zuccarini en 1837.

Echinopsis chamaecereus es una especie muy común en Bolivia, resistente y prolifera que se ha extendido por todo el mundo. En los últimos años se han obtenido algunos cultivares de flores más grandes y de otros colores diferentes llamados mutantes cromáticos (quiméricos aclorofilicos) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2. 1. Clasificación botánica de *E. chamaecereus*.

Reino: <i>Plantae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Orden: <i>Caryophyllales</i>
Familia: <i>Cactaceae</i>
Subfamilia: <i>Cactoideae</i>
Tribu: <i>Trichocereae</i>
Genero: <i>Echinopsis</i>
Especie: <i>Echinopsis Chamaecereus</i>
Sinónimos: <i>Chamaecereus silvestri</i>
<i>Cereus silvestrii</i>
<i>Lobivia silvestrii</i>
<i>Lobivia hybrid</i>
Fuente: International Plant Names Index (2011)

Es un cactus muy conocido por los coleccionistas, compuesto por grupos de aspecto erecto en un principio, con tallos del tamaño de un dedo de color verde claro con suaves y numerosas espinas blancas que asemejan a cerdas. Las plantas establecidas pueden alcanzar una altura de 15 centímetros y un ancho de 30 centímetros. Cuando esos “dedos” toman buen tamaño se postran y presentan un aspecto de planta colgante. Florece en estado juvenil, libremente en el interior si las condiciones de luminosidad lo permiten, produciendo enorme cantidad de flores de un muy vivo color rojo bermellón de unos 5 centímetros de diámetro.

Echinopsis chamaecereus aurea (sinónimos: *Chamaecereus sylvestrii*, *Cereus silvestrii*, *Lobivia silvestrii*) es un genotipo aclorofilico ornamental muy atractivo conocido popularmente como cacto cacahuate, el cual se caracteriza por tener tallos diminutos del tamaño de un dedo y epidermis de coloración amarilla, esta coloración del mutante se debe a que pierde la clorofila y predominan los carotenoides que son los que determinan el color de los tallos en aurea; sus areolas son afeiltradas de color blanco o crema provistas de gloquidios y espinas numerosas que parecen cerdas poco agresivas ubicadas sobre costillas poco sobresalientes (6 a 10 según la especie). Las plantas generan numerosos retoños y forman matas de 15 cm de altura y flores que miden unos 5 cm de longitud, hasta 10 cm de diámetro. Son de color rojo anaranjado vivo, estambres crema o amarillo pálido y crecen desde el ápice del tallo (Figura 2.1) (Boyle y Anderson, 2002; Nobel, 2002); la reproducción se logra por medio de esquejes de brotes.

A este tipo de mutante que pierde parcial o totalmente la pigmentación verde producida en el parénquima fundamental se le clasifica como cromático (aclorofilico) y es deficiente tanto en la síntesis de clorofila como en algún aspecto del proceso fotosintético, motivo por el cual no es autótrofo y requiere injertarse sobre un patrón o portainjerto normal para poder sobrevivir, crecer y florecer. Los brotes o tallos jóvenes de las plantas madre son los que

comúnmente se injertan sobre un portainjerto. Los injertos de mutantes cromáticos de varias especies de cactus con colores brillantes injertados en el género *Hylocereus* son una práctica de propagación comercial japonesa muy exitosa que produce plantas ornamentales cotizadas (Hirao, 1995), ya que son altamente valoradas por algunos coleccionistas aunque estas plantas pueden presentar un crecimiento y desarrollo deficientes.

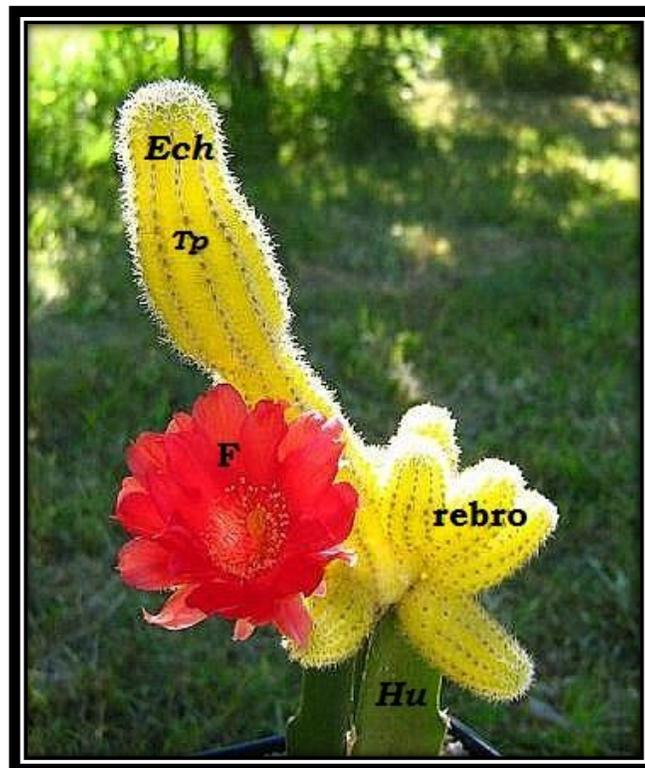
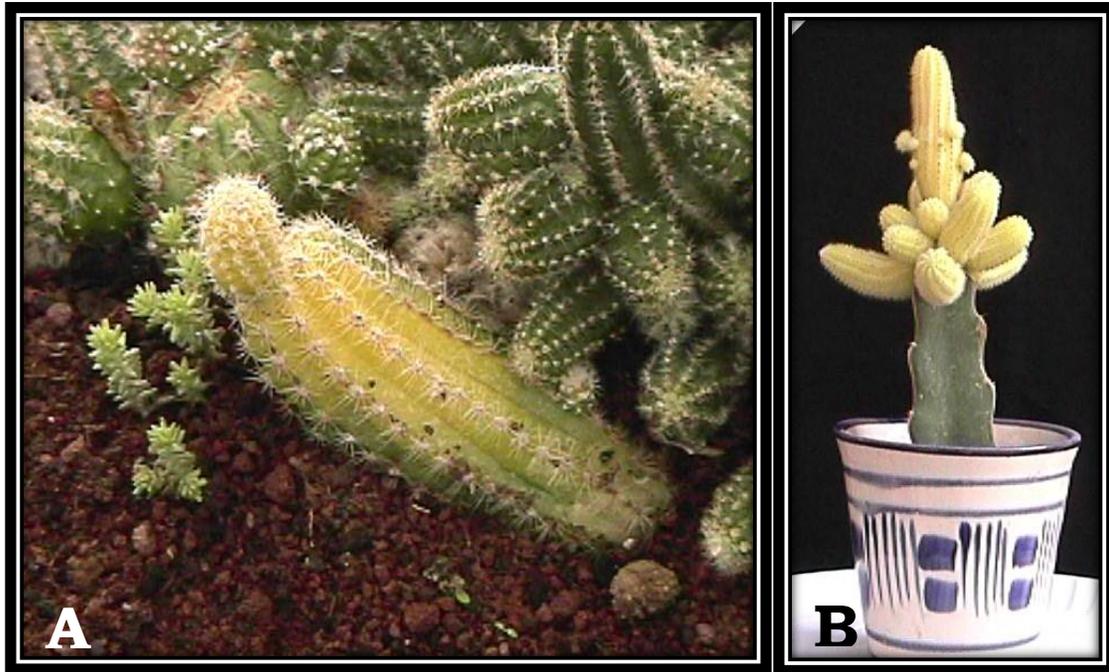


Figura 2. 1. Injerto de *E. chamaecereus* aurea (injerto) e *H. undatus* (portainjerto) mostrando: *Ech*:*E. chamaecereus* aurea; *Hu*:*H. undatus*; *tp*:tallo principal; *F*:flor; *rebr*:rebros jóvenes.

Por eso es conveniente estudiar estrategias y técnicas de propagación que aseguren su conservación y explotación sustentable y comercial. Además de que un de estos mutantes se obtuvo en el germoplasma del Colegio de Postgraduados y necesita ser reproducido para su aprovechamiento como

ornamental (Comunicación personal Dr. Livera Muñoz, Profesor-Investigador del CP-Campus Montecillo) (Figura 2.2).



Fotos cortesía del Dr. Manuel Livera Muñoz.

Figura 2. 2. Planta de *E. chamaecereus aurea*. A. planta obtenida del germoplasma del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; B. Planta injertada para su aprovechamiento ornamental.

En este sentido, la biotecnología vegetal se orienta a la superación de los factores limitantes de la producción agrícola a través de la micropropagación *in vitro* de plantas, desarrollo *in vitro* de variedades mejoradas, producción de metabolitos secundarios de interés económico, obtención de plantas tolerantes a condiciones ambientales adversas como sequía o suelos ácidos, e inclusive la obtención de plantas más productivas, tomando como principio la totipotencialidad y plasticidad de las células vegetales, manteniéndose bajo condiciones físicas y químicas controladas, para dar origen a plantas nuevas en menor tiempo (Quiala *et al.*, 2004; Malda-Barrera y García-Rubio, 2009; Quiala *et al.*, 2009). Las técnicas de propagación *in vitro* han sido una solución real a la problemática de las cactáceas, ya que los protocolos establecidos han

permitido multiplicar y establecer bancos de germoplasma para explotar y conservar especies de importancia económica o en vías de extinción. Desde mediados de los años 50's, cuando se despertó el interés por estudiar alternativas más eficientes para la multiplicación de los cactus, como la activación areolar a través del cultivo de tejidos, se han publicado resultados muy alentadores (Chávez *et al.*, 2001; Velásquez-Enciso y Soltero, 2001; Gusti *et al.*, 2002; Mohamed-Yasseen, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Quiala *et al.*, 2004; Dávila-Figueroa, 2005; García-Saucedo *et al.*, 2005; Estrada-Luna *et al.*, 2008; Quiala *et al.*, 2009). Los individuos regenerados son genéticamente estables y es considerado el método más utilizado comercialmente para la obtención de plantas libres de virus, además de la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas (Rubluo *et al.*, 2002). Entre las especies micropropagadas exitosamente mediante la activación de areolas, se incluyen: *Leuchtenbergia principis*, *Sulcorebutia alba*, *Cereus peruvianus*, *Carnegiea gigantea* (Engelm) Britt & Rose, *Pachycereus pringlei* (Berger) Britt & Rose y *Stenocereus thurberi* (Engelm) Buxb, *Pelecyphora aselliformis*, *Pelecyphora. Strobiliformis*, *Pilosocereus robinii* y *Mammillaria san-angelensis*, donde el cultivo *in vitro* ha sido una herramienta que ha contribuido al mantenimiento de sus poblaciones, puesto que se puede generar la proliferación de plantas, acelerar su crecimiento, y así favorecer su preservación y comercialización.

Con base en los antecedentes antes mencionados los objetivos de este estudio fueron: 1. Investigar si el mutante cromático (aclorofílico) *E. chamaecereus aurea* que se obtuvo en el germoplasma del Colegio de Postgraduados puede crecer, cultivarse y propagarse artificialmente a través del cultivo de tejidos sin la interacción con un patrón en un injerto; 2. Establecer el cultivo aséptico para inducir y multiplicar brotes y callos *in vitro* 3. Desarrollar el estudio histológico de los callos o brotes.

Los objetivos específicos fueron: 1. Determinar el efecto de la combinación hormonal de auxina y citocinina sobre la inducción y multiplicación de callos y activación areolar para la regeneración de plantas en el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962); 2. Comprobar si la consistencia física del medio de cultivo puede afectar la respuesta morfogénica y 3. Determinar el origen histológico de callos o brotes.

Las hipótesis de esta investigación fueron: 1. *E. chamaecereus* aurea puede crecer y multiplicarse bajo condiciones *in vitro* sin la interacción con un patrón, ya que en el medio de cultivo se incluyen los nutrimentos y compuestos orgánicos requeridos para asegurar su nutrición heterótrofa. 2. Las respuestas morfogénicas (callo o brotes) inducidas bajo condiciones de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son afectadas por la consistencia física del medio de cultivo y son controladas por una concentración y combinación específica de hormonas auxina-citocinina, como se ha observado en otras cactáceas. 3. A partir del estudio de los diferentes componentes histológicos de los callos de *E. chamaecereus* aurea, se podrán reconocer sus capacidades morfogénicas.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética y en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo*, México.

2.2.1 Material vegetal

Como material biológico experimental se utilizaron plantas jóvenes, sanas y vigorosas de un mutante cromático (aclorifílico) obtenido en germoplasma del Colegio de Postgraduados y crecidas bajo condiciones de vivero, las cuales fueron proporcionadas por el Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados (Figura 2.1-3).

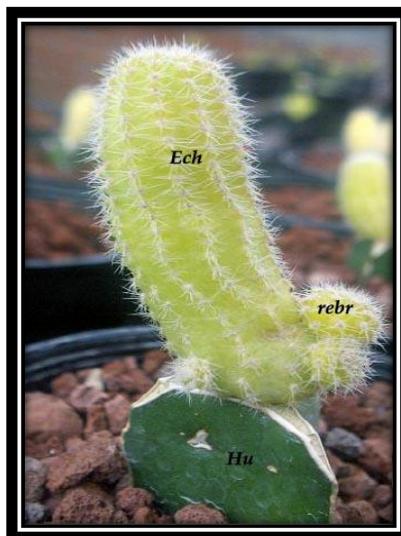


Figura 2. 3 Planta de *E. chamaecereus aurea* donadora de explantes. *Ech*=*E. chamaecereus aurea*; *Hu*: *H. undatus*; *rebr*: rebrotes jóvenes.

2.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico

2.2.2.1 Explantes

De las plantas madre en proceso de brotación, se separaron cuidadosamente brotes jóvenes de 1-2 cm de longitud, los cuales se lavaron con detergente y agua corriente durante 25 min para eliminar algunos contaminantes superficiales. Posteriormente los explantes, limpios se disecaron en segmentos de tallo con areola (Figura 2.4). Luego se introdujo un mm de explante en el medio de Murashige y Skoog MS (1962).

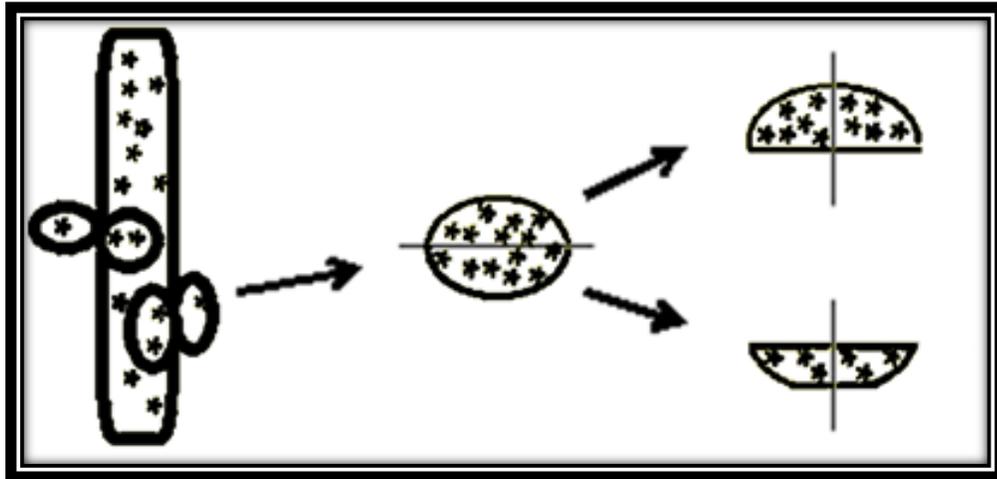


Figura 2. 4. Explantes de *E. chamaecereus aurea*.

Para establecer la desinfección superficial de los explantes se probaron nueve tratamientos conformados por diferentes agentes desinfectantes y tiempos de aplicación (Cuadro 2.2). Cabe mencionar que Cloralex® es hipoclorito de sodio comercial que contiene 6% de cloro activo; 30, 35 y 40% v/v) y Microdyn® (bactericida comercial a base de plata coloidal estable a 0.048%, 1.5%).

Cuadro 2. 2. Tratamientos de desinfección de tallos con areola de *E. chamaecereus aurea*.

Tratamientos (Núm.)	Desinfectantes	Tiempo (min.)
1	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	20
2	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	30
3	Captan® + Benlate® (4g L ⁻¹)	35
4	Cloralex® 30% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
5	Cloralex® 35% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
6	Cloralex® 40% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
7	Alcohol al 70%	3
8	Alcohol al 70%	5
9	Alcohol al 70%	10

Bajo condiciones asépticas (campana de flujo laminar horizontal, VECO®), los rebrotes se enjuagaron con agua destilada estéril y se sometieron a los diferentes tratamientos de desinfección superficial. Durante el tiempo de inmersión en cada tratamiento se agitó constantemente el recipiente que contenía los explantes para favorecer el contacto de la solución desinfectante con el tejido. Al finalizar cada tratamiento, se enjuagó varias veces el material vegetativo con agua destilada estéril para eliminar los restos del desinfectante.

2.2.2.2 Medio de cultivo básico

El medio de cultivo básico utilizado en este experimento fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (0.6%, (p/v) (Merck®). El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N, con un potenciómetro (Orión® modelo 611). Se dispensaron 10 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad y finalmente se esterilizaron en una autoclave vertical (AESAS®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm² de presión durante 20 min.

2.2.2.3 Condiciones de incubación

Los cultivos se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h proporcionado por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W (2500 lux), en una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $45 \text{ moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una humedad relativa de 30% durante 10 d.

2.2.2.4 Variables cuantificadas

Las variables evaluadas fueron: contaminación por microorganismos (%), oscurecimiento (%) y supervivencia de explantes (%) a los 10 d de la siembra *in vitro*.

2.2.3 Inducción de brotes y callo

Con la finalidad de estudiar la respuesta morfogénica (brote y callo) de los explantes se evaluaron 10 tratamientos hormonales constituidos por la combinación de 6-benciladenina (BA) (Sigma®) y ácido α -naftalenacético (ANA) (Sigma®) (Cuadro 2.3) y dos condiciones físicas del medio básico: sólido y líquido. El medio sólido se preparó con 0.6% (p/v) agar (Merck®) y en el medio líquido se utilizó papel filtro esterilizado (Dispositivo de Heller) como soporte. Esto dio como resultado un total de 20 tratamientos experimentales. Se usó el medio de cultivo básico descrito en la sección 2.2.2.2. Los explantes se incubaron en las condiciones descritas en el inciso 2.2.2.3.

Cuadro 2. 3. Relación de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio básico de MS (1962).

Tratamiento (núm.)	BA + ANA (mg L⁻¹)	BA + ANA (µM)
1 Testigo	0	0
2	1 + 1	4.4 + 5.35
3	1 + 2	4.4 + 10.7
4	1 + 3	4.4 + 16.05
	2 + 1	8.8 + 5.35
6	2 + 2	8.8 + 10.7
7	2 + 3	8.8 + 16.05
8	3 + 1	13.2 + 5.35
9	3 + 2	13.2 + 10.7
10	3 + 3	13.2 + 16.05

2.2.3.1 Variables cuantificadas

Las variables cuantitativas evaluadas fueron las respuestas morfogénicas generadas, que incluyeron: formación de callo por explante determinado como peso fresco de callo (PFC; g), activación areolar determinada por el número de brotes por explante y explantes que dieron respuesta (%) a los 30 d después de la siembra *in vitro*.

Las variables cualitativas observadas fueron: explantes hidratados, explantes oscurecidos, apariencia de callo y apariencia de brotes.

2.2.4 Multiplicación de brotes y callo

Con el propósito de estimar la etapa de proliferación y crecimiento de brotes y callos, los explantes iniciales, brotes generados y callos de la etapa de inducción, fueron transferidos (subcultivados) al mismo medio de inducción (descrito en la sección 2.2.2.2) cada 4 semanas (explantes iniciales, brotes y callos), por un periodo de 12 semanas, obteniéndose 3 registros de datos a los 60, 90 y 120 d después de la siembra *in vitro*. Los explantes se incubaron en las condiciones descritas en el inciso 2.2.2.3.

2.2.4.1 Variables cuantificadas

Las variables cuantitativas evaluadas fueron: peso de fresco de callo (PFC; g); brotes por explante por activación areolar (BEAR; %); longitud de los brotes (LB; mm).

Las variables cualitativas observadas fueron: explantes hidratados, explantes oscurecidos, apariencia de callo y apariencia de brotes.

2.2.5 Análisis histológico

Durante la etapa de multiplicación (60 d), se muestrearon callos y explantes con brotes. Las muestras se fijaron en una solución FAA (3.6% de formaldehído, 50% de etanol al 96%, 5% de ácido acético en 35% de agua destilada) (Ruzin, 1999). Los tejidos fijados se lavaron con agua destilada y se deshidrataron mediante un procesador de tejidos automático secuencial: etanol (50, 70, 96 y 100%), xilol (100%) y xilol:etanol (1:1), por 30 min en cada cambio. Las muestras se procesaron e incluyeron en parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Médium, McCormick Scientific®) orientadas para su corte longitudinal. Se obtuvieron cortes (10 µm) transversales y anticlinales con un micrótopo rotatorio (Spencer® de American Optical Company). Los cortes se adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina "0" y verde fijo FCF (Zavaleta y Engleman, 1994). Los cortes se observaron en un microscopio óptico (AxiosKop 2 Plus, ZEISS®) y se fotografiaron con una cámara digital (AxiosKop MRc5, ZEISS®).

Las etapas experimentales establecidas para determinar la respuesta morfogénica de *E. chamaecereus aurea* se resumen en la Figura 2.5.

2.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada variable de cada experimento se analizaron en un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones y la unidad experimental estuvo constituida por un explante en cada frasco. El análisis de varianza se hizo con el sistema de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias.

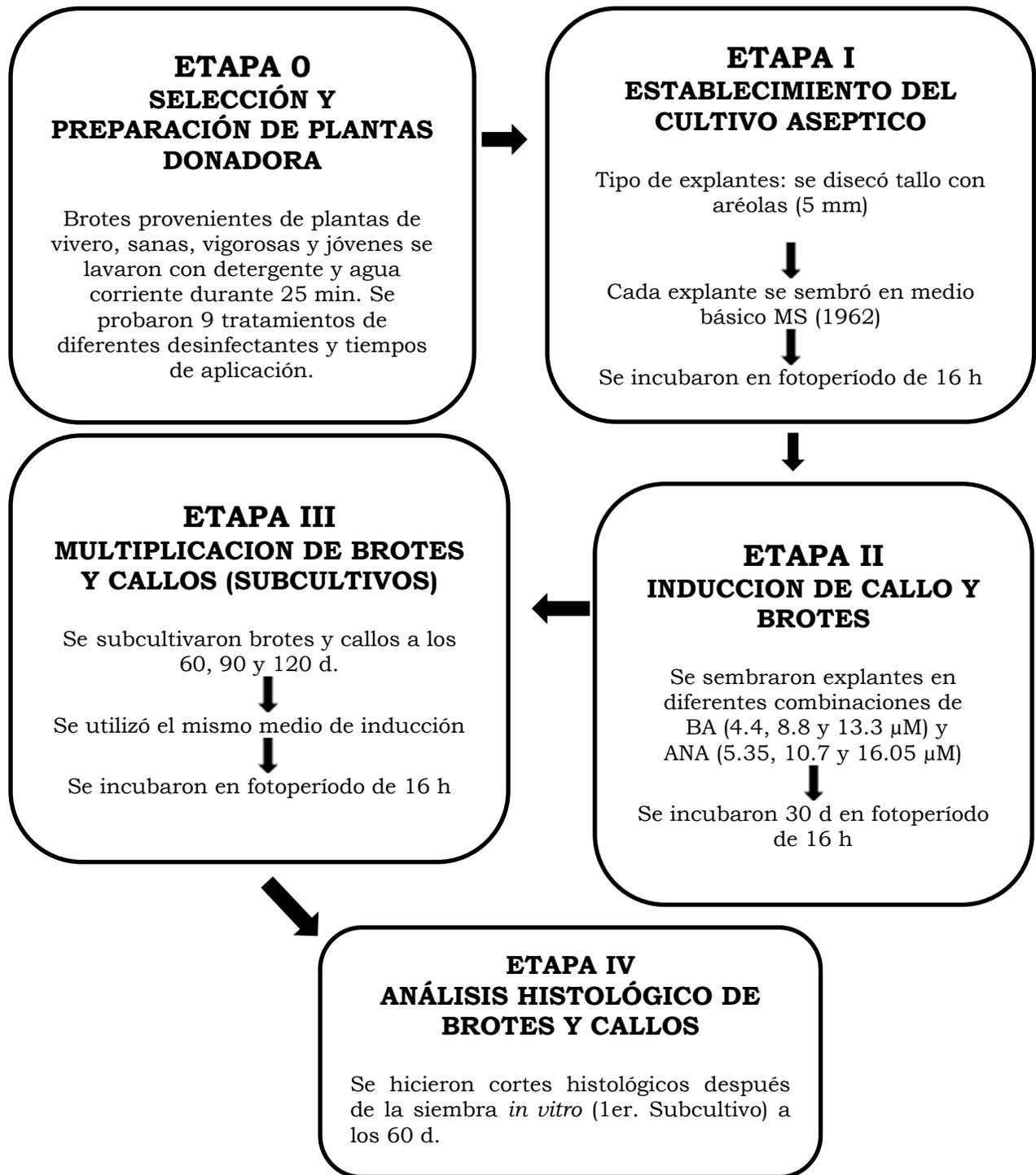


Figura 2. 5. Esquema de las etapas de la regeneración *in vitro* de *E. chamaecereus aurea* vía organogénesis directa e indirecta y análisis histológico de los brotes y callos.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico.

El método de desinfección empleado tuvo efectos significativos sobre los porcentajes de supervivencia, oscurecimiento y contaminación ($p \leq 0.05$) (Apéndice 2.1A). Los porcentajes de supervivencia de los explantes que se sometieron a tratamientos de desinfección se cuantificaron a los 10 d después de la siembra *in vitro* y variaron del 12 al 85 (Cuadro 2.4). Los porcentajes de contaminación obtenidos se pueden considerar aceptables (7 al 49%), ya que en este tipo de explantes la desinfección puede superar el 60% de explantes contaminados (Aparecida de Oliveira *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1998), e incluso hay registro de pérdida total de explantes, como por ejemplo, en la especie *Copiapoa* (Lema-Ruminska, 2011) causada, en la mayoría de los casos, por organismos fúngicos que comenzaron su desarrollo desde el centro de las areolas, donde existe una gran cantidad de gloquidios y espinas. Estos gloquidios puede alcanzar 1 cm de profundidad en la areola, como en *Eriosyce aurata*, proporcionando un refugio para esporas y otras estructuras de resistencia de diversos hongos. Este tipo de contaminación coincide con la encontrada en esta investigación, donde organismos fúngicos se desarrollaron desde el centro de la areola (Cuadro 2.4; Figura 2.6). Por su parte Pierik (1990) señala que el principal problema en el cultivo *in vitro* de areolas es el elevado nivel de contaminación al utilizar cactus cultivados *ex vitro*, donde la presencia de contaminación endógena y exógena es difícil de controlar mediante una esterilización superficial tradicional. Algunos trabajos han desarrollado procesos de doble desinfección, como los mencionados por Mroginski y Roca (1991), en los cuales los explantes son esterilizados superficialmente y luego de 3-4 d de cultivo los explantes sin contaminación son desinfectados nuevamente y llevados a condiciones *in vitro*.

Cuadro 2. 4. Porcentajes de supervivencia, oscurecimiento y contaminación de tallos con areolas de *E. chamaecereus* aurea provenientes de tratamientos de desinfección a los 10 d después de la siembra *in vitro*.

Desinfectantes	Supervivencia (%)		Oscurecimiento (%)		Contaminación (%)	
Captan [®] + Benlate [®] (4g L ⁻¹) 20 Min.	17	c	34	ba	49	a
Captan [®] + Benlate [®] (4g L ⁻¹) 30 Min.	13	c	46	a	40	a
Captan [®] + Benlate [®] (4g L ⁻¹) 35 Min.	12	c	45	a	43	a
Cloralex [®] 30%+Microdyn [®] 1.5%(V/V) 10 Min.	39	bac	28	ba	34	ba
Cloralex [®] 35%+Microdyn [®] 1.5% (V/V) 10 Min.	85	a	8	b	7	b
Cloralex [®] 40%+Microdyn [®] 1.5%(V/V) 10 Min.	69	ba	7	b	24	ba
Alcohol al 70% 3 min.	34	bc	31	ba	34	ba
Alcohol al 70% 5 min.	43	bac	20	ba	37	ba
Alcohol al 70% 10 min.	21	c	30	ba	48	a

^a Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 20.

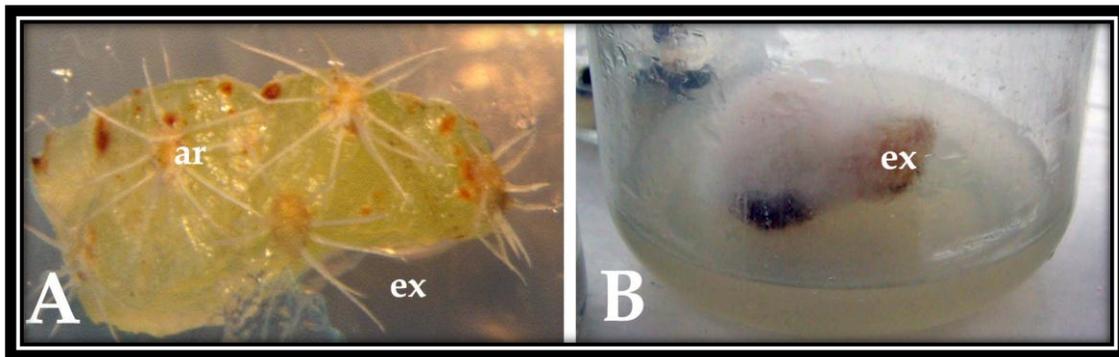


Figura 2. 6 Explantes de *E. chamaecereus* aurea cultivados *in vitro* con múltiples areolas. A) Explante libre de contaminación; B) Explante contaminado por hongos en etapa micelial. ex:explante; ar:areolas.

Con base en los resultados mostrados en el Cuadro 2.4 se pudo determinar que todos los tratamientos evaluados lograron reducir la contaminación. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos

($p \leq 0.05$). Para evaluar la efectividad de los tratamientos se tomó en cuenta el porcentaje de supervivencia encontrando que los explantes tratados con Cloralex® (35%) + Microdyn® (1.5% v/v) durante 10 min obtuvieron el 85% de supervivencia y oscurecimiento de 8%. Algunos tratamientos resultaron tóxicos para los tejidos, ya que después de la exposición a las soluciones desinfectantes los explantes se tornaron oscuros, alcanzando en algunos tratamientos de 30 a 46% en cuanto al cambio en la coloración del explante, en particular los explantes que se expusieron durante 10 min en alcohol al 70% y 35 min en Captan® + Benlate® (4 g L⁻¹) en donde desarrollaron el oscurecimiento en casi todo el explante. Tanto la efectividad del tratamiento como el daño al tejido viviente aumentaron en respuesta al tiempo y a la concentración, de manera que se debe buscar un equilibrio. Algunos alcoholes en concentraciones de 70 al 75% se emplean ampliamente como desinfectantes, pero son muy tóxicos para el material vegetal, de manera que su empleo está restringido a enjuagues de corta duración y a la esterilización de superficies externas de donde se obtienen los explantes del interior del órgano (Pierik, 1990).

2.3.2 Inducción de brotes y callo

Las dosis combinadas de BA + ANA afectaron significativamente el número de brotes por explantes y el peso fresco de callos ($p \leq 0.05$) (Apéndice 2.2A). Después de 30 d de la siembra *in vitro*, los explantes empezaron a mostrar dos respuestas morfogénicas como resultado del efecto de las condiciones de cultivo y las hormonas evaluadas: desarrollo de estructuras organizadas (brotes) y estructuras desorganizadas (callos). Los brotes regenerados fueron el resultado de la activación de la yema axilar presente en cada areola, lo cual originó consecuentemente el fenómeno de brotación directa. La organogénesis directa se manifiesta por su capacidad de regenerar plantas a partir de areolas de tubérculos (Moebius *et al.*, 2003), la cual es considerada como uno de los métodos más exitosos, destacando la estabilidad genética del material

producido y la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas (Rubluo *et al.*, 2002). Durante este proceso, se observó inicialmente un hinchamiento a los 12 d en medio de inducción que prosiguió con la formación de pequeñas protuberancias areolares que se convirtieron en brotes a los 20 d en este medio. La brotación se presentó activamente de forma homogénea para todos los tratamientos (Figura 2.7).

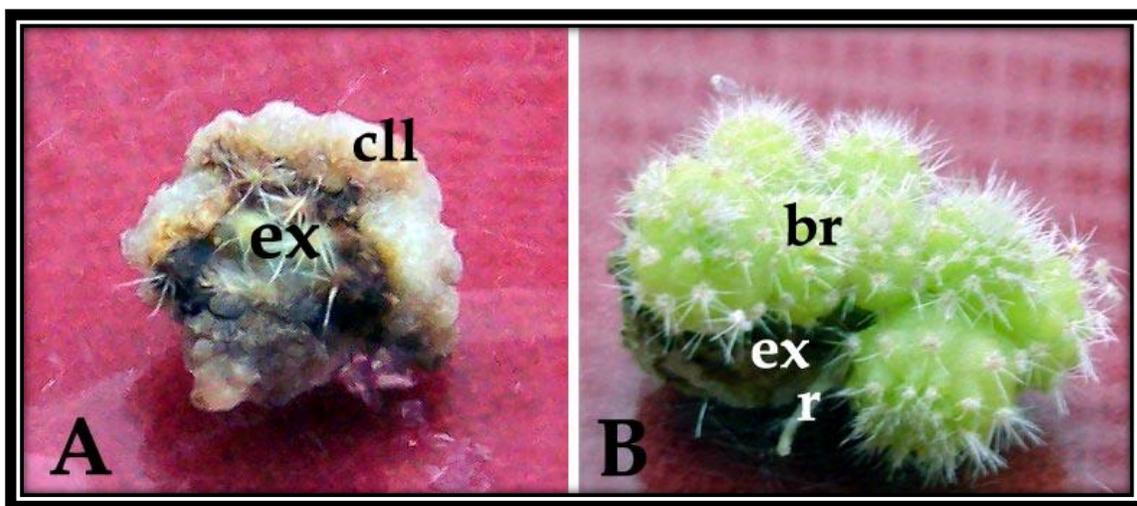


Figura 2. 7. Explantes con areolas de *E. chamaecereus aurea*. A) Explante con callo; B) Explante con brotes en medio MS (1962) suplementado con BA 13.2 μ M y ANA 5.35 μ M. ex:explante; cll:callo; br:brotes; r:raíz.

En general, se observó que la activación areolar y el desarrollo directo de brotes se llevó a cabo de manera exponencial en los explantes que fueron cultivados en los tratamientos que incluyeron concentraciones elevadas de citocininas, como se observó con los tratamiento con 13.2 μ M de BA. Sin embargo, los niveles de citocininas evaluados y la combinación con diferentes concentraciones de auxinas dieron como resultado variaciones en cuanto al número de brotes producidos, por lo que se puede resumir que los explantes de *E. chamaecereus aurea* respondieron positivamente a la combinación auxina + citocinina. De estas combinaciones, se observó que los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones más altas de citocininas y bajas de auxinas: BA (13.2 μ M) y ANA (5.35 μ M) (Cuadro 2.5), ya que generaron el

mayor número de brotes por explante (12.6) seguido del tratamiento con BA (13.2 μM) y ANA (10.7 μM) con 11.3 brotes (Figura 2.5).

Cuadro 2. 5. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la inducción de brotes areolares y callos de *E. chamaecereus aurea* a los 30 d después de la siembra *in vitro*.

BA + ANA (mgL^{-1})		BA + ANA (μM)		Brotos por explante (núm.) ^z	Longitud de explantes (mm) ^z	Callo por explante (g) ^z
0		0		0 f	0 c	1.8 d
1	1	4.4	5.35	4.5 d	1.7 b	1.4 dc
1	2	4.4	10.7	4.0 ed	4.6 ba	1.0 d
1	3	4.4	16.05	3.0 e	5.1 ba	2.7 ba
2	1	8.8	5.35	7.5 cb	5.4 a	1.1 d
2	2	8.8	10.7	6.7 c	4.7 ba	1.5 dc
2	3	8.8	16.05	4.4 d	5.3 ba	2.2 bac
3	1	13.2	5.35	12.6 a	5.0 ba	1.8 bdc
3	2	13.2	10.7	11.3 a	5.0 ba	1.4 dc
3	3	13.2	16.05	8.5 b	5.0 ba	3.0 a

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 20$.

En especies estudiadas como *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006), *Escobaria minima* (Baird) D. Hunt, *M. pectinifera* (Ruempler) F.A.C.Weber y *Peleciphora aselliformis* Ehrenberg (Giusti *et al.*, 2002) también se han utilizado diferentes cantidades de citocininas en combinación con dosis mínimas de auxinas y todos los resultados han sido satisfactorios para cada especie, ya que se produjo un aumento del material vegetal inicial para proveer explantes al igual que lo encontrado con esta investigación. Estos experimentos sugieren que las citocininas son esenciales para la generación de brotes a través de la activación areolar. Estos datos son consistentes con datos reportados para *Epithelanta micromeris*, donde Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana (2001) establecieron una técnica de micropropagación mediante la proliferación de brotes axilares, en la que utilizaron CIN y una combinación de 2iP + ANA, siendo la concentración óptima para la brotación 12 mg L^{-1} CIN

donde obtuvieron una media de 17.2 brotes por explante y 4 mg L⁻¹ 2iP + 0.20 mg L⁻¹ ANA con una respuesta de 14.7 brotes por explante. Por su parte Mata-Rosas *et al.* (2001) lograron inducir brotes adventicios en *Turbinucarpus laui* al utilizar de 8.8 a 13.31 μM BAP + 0 a 2.6 μM ANA en medio de cultivo MS; sólo que estas investigaciones no detallan en tiempo exacto de los datos pero considerando estos resultados para 30 d en medio de inducción se puede asumir que los tratamientos están siendo efectivos en esta especie.

La dediferenciación a tejido calloso (Figura 2.7) se presentó en todos los explantes desarrollados en medio de cultivo sólido suplementado con hormonas, formándose en la superficie del corte y en la región de la base del explante, lo cual es similar a lo observado en especies como *Turbinucarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001) y *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002). Los callos de *E. chamaecereus aurea* fueron característicamente firmes y densos, es decir, de consistencia dura o compactos. También se observó que siempre que los explantes se cultivaron en tratamientos con concentraciones elevadas de auxina presentaron mayor cantidad de callo, en particular en el tratamiento con BA (13.2 μM) y ANA (16.05 μM), el cual produjo el mayor crecimiento promedio de callo con 3.0 g, y se confirmó con el peso fresco del callo en los tratamientos con 16.05 μM de ANA y bajas concentraciones de BA (4.4 y 8.8 μM) donde también se lograron pesos promedio de callo entre 2.74 y 2.28 g (Cuadro 2.5). Estos resultados coinciden con las principales funciones fisiológicas naturales de las auxinas que están relacionadas con el control de elongación celular, expansión de tejidos, división celular (formación de callos); el establecimiento de tejidos diferenciados puede inducir a fase de callo, que mediante un equilibrio de fitohormonas logran inducir a la embriogénesis somática. Su uso comercial y aplicación en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se relaciona con el control de la formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, observando con mayor frecuencia embriogénesis somática cuando se establecen cultivos de células en suspensión, y su empleo como herbicidas (Pierik, 1990). Su acción

individual o su interacción con citocininas, así como su concentración y el tipo de compuesto usado determinan el éxito de las respuestas organogénicas observadas durante las diversas técnicas de propagación.

Además, en la presente investigación se observó que la consistencia física del medio de cultivo fue el factor principal que determinó la respuesta morfogénica de los explantes. Sólo los explantes cultivados en medio sólido presentaron activación areolar y formación de callo, ya que en los medios líquidos con soporte de papel filtro (Dispositivo de Heller) no se obtuvieron brotes en ningún tratamiento hormonal (datos no presentados); además, se observó un oscurecimiento completo y apariencia de hiperhidratación en cada explante (Figura 2.8). Esta respuesta coincide con lo reportado por Pedraza (2004), quien menciona que la consistencia del medio de cultivo puede controlar la diferenciación o influir en la propagación de una especie vegetal. Dicha característica de oscurecimiento e hiperhidratación es muy común en el cultivo de tejidos y está relacionada con las diferentes condiciones del cultivo como: contenido de sales, agente gelificante, concentración hormonal, condiciones lumínicas y humedad relativa, siendo éste el factor clave para explicar estas anormalidades producidas *in vitro* (Yadav *et al.*, 2003). En las especies de *Mammillaria pectinifera* (Ruempler) F.A.C.Weber y *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg se observó durante la multiplicación una frecuencia de 64% de hiperhidratación de brotes (Giusti *et al.*, 2002), cuyas características morfológicas y anatómicas intervienen en la aclimatación y el trasplante, causando tasas de supervivencias bajas (Coca-Soriano *et al.*, 2007; Vitória Resende *et al.*, 2010).

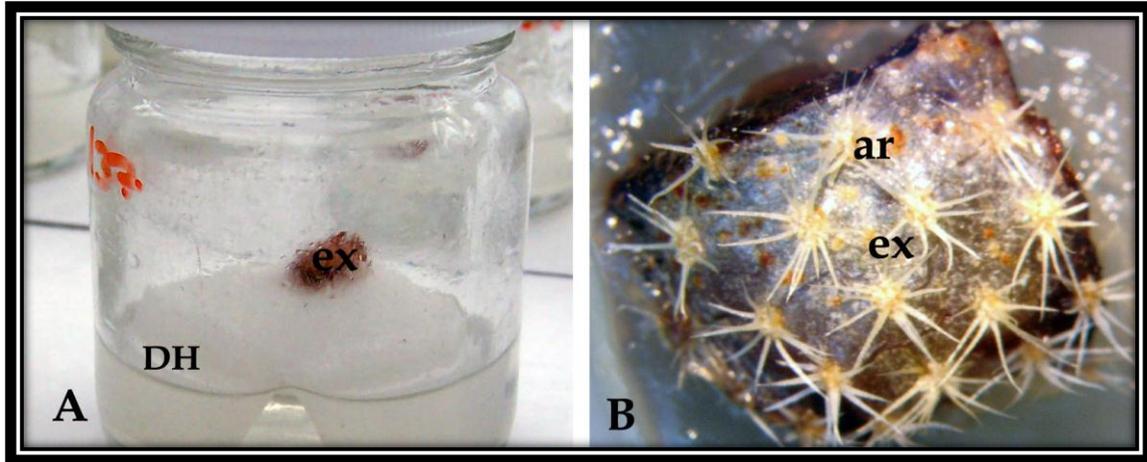


Figura 2. 8. Explantes de *E. chamaecereus aurea* sembrado en medio líquido MS (1962) a los 30 d después de la siembra *in vitro*. A) En dispositivo de Heller; B) Explante hiperhidratado y con 100% de oscurecimiento. ar:areola; ex:explante; DH:dispositivo de Heller.

Tanto la activación areolar como formación de callo en los explantes cultivados en medio de consistencia sólida, pudo deberse a que la absorción de nutrimentos es más baja y no se difunden rápidamente y existe menos oxígeno disuelto disponible que es más favorable para el cactus. Estas ventajas son importantes si se considera que en el cultivo *in vitro* la absorción de nutrimentos por los explantes se da principalmente mediante el proceso de difusión, debido a que estos carecen de sistema radical y tienen una tasa de transpiración baja, además, en el medio de cultivo líquido frecuentemente se obtienen tasas de desarrollo más elevadas que en el medio sólido y los metabolitos tóxicos que se acumulan cerca del tejido pueden difundirse rápidamente (Pedraza, 2004). En la mayoría de las especies propagadas *in vitro*, el agar es el agente gelificante más usado para la solidificación de medios porque es un compuesto estable a las temperaturas de incubación, no reacciona con los constituyentes del medio de cultivo y no lo digieren las enzimas de las plantas (Pierik, 1990).

2.3.3 Multiplicación de brotes y callo

Las dosis combinadas de BA + ANA afectaron significativamente la multiplicación brotes por explante (núm.) a los 60, 90 y 120 d ($p \leq 0.05$) así como el peso fresco de callos (g) a los 60 y 90 d (Apéndice 2.3A-5A). El callo formado durante la etapa de inducción se separó del explante con un bisturí y se subcultivó a un medio de cultivo fresco (medio de inducción). El callo se mantuvo bajo cultivo durante 60 d más, al termino de este plazo, no se obtuvo la diferenciación o regeneración de brotes o raíces, sólo se logró observar un reducido crecimiento en forma de tejidos desorganizados en los tratamientos con BA (4.4 μM , 8.8 μM y 13.2 μM) y ANA (16.05 μM) con un peso fresco de callo de 2.3 a 2.7 g a los 60 d (Cuadro 2.6). Después de este tiempo, el peso fresco de callo no aumentó, los callos se hicieron viejos, lo cual resultó en una paulatina necrosis y muerte de los tejidos (90 d) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2. 6. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante, longitud de explantes y peso fresco de callo durante la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus aurea* a los 60 d después de la siembra *in vitro*.

BA + ANA (mgL^{-1})		BA + ANA (μM)		Brotes por explante (núm.) ^z		Longitud de explantes (mm) ^z		Peso fresco de callo (g) ^z	
0		0		0	g	0	c	0	c
1	1	4.4	5.35	9	f	11.1	b	1.4	dc
1	2	4.4	10.7	14	e	12.6	ba	0.9	c
1	3	4.4	16.05	11	f	12.3	ba	2.4	ba
2	1	8.8	5.35	21	d	12	ba	0.9	c
2	2	8.8	10.7	24	d	12.6	ba	1.57	bc
2	3	8.8	16.05	16	e	13.6	ba	2.3	bac
3	1	13.2	5.35	30	a	14.6	a	1.8	bdc
3	2	13.2	10.7	27	b	12.9	ba	1.4	bc
3	3	13.2	16.05	26	c	12.6	ba	2.71	a

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) n = 20.

Cuadro 2. 7. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante, longitud de explantes y peso fresco de callo durante la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus aurea* a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

BA + ANA (mgL ⁻¹)		BA + ANA (µM)		Brotes por explante (núm.) ^z		Longitud de explantes (mm) ^z		Peso fresco de callo (g) ^z	
0		0		4.5	f	4.6	b	0	c
1	1	4.4	5.35	20	ef	27.9	a	1.4	dc
1	2	4.4	10.7	23	dc	31.3	a	0.9	c
1	3	4.4	16.05	20	de	28.9	a	2.4	ba
2	1	8.8	5.35	25	bc	31.0	a	0.9	c
2	2	8.8	10.7	25	bc	30.0	a	1.5	bc
2	3	8.8	16.05	24	bc	29.9	a	2.3	bac
3	1	13.2	5.35	30.5	a	31.0	a	1.8	bdc
3	2	13.2	10.7	27	ba	29.6	a	1.4	bc
3	3	13.2	16.05	26	bc	29.3	a	2.7	a

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 20.

Por otro lado, durante la etapa de multiplicación de callo (Cuadro 2.6 y 2.7) en la variable peso fresco de callo no se observó una clara tendencia al crecimiento y después del segundo subcultivo este callo no siguió su desarrollo y se ennegreció (90 d). Pierick (1990) menciona que si el crecimiento de callo se detiene después del subcultivo es porque el medio no es el adecuado para su desarrollo y puede ser necesario modificar las concentraciones de hormonas, además de que es recomendable dejar el callo unido a una sección pequeña del explante. En esta investigación se postula que el tipo y concentración hormonal presente en el medio de cultivo influye en la respuesta de los explantes y se puede resaltar que ni los tratamientos evaluados ni las condiciones de cultivo establecidas fueron capaces de desdiferenciar las estructuras caulogénicas e inducir la formación de estructuras organizadas. Aunque los resultados varían de acuerdo a la especie en cuestión, al igual que en esta investigación, García-Rubio y Malda-Barrera (2009) desarrollaron un protocolo de micropropagación para *Mammillaria mathildae*, una cactácea endémica de Querétaro, México, y

en peligro de extinción, usando diferentes concentraciones de BAP, AIA y sin hormonas en el medio MS (1962) y diferentes tipos de explantes (apical, lateral y basal); los tratamientos con hormonas desarrollaron abundante callo y no produjeron brotes, siendo los tratamientos más efectivos para la brotación los tratamientos sin hormonas y específicamente los explantes de la parte apical y lateral (1.14 ± 0.7 y 4.09 ± 0.13 brotes por explante, respectivamente) sin producción de callo.

Otros estudios demuestran que la capacidad morfogénica de los cactus está limitada por factores hormonales ya que, como se ha mencionado, se necesita encontrar el balance hormonal adecuado para desarrollar las respuestas morfogénicas deseables, por lo que futuros estudios deben encaminarse a determinar la respuesta organogénica o embriogénica de esta especie (Minocha y Mehra 1974).

Al separar los brotes regenerados de los explantes mediante un corte con el bisturí y cultivarlos en medio fresco, éstos continuaron creciendo, formaron nuevos brotes y en algunos casos desarrollaron flores (Figura 2.9).

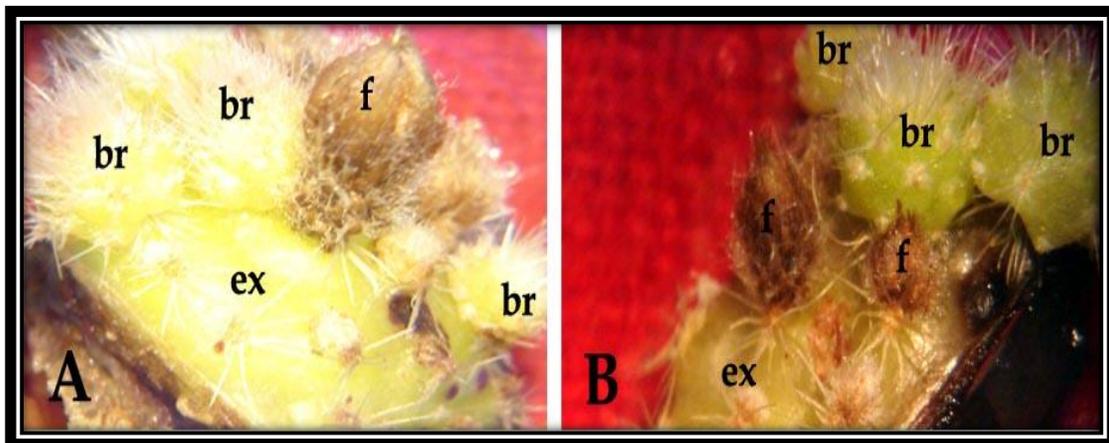


Figura 2. 9. Multiplicación de brotes de *E. chamaecereus aurea* en medio MS (1962) suplementado con BA (13.2 μ M) y ANA (16.05 μ M). A. Desarrollo de flores; B. Desarrollo de brotes areolares y flores a partir de la activación de areola. ex:explante; br:brote; f:flor.

Durante los subcultivos de *E. chamaecereus* aurea se pudo apreciar un incremento en el número de brotes, cuando los explantes fueron cultivados en la etapa de multiplicación se observó que se formaron de 14 hasta 55 brotes en promedio por explantes en la concentración más elevada de BA (13.2 μM) en combinación con ANA (5.35 μM) en cada subcultivo (60, 90, 120 d) (Cuadro 2.6-8).

Cuadro 2. 8. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante y longitud de explantes durante la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus* aurea a los 120 d después de la siembra *in vitro*.

BA + ANA (mgL ⁻¹)		BA + ANA (μM)		Brotos por explante (núm.) ^z	Longitud de explantes (mm) ^z
0	0	0	0	5.3 g	23.0 c
1	1	4.4	5.35	26 f	45.6 a
1	2	4.4	10.7	32 de	45.5 a
1	3	4.4	16.05	30 e	47.9 a
2	1	8.8	5.35	39 c	44.2 a
2	2	8.8	10.7	35 dc	43.5 a
2	3	8.8	16.05	51 bc	46.3 a
3	1	13.2	5.35	55 a	47.3 a
3	2	13.2	10.7	37 c	42.7 a
3	3	13.2	16.05	38 c	31.4 b

^zMedias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n = 20$.

Los datos obtenidos en este estudio coinciden con la mayoría de los resultados obtenidos en otras especies que han expresado una respuesta favorable en concentraciones más elevadas de citocininas, como se documenta en los reportes de Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) en *Mammillaria formosa*, *Nyctocereus serpentinus*, *Peleciphora aselliformis* y *P. strobiliformis* en donde lograron la mayor multiplicación de brotes con 2.2 y 4.4 μM de BA. En otros reportes, diversos autores encontraron los mejores resultados en concentraciones que van desde 2.32 μM hasta los 3.72 μM de citocinina como

se encontró para el género *Opuntia* spp. (Estrada-Luna, 2008), así como en *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010), *Turbinucarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). Algunas especies de cactus responden mejor inclusive a concentraciones todavía más elevadas que las que se están reportando (Juárez y Passera, 2002). Para *Pelecyphora aselliformis* la mejor concentración resultó ser 23 μM de cinetina, mientras que el medio suplementado con 22 μM de BA fue el óptimo para *Escobaria Mínima* y *Mammillaria pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002), lo cual indica que tanto el tipo como los niveles de citocinina, requieren ser probadas experimentalmente para cada especie.

Los rendimientos en la activación areolar y producción de brotes reportados en este trabajo (55 en promedio por explante) (Figura 2.10) son superiores a los reportados para otras especies de cactus como es el caso de *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) con 14.9 brotes; *Turbinucarpus laui* con 13.7 brotes (Mata-Rosas *et al.*, 2001); *Ariocarpus kotschoubeyanus* con 7 brotes (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); *Turbinucarpus pseudopectinatus* con 19 brotes, *Turbinucarpus valdezianus* con 8 brotes (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) y en el caso de *Opuntia* 20 brotes (Estrada-Luna, 2008). En las investigaciones antes mencionadas, la diferenciación de brotes fue el resultado de la activación de las yemas axilares pre-existentes en la estructura areolar, por lo que el fenómeno observado fue la brotación o rebrotación directa, lo cual implicó romper la dormancia de las áreas meristemáticas previamente diferenciadas. Esto indica que se puede mantener y seguir generando brotes potencialmente morfogénicos después del período de inducción, un efecto reportado para las diferentes especies de cactus (Pérez-Molphe -Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

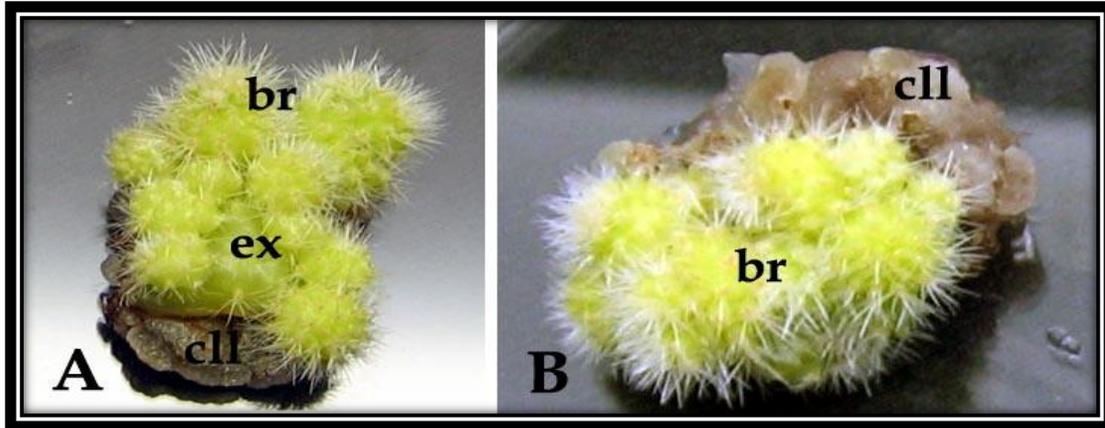


Figura 2. 10. Multiplicación de brotes de *E. chamaecereus aurea* en el medio MS (1962) adicionado con citocinina-auxina (BA 13.2 μM y ANA 5.35 μM). A. A los 60 d; B. A los 90 d después de la siembra *in vitro*. ex:explante; br:brote; cII:callo.

En los brotes obtenidos se presentaron valores de hasta 48 mm de altura en promedio para la combinación 4.4 y 13.2 μM de benciladenina con 5.35 μM de ácido naftalenacético (Cuadro 2.8) (Figura 2.10), observándose en cada subcultivo que es factible que el desarrollo de raíces en los explantes cultivados (Figura 2.9) en este tratamiento sea un factor de ventaja que permite una mayor absorción de nutrimentos del medio y consecuentemente el incrementar sus tasas de crecimiento. Por otra parte, la variable número de brotes mostró una diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados y prácticamente se conservó la tendencia de aumentar en cada subcultivo. Esta observación indica que posiblemente con niveles más elevados de BA se pudieran alcanzar mayores respuestas para la proliferación de brotes que la presentada en esta investigación.

Con los resultados obtenidos en esta investigación es posible desarrollar un protocolo que permita la formación de un número significativo de brotes considerando el tiempo y las concentraciones hormonales utilizadas en este trabajo a partir de los explantes con areolas, que son recomendados para inducir la formación de brotes por activación areolar. En contraste, los

resultados experimentos efectuados en *Escobaria mínima* (Mata-Rosas *et al.*, 2001) demostraron que el número de yemas axilares fue significativamente menor en explantes basales, y mencionan que la eliminación de la parte apical de los explantes aumenta la micropropagación, aunque no indican el número de brotes obtenidos.

Giusti *et al.*(2002) y Mohamed-Yasseen (2002) encontraron que los explantes decapitados desarrollan más brotes y que generan mayor número de brotes que los explantes longitudinales, pero indicaron que para ambos tipos de explantes, los brotes se desarrollan más en la parte distal. También se observó que la tasa de formación de número de brotes disminuye de 45.0 a 15.2 en los siguientes subcultivos lo que no coincide con esta investigación, ya que en este trabajo se apreció un incremento cada vez que se hicieron los subcultivos en medio fresco durante los 120 d.

Los brotes obtenidos progresaron en su crecimiento y se observó 20% de enraizamiento espontáneo (90 d) (Figura 2.11) al igual que lo reportado por Dávila-Figueroa (2005) en las especies de *Turbiniacarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, *T. subterraneus*, y *T. valdezianus*. La similitud en los resultados sugiere que muchas especies de cactus logran regenerar raíces cuando sus brotes son cultivados *in vitro* sin la presencia de hormonas (Taiz y Zaiger, 2007), incluyendo entre estas a varios cactus como *Opuntia* spp. (Estrada-Luna *et al.*, 2008), *Pilocereus robinii* (Quijala *et al.*, 2009), *Hylocereus undatus* (Mohamed-Yasseen, 2002) y *Turbiniacarpus laui* (Mata *et al.*, 2001).



Figura 2. 11. Brote de *E. chamaecereus aurea* con desarrollo de raíz a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

Los resultados encontrados para diferentes especies en diversos estudios registran valores promedio de brotes por explante que van de 0 hasta 128 (Malda *et al.*, 1999; Rubluo *et al.*, 2002; Pérez Molphe y Dávila Figueroa, 2002), dependiendo de la hormona empleada y de la especie estudiada. No obstante prácticamente en ninguno de estos estudios se hace referencia al origen del explante, no detallan los procesos de desinfección ni del porcentaje de supervivencia y tampoco si hubo alguna diferencia significativa respecto al mismo explante, aunque de igual manera parece existir una diferencia de respuesta dependiendo de la especie evaluada (Giusti *et al.*, 2002). Con base en lo antes mencionado se observa que los resultados de esta investigación están ubicados en el promedio general de explantes generados (500) y en un periodo de tiempo similar al reportado (120 d) en comparación con otras especie de cactáceas (Ramírez-Malagón *et al.* 2007; Ruvalcaba-Ruiz *et al.* 2010). Dichos trabajos mencionan un tiempo estimado de 60 d para la máxima y óptima generación de brotes en los géneros *Mammillaria* y *Coryphantha*. Sin embargo, Cardarelli *et al.* (2010) reportaron para *Obregonia denegrii* periodos similares a los mencionados en esta investigación de 120 d.

2.3.4 Análisis histológico

El callo generado en los explantes de *E. chamaecereus* aurea no presentó formación de brotes de origen organogénico o embriogénico ni durante los cultivos iniciales ni después de los subcultivos. Se caracterizó por una consistencia compacta, color amarillento pardo y crecimiento lento (Figura 2.12). El callo está formado por dos tipos de células: parénquima de células isodiamétricas de crecimiento irregular y haces vasculares dispersos con elementos traqueales caracterizados por elementos de vaso con engrosamiento helicoidal.

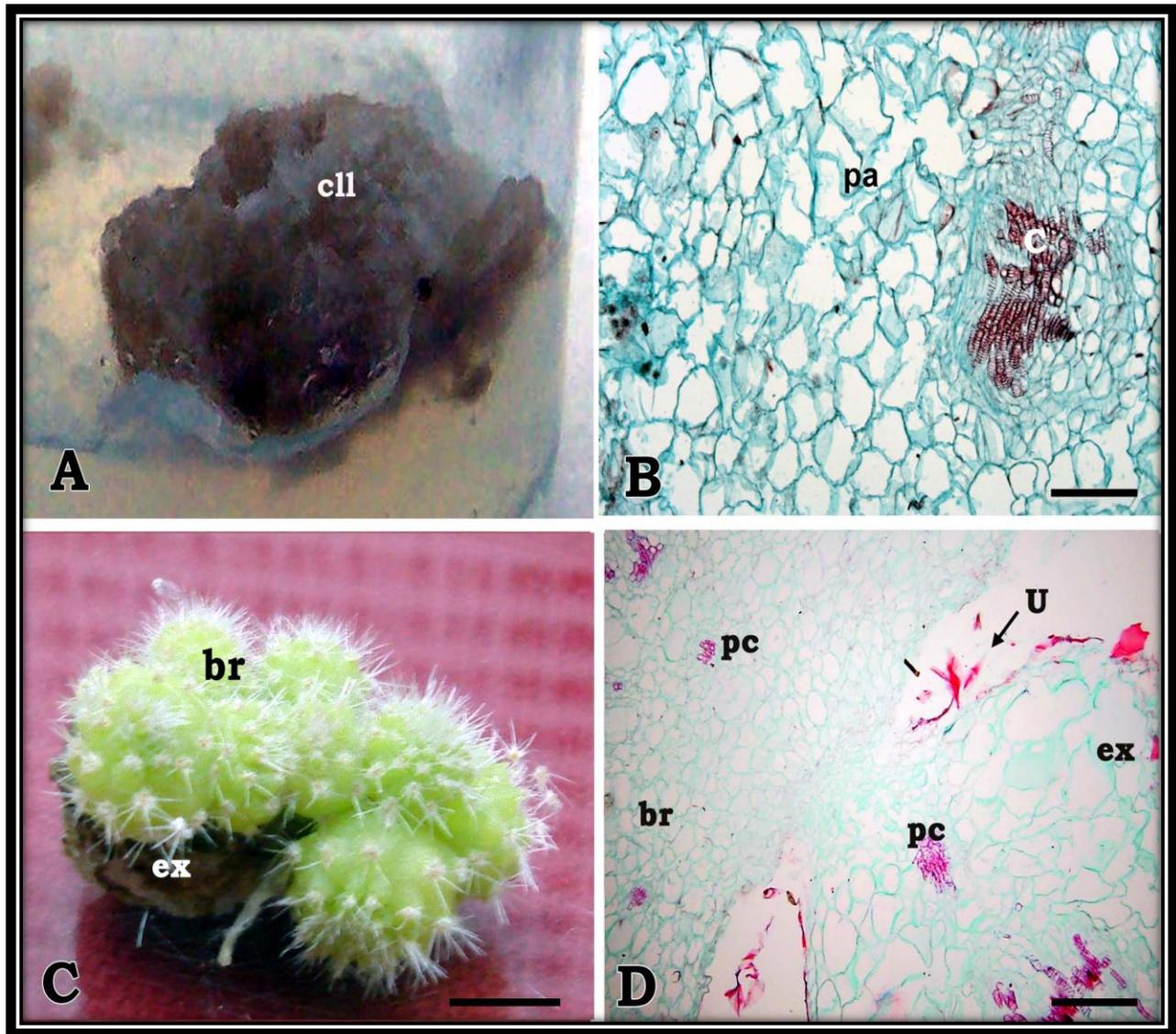


Figura 2. 12. Morfología y anatomía de los brotes y callos obtenidos de *E. chamaecereus aurea*. A) Morfología del callo; B) Anatomía de una sección longitudinal de callo a 30 d de desarrollo en medio solidificado de MS (1962) adicionado con BA (13.2 μ M) y ANA (5.35 μ M); C) Morfología de los brotes obtenidos a partir de la activación areolar a los 90 d de incubación; D) Anatomía de una sección longitudinal de explante con brote. A y C barra=0.5 mm; B y D barra =100 μ m; cll:callos; ex:explante; br:brotes; u:unión; pa:parénquima; c:procambium.

2.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se lograron cultivar y propagar plantas de *Echinopsis chamaecereus* aurea por medio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* sin la interacción con un patrón en un injerto.

El mejor tratamiento para desinfectar los explantes fue cloro comercial marca Cloralex® al 35% (hipoclorito de sodio comercial con 6% v/v de cloro activo) más 1.5% Microdyn® (plata coloidal estable a 0.048%) durante 10 min, con el cual se obtuvo una supervivencia de 85%, 7% de contaminación y 8 % de explantes con oscurecimiento.

La mayor cantidad de brotes por explante (55) se obtuvo por activación areolar a los 120 d en medio MS (1962) adicionado con BA 13.2 μM y ANA 5.35 μM .

La mejor inducción de callo (2.7 g de peso fresco) se consiguió a los 90 d con BA (13.2 μM) y ANA (16.05 μM) en medio básico MS (1962).

La consistencia física del medio de cultivo es un factor determinante en la respuesta morfogénica producida en los explantes, ya que el medio sólido indujo la activación areolar y la formación de callo y el medio líquido con puente de papel filtro (dispositivo de Heller) provocó el oscurecimiento e hiperhidratación sin morfogénesis.

El análisis anatómico mostró que el callo no generó brotes organogénicos ni embriogénicos, constando sólo de tejido fundamental.

2.5. LITERATURA CITADA

- Aparecida de Oliveira S, Machado MFPS, Prioli AJ, Mangolin CA (1995) *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol* 37:47–50.
- Arias M., S., S. Gama López y L.U. Guzmán C (1997) Cactaceae. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 14. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bárcenas RT (2011) Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas* 68:11-15.
- Boyle TH, Anderson EF (2002) Biodiversity and Conservation. *In: Cacti: Biology and Uses*, (Nobel P S, Ed). University of California Press 125-141 pp.
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L (1999) El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. UNAM. México.
- Cardarelli M, Borgognone D, Colla G (2010) *In vitro* propagation of *Obregonia denegrii* (Cactaceae). *Propagation of Ornamental Plants*, 10: 29-36.
- Chávez V, Mata M, Moebius K, Monroy A (2001) Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 37: 400-404.
- CITES (1992) Cactaceae checklist. Ed: D. Hunt. Royal Botanic Gardens, Kew Surrey. ISBN 0 947643427.
- Coca-Soriano E, Ortiz-Montiel JG, Sánchez-Correa S, Pérez-Crisanto J (2007) Efecto de la irradiación luminosa en la aclimatación de *Mammillaria carmenae* Castañeda (Cactaceae) proveniente de cultivo *in vitro*. *Cactáceas Suculentas Mexicanas* 72: 101-108.
- Davila-Figueroa CA, De la Rosa-Carrillo ML. Perez-Molphe-Balch E (2005) *In Vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology Plant* 41: 540–545.
- Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ, Torres-Torres ME, Chablé-Moreno F (2008) *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck. and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385.

- García -Rubio OR, Malda-Barrera GX (2009) Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro. CIENCIA@UAG 2:3-16.
- García-Saucedo PA, Valdez-Morales M, Valverde ME, Cruz-Hernández A, Paredes-López A (2005) Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 215–219.
- Gusti P, Vitti D, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F, Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae 95: 319-332.
- Hirao H (1995) Cacti, past and present. Succulent 335:4-6.
- Jiménez-Sierra CL (2011) Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. Revista digital univesitaria.12:3-23.
- Juárez MC, CB Passera (2002) *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. Biocell 26:319-324.
- Malda G, Suzán H, Backhaus R (1999) *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81: 71 – 87.
- Mata-Rosas M, Monroy de la Rosa MA, Moebius-Goldammer K, Chavez-Avila VM (2001) Micropropagation of *Turbiniocarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. In Vitro Cell Development Biology Plant 37:400–404.
- Minocha SC, Mehra PN (1974) Nutritional and morphogenic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller. (Cactaceae)*American Journal of Botany*, 6: 168- 173.
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chavez-Avila VM (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. In Vitro Cell Development Biology Plant 39:388-393.
- Mohamed-Yasseen Y (2002) Micropropagation of pitaya (*hylocereus undatus* britton *et* rose). In Vitro Cell Development Biology Plant 38:427–429.
- Mroginski L, Roca W (1991) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* Editorial CIAT. Cali Colombia. p. 969.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum* 15: 473-497.
- Nobel PS (2002) *Cacti: biology and uses*. University of California Press. 280 p.
- Pedraza –Santos ME (2004) Regeneración *in vitro* de *Alstroemeria* sp. Tesis de Doctorado. Colegio de postgraduados. Montecillos. Texcoco. Edo de México.
- Pelah D, Kaushik RA, Mizrahi Y, Sitrit Y (2002) Organogénesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.
- Pérez E, Pérez M, Davila C, Villalobos E (2002) *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hortscience* 37: 693 – 696.
- Pérez E, Pérez M, Villalobos E, Meza E, Morones L, Lizalde H (1999) Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular Development Biology Plant*. 34:131-135.
- Perez-Molphe-Balch E. y Davila-Figueroa CA (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora Aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38: 73-78.
- Pierik RLM (1990) *Cultivo in vitro de las planta superiores*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España 326 p.
- Quijala E, Matos J, Montalvo G, de Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N, Barbón R, Kowalski B (2009) *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles *et* Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11: 18-25.
- Quijala E, Montalvo G, Matos J (2004) Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4:195-199.
- Ramirez-Malagon R, Aguilar-Ramirez I, Borodanenko A, Perez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 660-665.
- Rubluo A, Marín-Hernández T, Duval K, Vargas A, Márquez-Guzmán J (2002) Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95: 341-349.

- Ruvalcaba-Ruiz D, Rojas-Bravo D, Valencia-Botin AJ (2010) Propagación *in vitro* de *Coryphanta Retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:139-143.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique Microscopy*. Oxford University Press, 322 pag.
- SAS Institute (2003) *SAS/STAT User's Guide*. Release 9.1 Ed. Cary, NC. USA.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. 4 ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 690 p.
- Velázquez-Enciso LE, Soltero-Quintana R (2001) Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber *ex* Britton *et* Rose, var. *micromeris*, *cactaceae*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46: 56-62.
- Vitória Resende S, Lima-Brito A, Raniere-Ferreira de Santana J (2010) Effect of substrate and rooting on acclimatization of *in vitro* propagated *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo. *Revista Ceres* 57: 803-809.
- Wyka TP, Hamerska M, Wróblewska M (2006) Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:27-32.
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003) Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72:153-156.
- Zavaleta-Mancera HA, Engleman EM (1994) Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology* 44:169-175.

2.6. APÉNDICE

2. 1. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia, oscurecimiento y contaminación *in vitro* de explantes de *E. chamaecereus* en tratamientos de desinfección a los 10 d después de la siembra *in vitro*. (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Supervivencia (%)	Oscurecimiento (%)	Contaminación (%)
Desinfectantes	0.30 *	0.06 *	0.16 *
Error	0.04	0.02	0.04
C.V.	23.90	19.69	22.88
R ²	0.36	0.52	0.42
Media	87%	82%	92%

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

2. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la inducción de brotes areolares y callo de *E. chamaecereus aurea* a los 30 d después de la siembra *in vitro*. (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Brotos por explante (núm.)	Callo por explante (g)
Hormonas	5.46 *	1.13 *
Error	0.02	0.12
C.V.	6.57	23.68
R ²	0.93	0.51
Media	2.18	1.48

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

2. 3. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante, longitud de explantes y peso fresco de callo durante la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus aurea* a los 60 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Brotos por explante (núm.)	Callo por explante (g)
Hormonas	46.26 *	0.87 *
Error	0.07	0.08
C.V.	6.66	20.24
R ²	0.96	0.55
Media	4.18	1.46

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

2. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante, longitud de explantes y peso fresco de callo en la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus aurea* a los 90 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Brotos por explante (núm.)	Callo por explante (g)
Hormonas	21.38 *	0.87 *
Error	0.18	0.08
C.V.	8.27	20.24
R ²	0.86	0.55
Media	5.20	1.46

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

2. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) adicionados al medio MS (1962) en la formación de brotes por explante, longitud de explantes y peso fresco de callo en la etapa de multiplicación de *E. chamaecereus aurea* a los 120 d después de la siembra *in vitro* (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Brotes por explante (núm.)
Hormonas	9.19 *
Error	0.54
C.V.	11.42
R ²	0.53
Media	6.47

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

CAPITULO III. Histología de la microinjertación *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus* aurea y *Mammillaria plumosa* Weber (injertos) sobre *Hylocereus undatus* (portainjerto).

CAPITULO III. Histología de la microinjertación *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus aurea* y *Mammillaria plumosa* Weber (injertos) sobre *Hylocereus undatus* (portainjerto).

RESUMEN

La microinjertación es una técnica utilizada comúnmente para la propagación de especies leñosas. Pocos estudios se han realizado en cactáceas que permitan conocer todos los beneficios que proporcionan a la especie injertada. Esta alternativa de propagación, además de ofrecer la ventaja de poder comercializar plantas con un valor agregado, se podrían usar para incrementar las tasas de crecimiento y la generación de brotes combinando las ventajas de la rápida multiplicación *in vitro* con el aumento de productividad. Por lo que en base a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue multiplicar material *in vitro* vía microinjertos, para el desarrollo de plántulas *in vitro* de las especies *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea y *Mammillaria plumosa* Weber, cactus considerados raros y con alto valor en el mercado como especies ornamentales de gran belleza, sobre *Hylocereus undatus*, en las sales del medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹) y agente solidificante agar (Merck®) (6 g L⁻¹). Los microinjertos fueron incubados en 26±2 °C en un fotoperíodo de 16 h y subcultivados cada 30 d. El porcentaje de contaminación *in vitro* no fue mayor de 20% y el oscurecimiento de tejidos de 10%; el análisis histológico permitió verificar la continuidad del tejido vascular entre el portainjerto e injerto asegurándose un prendimiento de 90%. En el proceso de aclimatación se observó una tasa de sobrevivencia de los injertos de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* de 50 y 75%.

Palabras clave: Cactaceae, micropropagación, injertación *in vitro*, mutante cromático, *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle aurea *Mammillaria plumosa* Weber, *Hylocereus undatus*.

ABSTRACT

The micrografting is an ancient technique commonly used to propagate woody species. Few studies have been conducted in cacti to reveal all the benefits provided to the grafted species. This alternative propagation system offers several advantages including plants with an aggregate value, enhancement of growth rates and shoot proliferation, free of pathogens material, and rapid multiplication with increased productivity when produced *in vitro*. Based on this, the purpose of this study was to study the culture conditions and several cuts to perform *in vitro* micrografts between two rare and valuable ornamental cacti species of great beauty: *E. chamaecereus* Friedrich & Glaetzle "aurea" and *Mammillaria plumosa* Weber and *Hylocereus undatus* as rootstock. The micrografts were cultured on Murashige and Skoog (MS) (1962) medium without vitamins, supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), agar (Merck®) (6 g L⁻¹) as solidifying agent, and incubated at 26 ± 2 ° C in a photoperiod of 16 h. The percentage of *in vitro* contamination was lower than 20% and tissue oxidation was 10%; the histological analysis confirmed the continuity of vascular tissues between the rootstock and both scions, which resulted in an average of 90% of total graft success. Survival rates recorded for *E. chamaecereus* "aurea" and *M. plumosa* were 50 and 75%, respectively.

Keywords: Cactaceae, micropropagation, *in vitro* grafting, mutant color, *Echinopsis chamaecereus* Friedrich & Glaetzle "aurea", *Mammillaria plumosa* Weber, *Hylocereus undatus*.

3.1. INTRODUCCIÓN

La técnica de microinjertación o injertación *in vitro* es una variante de la injertación convencional donde el patrón y el injerto son pequeños (5-10 mm). Esta técnica se ha empleado en especies forestales (Cortizo *et al.*, 2004; Materan *et al.*, 2008) y frutales (Gonzales, 2003) para propagar clones seleccionados y eliminar virus. Pocos han sido los estudios enfocados a la microinjertación *in vitro* de mutantes cromáticos (mutantes sin clorofila) *Gymnocalycium mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* y *Parodia scopa* etc., siendo que esta técnica ofrece beneficios en la producción de plantas, ya que favorece el rápido crecimiento del injerto, produce numerosos brotes de la planta injertada, y permite la producción de combinaciones específicas entre genotipos (Estrada *et al.*, 2002).

Murashige *et al.* (1972) y Navarro *et al.* (1975) fueron los primeros en establecer microinjertos con éxito trabajando con *Citrus* consiguiendo eliminar virus; pero el concepto de microinjertos nace a partir del trabajo de Morel y Martín (1952) con la obtención de dalias libres de virus, por cultivo de meristemas (CIAT, 1991). El microinjerto resulta de gran importancia en el caso de especies leñosas, ya que permite el rejuvenecimiento de las plantas, el rescate de genotipos interesantes, lo cual es importante en este grupo de plantas donde el cultivo de meristemas es muy difícil (Cortizo *et al.*, 2004). El microinjerto permite que yemas vegetativas ontogénicamente adultas sobre portainjertos juveniles se vigoricen (Hartmann y Kester 2002; Taiz y Zeiger, 2006; Materan *et al.*, 2008). Además, tiene la capacidad potencial para inducir transformación de características fenotípicas del estado adulto a estados más juveniles, haciendo posible la recuperación de explantes, lo que facilita la manipulación de sus capacidades morfogénicas y, por tanto, la duplicación de materiales adultos seleccionados (Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2010).

Muchos cactus son difíciles de cultivar debido a su sensibilidad a los excesos de humedad, lento crecimiento, o ausencia de clorofila como en los mutantes cromáticos. El primer mutante cromático conocido de un cactus se encontró en 1941 en Japón y fue de una planta de color rojo de *G. mihanovichii* sin clorofila (el pigmento que da a las plantas su color verde), el cual se ha mantenido vivo mediante la técnica de injertación, puesto que no hubiera podido sobrevivir de otra forma. En la actualidad se conocen más de 50 mutantes cromáticos de cactáceas a los cuales se les ha dado ese nombre debido a su especie y color (CITES, 1992).

Desde 1970 se han producido otros mutantes cromáticos de *Cactaceae* spp., como *E. chamaecereus* y *Parodia scopa*, entre otros que han ingresado al comercio internacional en grandes cantidades. Se reproducen vegetativamente utilizando brotes de plantas progenitoras injertadas. Todos los especímenes de mutantes cromáticos se injertan en cactus patrones reproducidos artificialmente, debido a que no pueden sobrevivir de otra manera. Este tipo de propagación vegetativa ha sido comúnmente usada para propagar diversos cactus, como *Melocactus*, *Rebutia*, *Astrophytum*, *Echinocactus*, *Mammillaria*, *Gymnocalycium* y *Echinocereus*, permitiendo el crecimiento de variedades de valor comercial en circunstancias que les son desfavorables (Moebius-Goldammer *et al.*, 2002; Nobel, 2002; Quiala *et al.*, 2004; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). Esos patrones se producen a partir de plantas progenitoras seleccionadas, principalmente *Harrisia* “Jusbertii” e *Hylocereus* spp. (CITES, 1992). Las diferentes formas y la belleza de sus flores han incrementando un interés comercial mundial como plantas de ornato (Bárcenas, 2003; Shedbalkar *et al.*, 2010). Al intentar la reproducción convencional (sexual y asexual) tanto de patrones como de vástagos, los productores se enfrentan a problemas fitosanitarios, escasa producción de semillas y ciclos de vida largos. Sin embargo, los métodos de propagación biotecnológica (cultivo *in vitro*) que han resultado exitosos en muchas cactáceas debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material vegetal requerido al inicio

de la técnica *in vitro* podrían usarse para satisfacer estos fines. (Johnson and Emino, 1979; Clayton *et al.*, 1990; Hartmann and Kester, 2002; Juárez and Passera, 2002; Quiala *et al.*, 2004; García-Saucedo *et al.*, 2005; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* son considerados cactus raros y con alto valor en el mercado como especies ornamentales por su gran belleza pero presentan problemas en su reproducción sexual debido a su crecimiento lento (12-18 meses), la primera por su color amarillo carece de clorofila (mutante cromático) y no sobrevive por sí mismo. Se requiere injertarla sobre un portainjerto (una especie normal con clorofila) que le proporcione lo necesario para crecer y desarrollarse, (Materan *et al.*, 2008; Aloni *et al.*, 2010); como *M. plumosa* que es una especie normal con características ornamentales sobresalientes (modificación de sus espinas), para observar el potencial de la técnica de microinjertación. Cabe indicar que se proponen los microinjertos como una alternativa de aprovechamiento de cactáceas en horticultura ornamental y comercializarlos en frascos conteniendo microinjertos cultivados *in vitro* con medio de cultivo ya que así podrían durar más de seis meses.

Con base en estos antecedentes y para ampliar las alternativas para su propagación y favorecer su desarrollo el objetivo general del presente trabajo fue establecer las condiciones y protocolos para la multiplicación de material *in vitro* vía microinjertos de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* sobre patrones selectos de *Hylocereus undatus* obtenidos *in vitro*. Los objetivos específicos fueron: 1. Determinar las tasas de crecimiento de cada microinjerto y 2. Evaluar la compatibilidad entre especies mediante un estudio anatómico.

Las hipótesis de esta investigación fueron: 1. La compatibilidad entre especies de Cactáceas es elevada y ha sido confirmada en varios casos, sin embargo, el desarrollo de microinjertos de cactus durante el cultivo *in vitro*, está regulada en función de la especie injertada y el patrón, así como del tipo de corte del patrón e injerto. 2. A partir del estudio histológico de los microinjertos se podrá confirmar el éxito del prendimiento entre estas especies.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

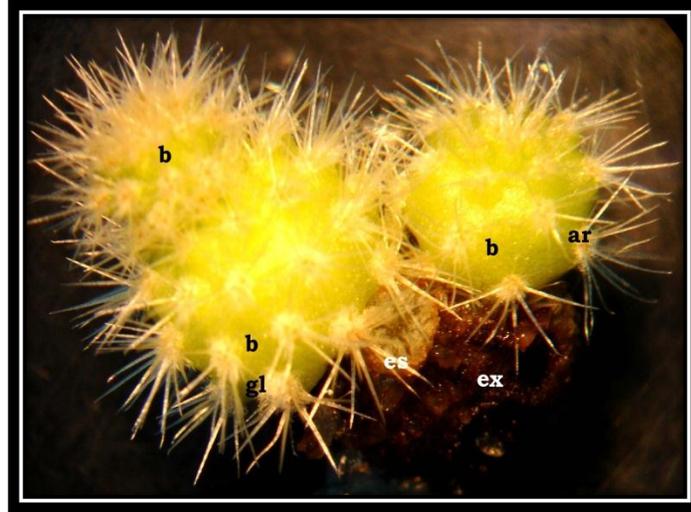
La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética y en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, México.

3.2.1 Material vegetal

Se usaron plantas micropropagadas de *M. plumosa*, *E. chamaecereus aurea* e *Hylocereus undatus* del banco de germoplasma del laboratorio de Biotecnología Agrícola del PREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, *Campus* Montecillo, México. Inicialmente, estas plantas fueron proporcionadas por el Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genetica del Colegio de Postgraduados

3.2.2 Selección y preparación de las plantas para la etapa de microinjertación.

Se seleccionaron plantas de *M. plumosa*, *E. chamaecereus aurea* e *Hylocereus* sp. que presentaban las características típicas de las plantas madre como son: Plantas comúnmente conocidas por su forma de dedo índice (Figura 3.1), de color amarillo pálido para *E. chamaecereus aurea*. Los tallos se seleccionaron de 0.2 cm de diámetro y de hasta 0.5 cm de largo, espigas presentes y leves gloquidios.



**Figura 3. 1. Brotes de *E. chamaecereus aurea* obtenidos por cultivo *in vitro*.
b:brotes; ar:areolas; ex: explante; cll:callos; es: espinas gl:gloquidios.**

En el caso de *M. plumosa* se seleccionaron plantas que presentaban, Tallo cespitoso desde la base, globoso, de 0.5 a 1 cm de altura y diámetro; tubérculos dispuestos irregularmente en 4 y 5 series en espiral, de forma cilíndrica, de 2 mm de altura y 2 a 3 mm de diámetro en la base, de consistencia suave, de color verde claro; axilas con lana blanca; areola circulares; espinas radiales plumosas, suaves, blancas ascendentes (Figura 3.2).



Figura 3. 2. Plántulas de *M. plumosa* obtenidos por cultivo *in vitro* y seleccionadas para la injertación. ar:areolas.

Hylocereus undatus es una especie explotada comercialmente como ornamental y cultivada para cosechar sus frutos, llamados pitahaya. Es una planta de tallos color verde oscuro, de hábito rastrero o trepador que se ramifica profusamente. Posee tres angulosas costillas, con márgenes ondulados que se vuelven córneos con la edad. Los brotes empleados para la microinjertación se seleccionaron de 30-40 mm de longitud y con un diámetro promedio de 2 mm (Figura 3.3).



**Figura 3. 3. Plantas típicas de *H. undatus* obtenidas en cultivo *in vitro*.
ar:areolas; r:raíces.**

3.2.3 Microinjertación *in vitro*

3.2.3.1 Medio de cultivo

Se usó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (30 gL^{-1}) y agar (Merck® al 0.6% p/v) y el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH (1N) y HCl (1N), en potenciómetro (Orión® modelo 611). Se sirvieron 10 mL del medio en frascos de vidrio con capacidad de 45 mL

utilizando tapas plásticas sellados con parafilm®. La esterilización del medio de cultivo se hizo en una autoclave vertical (AESAS®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm² de presión durante 20 min.

3.2.3.2 Condiciones de incubación

Las condiciones de incubación durante los 30 d de cultivo se ajustaron a 26 ± 2°C bajo un régimen de fotoperíodo de 16 h luz proporcionadas por lámparas de luz blanca fría fluorescentes de 75 W (2500 lux), en una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 45 moles m⁻²s⁻¹ y humedad relativa de 30%.

3.2.3.3 Tipos de corte de los microinjertos

Se investigaron varios tipos de corte de los vástagos y patrones y su colocación para constituir el injerto, los cuales se seleccionaron en base a los reportes de Estrada *et al.* (2002) y Materan *et al.*, (2008) (Figura 3.4). En el corte tipo A, el cactus se colocó en la superficie de corte del portainjerto decapitado de manera redondeada, mientras que el corte tipo B se introdujo en una incisión tipo V. Esta incisión se llevó a cabo mediante dos cortes perpendiculares en ángulo de 90° de 2 mm de longitud del portainjerto (Figura 3.4), la incisión se hizo en el punto de decapitación; el injerto también se cortó en forma de V en la base. El corte tipo C se cortó a 0.2 mm por encima de la unión con la raíz del injerto de manera horizontal y se unió por encima del portainjerto decapitado. Después de los cortes, se pusieron en contacto en ambas especies teniendo cuidado de acercar lo mas posible los anillos vasculares (Figura 3.4).

Se evaluaron 6 tratamientos resultado de la combinación factorial (2 X 3) de dos especies (*M. plumosa*, *E. chamaecereus aurea*) y tres tipos de corte (redondo, V y plano).

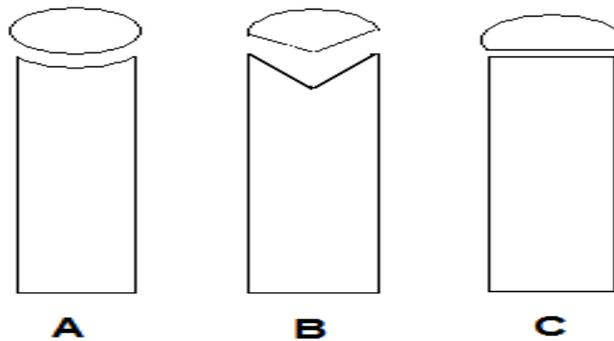


Figura 3. 4. Tipos de corte del patrón *H. undatus* para microinjertos *in vitro*.

3.2.3.4 Variables cuantificadas

Las variables evaluadas a los 30, 60 y 90 d después del establecimiento *in vitro* en cada uno de los tipos de corte fueron: contaminación del microinjerto (%), prendimiento del microinjerto (unión entre especies) (%), y crecimiento de la yema injertada (mm).

3.2.4 Acondicionamiento y establecimiento *ex vitro* de microinjertos

Un lote de 14 plantas de cada especie de 5-10 mm de diámetro, se sacaron de los recipientes, y las raíces se lavaron con agua destilada estéril y se transfirieron a vasos de poliestireno de 150 mL de capacidad, previamente llenos con dos tipos de sustratos estériles: 1. peat-moss + arena de río (1:1) y 2. peat-moss + tierra de hoja (1:1) en donde se trasplantaron 7 y 7 plantas en cada sustrato. Después del trasplante, las plantas se cubrieron con una bolsa de polietileno y se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 12 h luz a 26 ± 2 °C para su aclimatación. Durante los primeros 5 d se proporcionaron riegos diarios con agua destilada estéril y después se espaciaron cada tercer día. Los porcentajes de supervivencia de las plántulas se evaluaron a los 30 d después del trasplante en cada sustrato.

3.2.5 Análisis Histológico

Después de 60 d de cultivo los microinjertos fueron fijados en una solución FAA (3.6% de formaldehído, 50% de etanol (96%) y 5% de ácido acético en 35% de agua destilada) (Ruzin, 1999). Después de 48 h los tejidos se lavaron con agua destilada, se deshidrataron mediante un procesador de tejidos automático secuencial: etanol (50, 70, 96 y 100%), xilol (100%) y xilol: etanol (1:1), por 30 min en cada cambio. Las muestras se procesaron e incluyeron en parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific®), orientadas para su corte longitudinal. Se obtuvieron cortes (10 µm) transversales y anticlinales con un micrótopo rotatorio (Spencer® de American Optical Company). Los cortes se adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina “0” y verde fijo FCF (Zavaleta y Engleman, 1994). Los cortes se observaron en un microscopio óptico (Axioskop 2 Plus, ZEISS®) y se fotografiaron con una cámara digital (Axioskop MRc5, ZEISS®).

Las etapas experimentales establecidas para la microinjertación *in vitro* de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* Weber sobre *Hylocereus* spp. se resumen en la Figura 3.5.

3.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada variable de cada experimento se analizaron en un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones y la unidad experimental estuvo constituida por un injerto en cada frasco. El análisis de varianza se hizo con el sistema de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias.

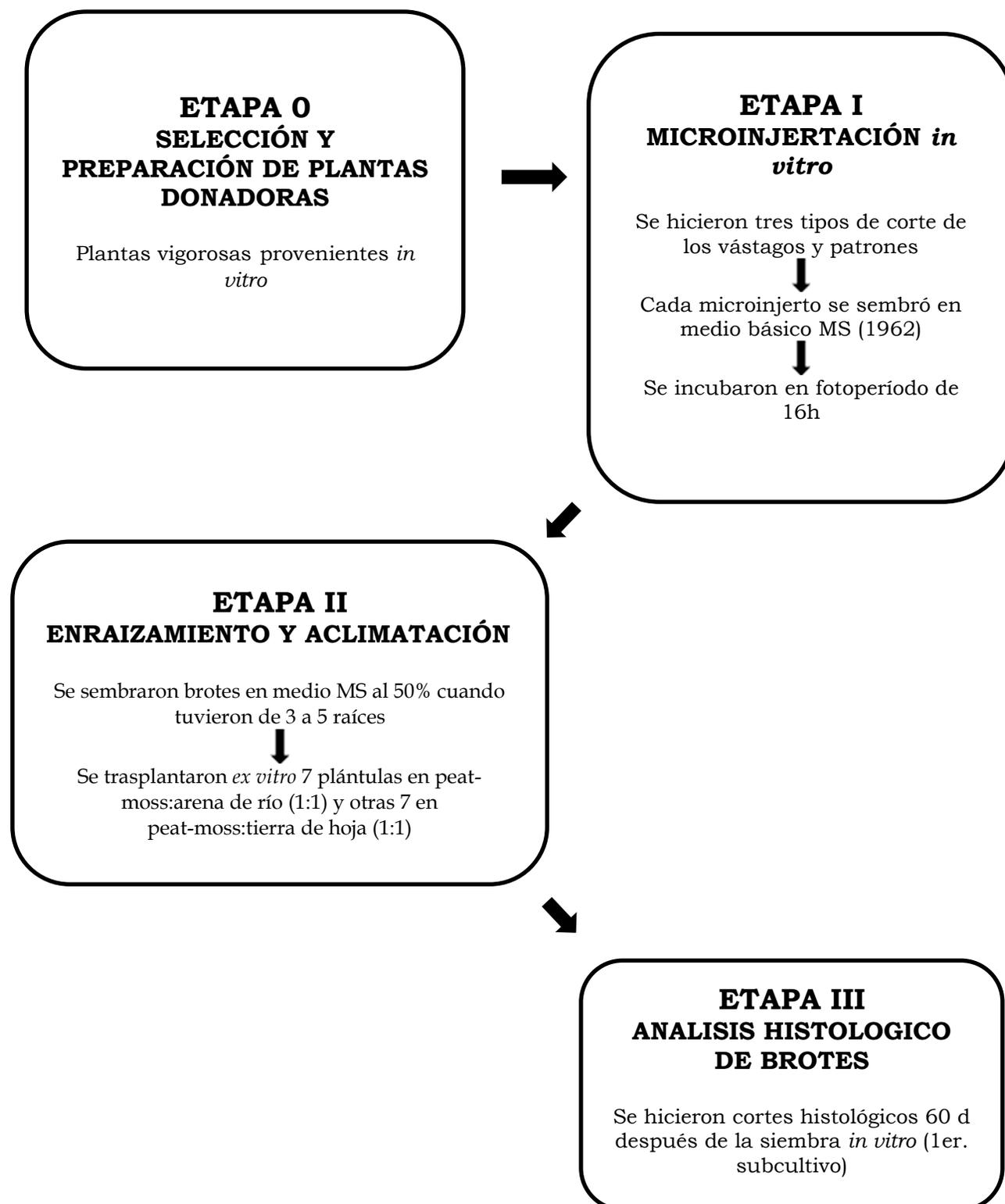


Figura 3. 5. Esquema de las etapas de micronjertación *in vitro* de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* Weber sobre *Hylocereus undatus* y análisis histológico de los microinjertos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Microinjertos *in vitro*

3.3.1.1 Establecimiento del cultivo

La evaluación de la contaminación de los microinjertos *in vitro* de brotes de *E. chamaecereus* y *M. plumosa*, sobre brotes de *H. undatus*, se realizó a los 30 d de cultivo, registrándose el 20% de contaminación en la combinación *Hylocereus-E. chamaecereus* y 10% para *Hylocereus* y *M. plumosa*. Estas tasas de contaminación fueron relativamente bajas y están asociadas a la manipulación del material vegetal durante la preparación de los microinjertos (Estrada *et al.*, 2002; Gonzales, 2003; Materan *et al.*, 2008). Esta contaminación puede deberse a que en el momento de la preparación de los microinjertos la excesiva manipulación contaminó tanto al medio de cultivo como al explante, a pesar de haberse tomado todas las medidas de asepsia correspondientes, incluso utilizando tapas plásticas selladas con parafilm®. Por lo que, la manipulación de los microinjertos debe hacerse cuidadosamente pero tratando que el proceso sea rápido para disminuir el porcentaje de contaminación.

3.3.2 Prendimiento del microinjerto y tipos de corte

El tipo de corte (A, B y C) influyó de manera significativa en la tasa de prendimiento, así como en el crecimiento de la yema injertada ($p \leq 0.05$) (Apéndice 3.4.A-6.A). En cuanto a la variable de prendimiento se confirmó la compatibilidad previamente observada entre diferentes géneros y especies de cactáceas, así como la viabilidad para llevar a cabo la injertación en condiciones de laboratorio, lo cual se demostró con el registro de hasta 88% de prendimiento de microinjertos (Figura 3.6), coincidiendo con estudios donde se

obtuvieran el 60% y 80% de prendimiento en microinjertos de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de cítricos (Materan *et al.*, 2008) . También en especies seleccionadas de *prickly pear* cactus (*Opuntia* spp.) *in vitro* se menciona que la microinjertación es un método exitoso, fácil y confiable, sobre todo porque no ocurre deshidratación, contaminación de tejidos y estructuras especiales, y realizando sin la necesidad de adhesivos para la fijación de ambas partes, este trabajo concluye que esta técnica de injerto tiene uso potencial en la producción comercial de otras especies de cactus.

El prendimiento es considerado exitoso cuando partes de plantas de diámetro semejante son colocadas íntimamente, se unen físicamente a través de la proliferación de callos regenerados tanto del vástago como del patrón y continúan creciendo como una planta única cuando se restablece la rediferenciación y reorientación vascular (Figura 3.6). Cuando las especies injertadas sufren incompatibilidad fisiológica o genética, el resultado final es la falta de unión del injerto, o bien, el detenimiento y muerte del injerto (Estrada-Luna, *et al.*, 2002; Hartmann y Kester, 2002). Entre esos dos extremos se observan una gama de resultados que son totalmente impredecibles. Algunas combinaciones de portainjerto e injerto pueden crecer muy bien, pero el injerto recíproco puede fallar por completo. Ciertas combinaciones pueden crecer normalmente por unas pocas semanas, incluso, varios años, pero después el injerto se seca o quiebra en el punto de unión. Algunas combinaciones se unen, pero luego aparecen síntomas de anormalidad, como crecimiento reducido, amarillamiento de hojas o interrupción de tejidos en la unión del injerto. Plantas de estas combinaciones comúnmente duran algún tiempo y después mueren (Hartmann y Kester, 2002). Los disturbios fisiológicos inducidos por discontinuidades en la unión vascular del injerto pueden conducir a la inhibición de crecimiento debido a la comunicación restringida entre vástago y portainjerto (Ballesta Martínez *et al.*, 2010). Estudios fisiológicos han demostrado que las señales para la inducción de la célula procambial derivan del ápice y las auxinas endógenas pueden sustituir la

función del ápice para promover la formación de células procambiales y asegurar la unión (Alóni *et al.*, 2010).

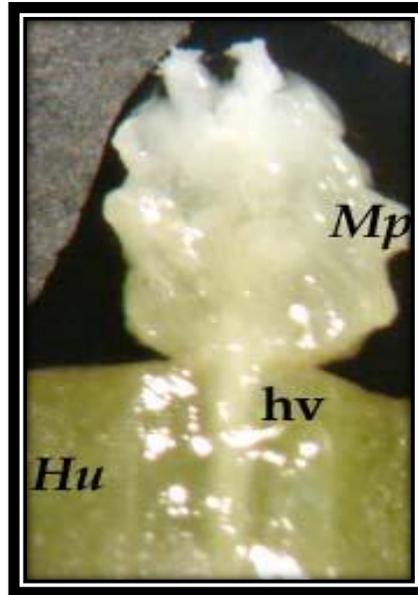


Figura 3. 6. Microinjerto en corte tipo C, de *M. plumosa* sobre *Hylocereus undatus* a los 60 d. *Hu*:*H. undatus*; *Mp*:*M. plumosa*; *hv*:haces vasculares continuos.

La consolidación de ambos tejidos en el desarrollo de los microinjertos se hizo evidente con la formación de una cicatrización en el lugar donde se hizo el corte. Estos resultados fueron similares al trabajo reportado en *Vitis vinifera*, por Mhatre y Bapat (2007) quienes reportaron el establecimiento de la unión vascular 8-12 d después de la injertación. Por el contrario, en *Myrciaria dubia* el proceso de prendimiento del injerto *in vitro* tardó dos meses (Nava *et al.*, 2011). En este estudio, la consolidación del injerto se caracterizó por el desarrollo de una mínima zona necrótica y proliferación de callo de puente en la interfaz de injerto. El estudio histológico confirmó la diferenciación de cambium vascular nuevo y restauración de la conexión vascular así como la conexión del tejido fundamental y epidermis (Figura 3.6).

Comparando los tres tipos de corte evaluados (Figura 3.4), se determinó que el corte C, garantizó el mayor prendimiento para las dos especies de cactus (Figura 3.7-9; Apéndice 3.1A-3A).

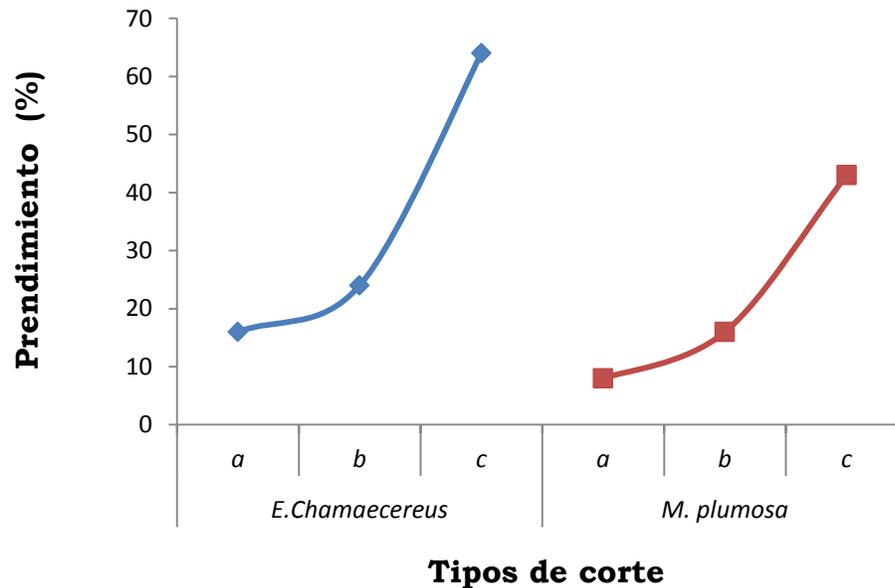


Figura 3. 7. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre *H. undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 30 d de cultivo *in vitro*.

Para *E. chamaecereus* se logró 64% de prendimiento desde el primer subcultivo, esto indica que este tipo de corte resultó adecuado debido a que los tejidos de ambas plantas entraron en mayor y mejor contacto (Materan *et al.*, 2008; Aloni *et al.*, 2010; Martínez-Ballesta *et al.*, 2010) aumentando este prendimiento a 90% a los 60 d (Figura 3.8) y manteniéndose hasta los 90 d (Figura 3.9). Esta respuesta se explica por el incremento de los niveles endógenos de auxinas y citocininas de las secciones de plantas que constituyen al injerto al momento de la escisión, los cuales promueven una mayor proliferación celular, generándose la formación del callo interfásico y por tanto, una eficiente y rápida unión del microinjerto que evita su deshidratación (Figura 3.10) (Materan *et al.*, 2008). La media de los prendimientos obtenidos para cada especie fue similar a los porcentajes reportados por Estrada *et al.*,

(2002) con 90% *Opuntia* ssp; Mhatre y Bapat (2007) en 60% para arboles leñosos; Nava *et al.*, (2011) con 60% en *Carica papaya*.

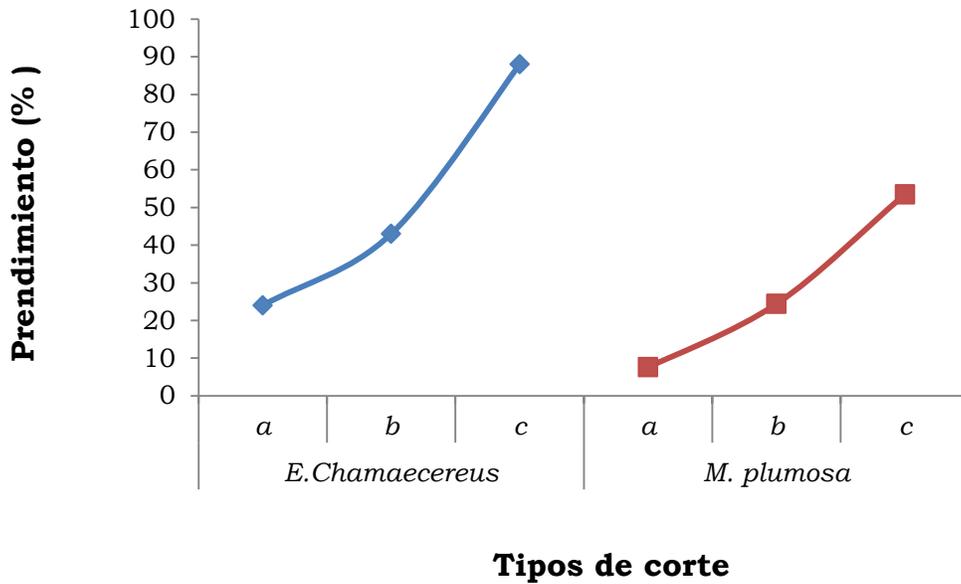


Figura 3. 8. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre *H. undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 60 d de cultivo *in vitro*.

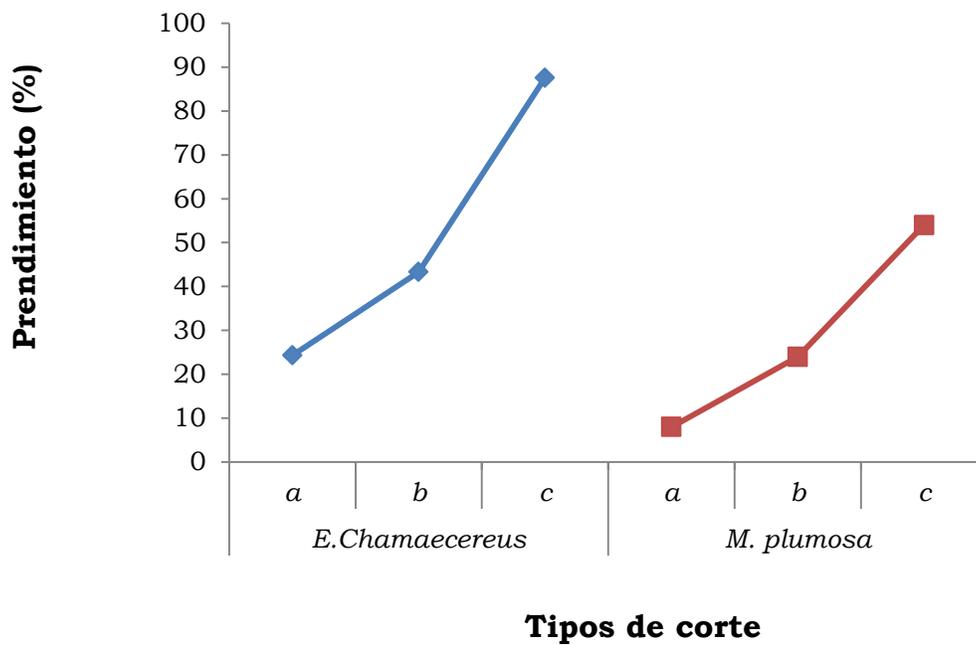


Figura 3. 9. Porcentajes de prendimiento de microinjertos entre *H. undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 90 d de cultivo *in vitro*.

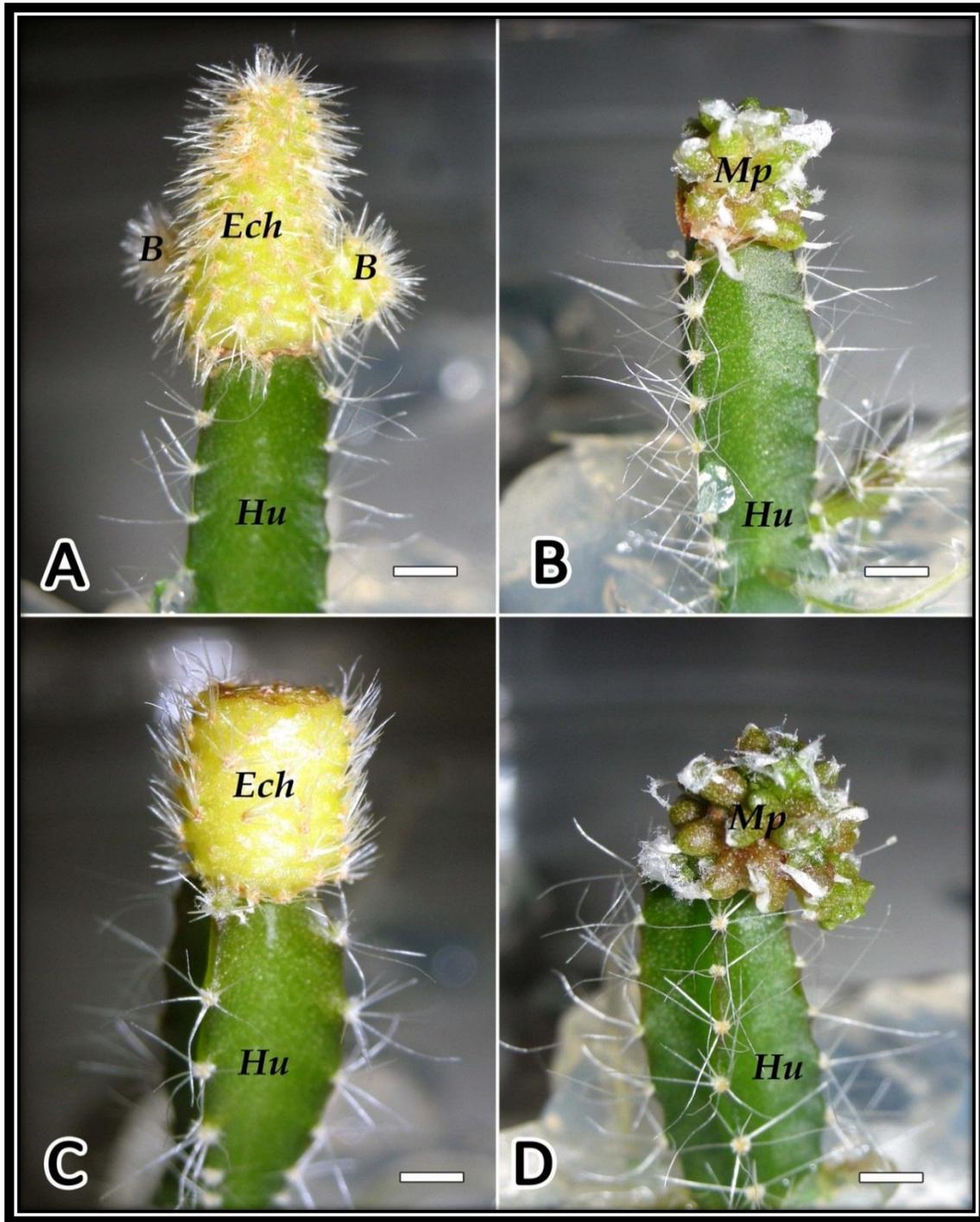


Figura 3. 10. Microinjertos sobre *H. undatus*. A) *E. chamaecereus* (90 d); B) *M. plumosa* (90 d); C) *E. chamaecereus* (60 d); D) *M. plumosa* (60 d) barra= 2.0 mm. *Ech*:*E. chamaecereus* aurea; *Hu*:*H. undatus*; *Mp*:*M. plumosa*; *B*:brotes hijos.

En cuanto a los tipos de corte, se pudo observar que la microinjertación que se hizo con el corte horizontal (Tipo C) fue complicada, puesto que mantener el cactus sobre el portainjerto resultó difícil al momento de colocar la planta injertada en el medio de cultivo. En contraste con esto, la microinjertación en V, que fue más laboriosa y difícil de realizar, permitió que el cactus permaneciera insertado en el corte y se pudo colocar más fácilmente en el medio y en menor tiempo, aunque al final el resultado de prendimiento fue menor al comparar el corte tipo B con el C (Figura 3.8). La media de los prendimientos obtenidos para cada especie fue similar a los porcentajes reportados por Estrada *et al.*, (2002) con 90% en *Opuntia* spp; 60% para arboles leñosos (Mhatre y Bapat, 2007); y 60% en *Carica papaya* (Nava *et al.*, 2011).

Los cortes A y B han sido reportados por Moghadam *et al.*,(2010) para otras especies (Solanaceae y Cucurbitaceae), ellos indicaron que en injertos se perdió un 50 % de brotes para las dos especies, la menor viabilidad obtenida en los microinjertos se debió al oscurecimiento de los brotes, lo que inhibió la división celular e impidió la formación de callo parenquimático por el poco contacto con el patrón; se menciona que estas discontinuidades para formar la unión vascular pueden conducir a la inhibición de crecimiento debido a la comunicación restringida entre injerto y portainjerto (Martínez-Ballesta *et al.*, 2010); aunque Materan *et al.* (2008), mencionan que también es importante considerar que el corte del tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de tensión fisiológica que altera el metabolismo celular y el balance de fitohormonas. También a veces puede notarse, luego del corte una coloración oscura en el fragmento de tejido y en el medio de cultivo. Esto se debe a la oxidación de fenoles o polifenoles que se liberan cuando los tejidos sufren heridas (cortes), que provoca que el explante deje de crecer y generalmente muere (Musacchi *et al.*, 2000).

3.3.3 Crecimiento del vástago injertado

El tipo de corte (A, B y C) influyó en el crecimiento de la yema injertada significativamente ($p \leq 0.05$) (Apéndice 3.4.A-6.A). Para *E. chamaecereus* se logró un crecimiento significativo de 0.26 mm a los 30 d hasta 22 a los 90 d mm en el corte C, con respecto a los demás cortes (Figura 3.11); En *M. plumosa* la respuesta fue similar donde hubo crecimiento significativo de hasta 8 mm en el corte C a los 90 d (Figura 3.11). Estos resultados indican que el desarrollo integral y exitoso del injerto es diferente y depende del injerto y tipo de corte (Figura 3.10) (Aloni *et al.*, 2010; Martínez-Ballesta *et al.*, 2010).

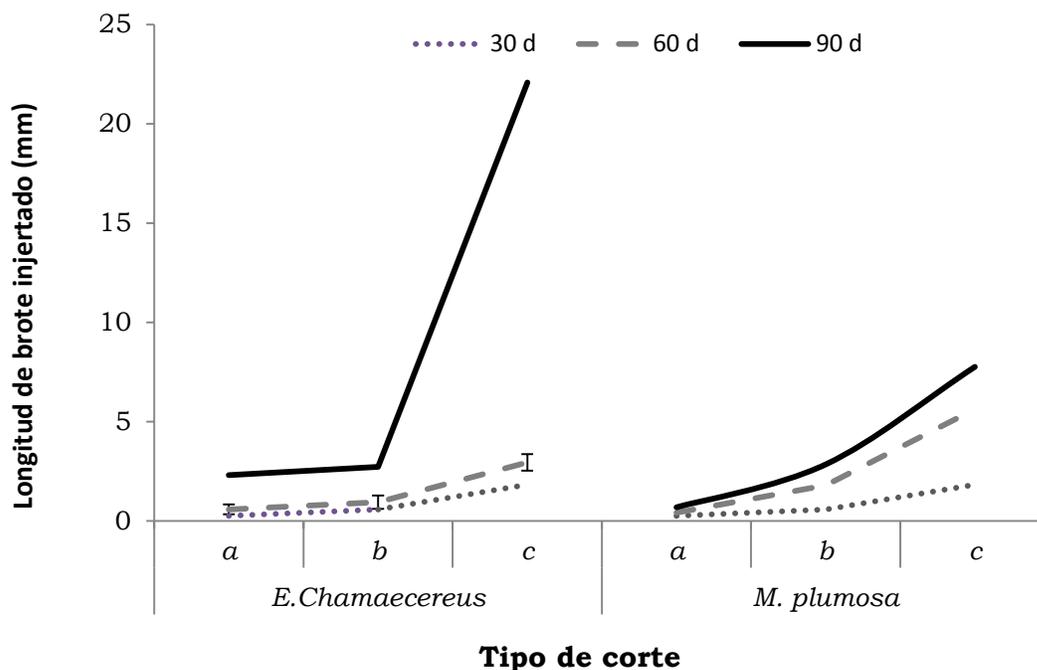


Figura 3. 11. Crecimiento de brotes de los microinjertos entre *H. undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 30, 60 y 90 d de cultivo *in vitro*.

El comportamiento de los microinjertos en esta investigación fue similar a lo reportado por Estrada *et al.* (2002) en microinjertos *in vitro* de *Opuntia* spp.

ya que las secciones horizontales permitieron un contacto más completo entre las dos especies y de esta manera se asegura su viabilidad.

En relación al crecimiento, los resultados muestran que se obtuvo un promedio de crecimiento de 12.5-22 mm, donde los microinjertos con el corte C (horizontal) contribuyó a acelerar su crecimiento y desarrollo (+0.5 mm). Las características morfológicas de las especies injertadas se conservaron después del prendimiento y al inicio del crecimiento, como es el color amarillo en *E. chamaecereus* y el color verde oscuro en el tallo y las espinas modificadas con apariencia de lanosidad en la parte vegetativa de la areola en *M. plumosa*, siendo estas las características típicas de cada especie y que son indicativas de su vigorosidad (Figura 3.10 B, D).

3.3.4 Acondicionamiento y establecimiento *ex vitro* de microinjertos

En la etapa de aclimatación de los microinjertos obtenidas *in vitro* (Figura 3.12), el porcentaje de supervivencia alcanzado fue de 57% de plántulas en *E. chamaecereus aurea* y 71.4% en *M. plumosa* utilizando como sustrato partes iguales de peat-moss y tierra de hoja (1:1) y controlando las condiciones de humedad y temperatura tanto *in vitro* como *ex vitro*. La mezcla de peat-moss y arena de río (1:1) produjo porcentajes de 14.2 y 28.5% respectivamente, en supervivencia de los microinjertos a los 30 d. De manera similar, Mhatre y Bapat (2007) registraron 60% de supervivencia en plantas microinjertadas de uva al igual que en *Carica papaya L* (Nava et al., 2011), destacando que a través de la microinjertación *in vitro* se lograron plántulas injertadas con raíces pivotantes en dos meses, aptas para la aclimatación, reduciéndose el tiempo de la micropropagación en comparación con la siembra directa. Sin embargo, los resultados de supervivencia obtenidos en esta investigación fueron bajos en relación con lo reportado en los microinjertos en *Opuntia* spp. (Estrada-Luna et al., 2002) donde obtuvieron un 100% de supervivencia. Esta pérdida en la aclimatación de plántulas pudo deberse tal vez a que las raíces de las plantas

fueron dañadas durante el transplante, o que las raíces del microinjerto no eran las suficientes para realizar la absorción y circulación de nutrientes por lo que pudiera ser recomendable que en este caso el patrón del microinjerto cuente con al menos 6 a 8 raíces bien desarrolladas o bien, a que el sustrato empleado no fue el adecuado para el cultivo de estas especies.

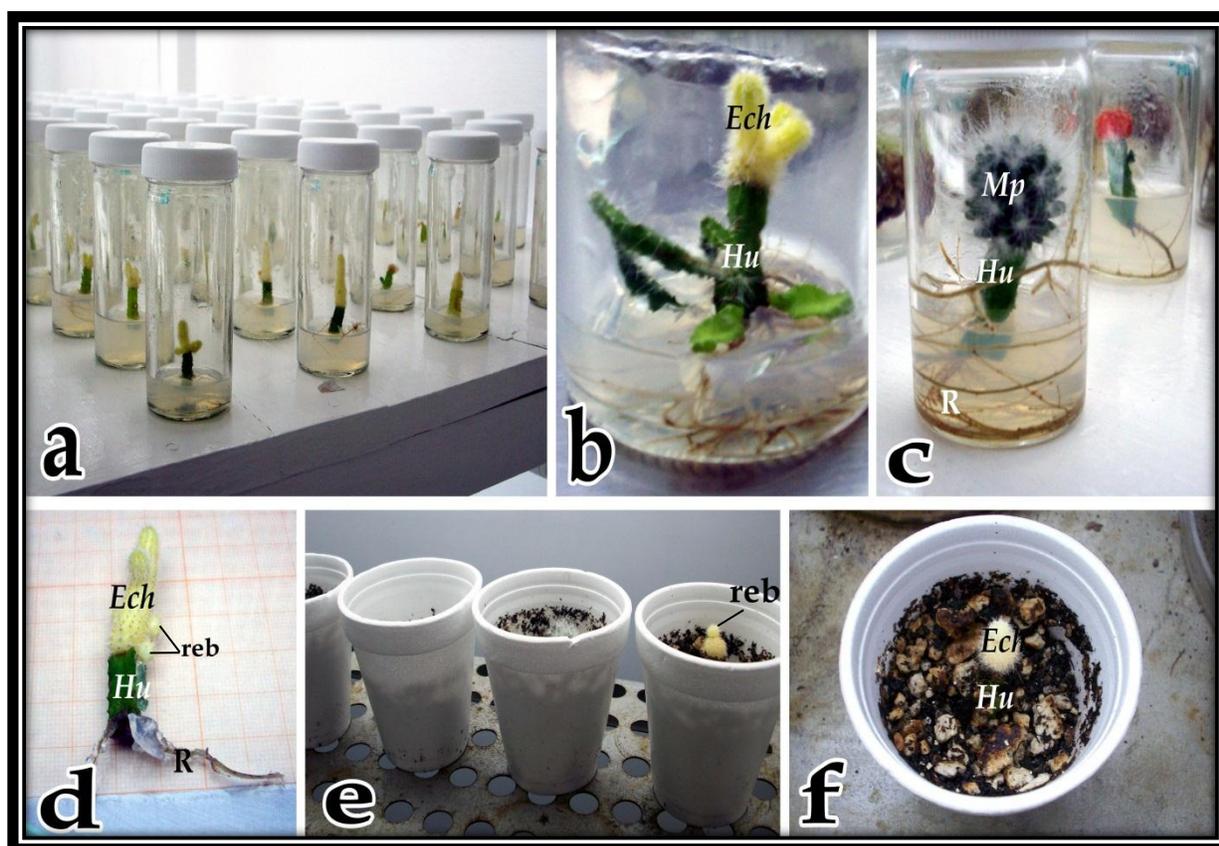


Figura 3. 12. Microinjertos. a) Panorámica del cultivo *in vitro* de microinjertos; b) Microinjerto de *E. chamaecereus aurea* con brotes e *H. undatus* con raíces y brotes; c) Microinjerto de *M. plumosa* con raíces; d) Longitud del brote de *E. chamaecereus aurea* con rebrotes; e) Aclimatación de microinjertos f) Microinjerto *ex vitro* de *E. chamaecereus aurea* con brote. *Ech*:*E. chamaecereus aurea*; *Hu*:*H. undatus*; *Mp*:*M. plumosa*; *R*: raíces; *reb*:rebrotes.

3.3.5 Análisis histológico

En los microinjertos de 60 d de cultivo *in vitro* se observó un continuo de haces vasculares entre el patrón *H. undatus* y las dos especies injertadas, lo que asegura una translocación de nutrientes y agua que favorecen la supervivencia del injerto como lo mencionan Martínez-Ballesta *et al.*, 2010. Los tejidos de cada especie mantienen su identidad; la unión está constituida por parénquima nuevo de paredes delgadas; con un poco de tejido necrótico que ha sido resultado de la cicatrización entre ambos tejidos, muchas veces denominado callo. Estudios realizados en la formación de callo entre el portainjerto e injerto y la diferenciación de nuevo tejido vascular de las células del callo, junto con las conexiones de tejido vascular se proponen como un evento crucial para una interacción exitosa formando un puente (Estrada-Luna *et al.*, 2002; Aloni *et al.*, 2010; Martínez-Ballesta *et al.*, 2010). En general, el callo une físicamente a ambas partes del injerto evitando su deshidratación y estrés, además, algunas de las células del callo se diferencian, en condiciones adecuadas, en meristemo procambial que vuelve a producir tejido vascular incluyendo vasos y traqueidas en la zona de unión, estableciendo así la comunicación simplástica entre ambas partes.

La formación de puentes vasculares en toda la zona de injerto es una necesidad primaria para el establecimiento del injerto (Aloni *et al.*, 2010). Posteriormente la unión se completa mediante la división de los tejidos adyacentes en las superficies opuestas y la firmeza de la fijación aumenta lentamente. La efectividad depende de la formación de conductos vasculares entre las partes y el depósito de polisacáridos en el tejido de unión (Figura 3.13).

En plantas injertadas, la regeneración vascular es un proceso complicado, que incluye la diferenciación estructural del tejido parenquimatoso de ambos lados de la unión del injerto en tubos de xilema y floema (Aloni *et al.*,

2010). Se observó que en los microinjertos *in vitro* de cactáceas el portainjerto continua su crecimiento y no solo se encarga del mantenimiento del injerto (Figura 3.13), el cual sigue desarrollando brotación y floración en menor tiempo. Según Moghadam (2012) son diversos los factores que pueden influir en el éxito del injerto: sistema inherente de incompatibilidad celular, formación de plasmodesmos, conexiones de tejido vascular y la presencia de hormonas además de peroxidasas (Usenik *et al.*, 2006). La conexión injerto-portainjerto es fundamental tanto para un crecimiento óptimo, como para la absorción y transporte de agua y nutrientes (Ballesta Martínez *et al.*, 2010).

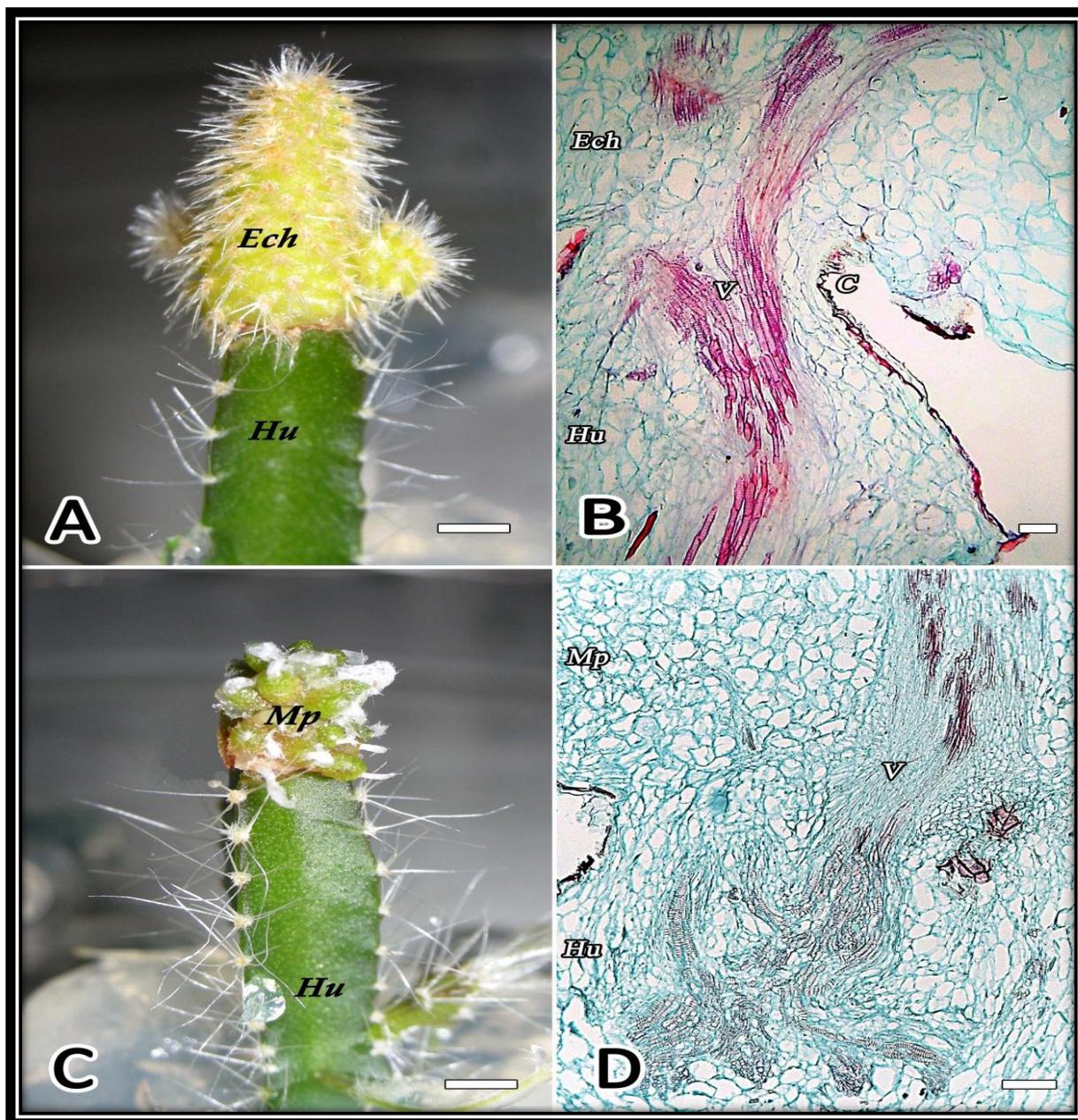


Figura 3. 13. Análisis histológico de Microinjertos. A) Microinjerto de *E. chamaecereus* sobre *H. undatus*, barra=2.0 mm. B) Corte longitudinal de microinjerto de *E. chamaecereus* sobre *H. undatus*, barra= 200 μ m. C) Microinjerto de *M. plumosa* sobre *H. undatus*, barra=2.0 mm. D) Corte longitudinal de microinjerto de *M.plumosa* sobre *H. undatus*, barra= 200 μ m. Hu: *H. undatus*; Ech: *E. chamaecereus*; Mp: *M. plumosa*; v: vasos; c: cicatriz o callo.

3.4. CONCLUSIONES

El establecimiento de microinjertos de *E. chamaecereus* y *M. plumosa* sobre portainjertos de *H. undatus* resultó exitoso en medio MS (1962) suplementado con sacarosa (30 gL^{-1}) y agar (Merck®) al 0.6% (p/v) y pH de 5.7 ± 0.1 en fotoperiodo de 16 h a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

El éxito en el establecimiento de los microinjertos en las combinaciones evaluadas resultó mayor para el corte en los explantes tipo C (horizontal), porque aseguró y contribuyó a una mejor unión entre especies. Para *E. chamaecereus* garantizó un prendimiento de 90% (60-90 d) y para *M. plumosa* de 60% (60-90 d).

El mayor crecimiento de *E. chamaecereus* se logró en el corte tipo C (horizontal) con un crecimiento de 22 mm y para *M. plumosa* de 7.8 mm a los 90 d, en ambos casos.

Con el estudio anatómico se confirmó que existe un continuo de haces vasculares y parénquima que aseguró la supervivencia del injerto ganando el crecimiento del brote injertado de aproximadamente 24 mm para *E. chamaecereus* y de 7 mm para *M. plumosa*.

La supervivencia de los injertos de *E. chamaecereus aurea* y *M. plumosa* fue de 50 y 75%, respectivamente, utilizando como sustrato partes iguales de peat-moss + tierra de hoja (1:1).

3.5. LITERATURA CITADA

- Aloni B, Cohen R, Karn L, Aktas H, Edelstein M (2010) Hormonal signaling in rootstock–scion interactions *Scientia Horticulturae* 127: 119-126.
- Angulo-Bejarano PI, Paredes-López O (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) *Scientia Horticulturae* 128: 283-288.
- Bárcenas RT (2003) Chihuahua desert cacti in Mexico: an assessment of trade, management, and conservation priorities: Prickly trade: trade and conservation of Chihuahua Desert cacti. C. S. Robbins. Washington D.C.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia, p xii, 970.
- CITES (1992) Cactaceae checklist. Ed: D.Hunt. Royal Botanic Gardens, Kew Surrey . ISBN 0 947643427.
- Clayton PW, Hubstenbert JF, Phillips GC, Butler-Nance AS (1990) Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactine. *Society Horticultural Science* 115: 337-343.
- Cortizo M, Alonso P, Fernandez B, Rodríguez A, Centeno M, Ordas R (2004) Micrografting of mature Stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Annals of Forest Science* 61:843-845.
- Estrada –Luna AA, Lopez-Peralta C, Cradenas-Soriano E (2002) *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* ssp.). *Scientia Horticulturae* 92:317-327.
- García-Saucedo P, Valdez-Morales M, Valverde ME, Cruz-Hernández A, Paredes-López O (2005) Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80:215–219.
- Gonzales R (2003) Microinjertación de camu camu (*Myrciaria Dubia*) HBK. Dos patrones y cuatro medios de cultivo. www.siamazoia.org.
- Hartmann HT, Kester DE (2002) *Plant Propagation: Principles and Practices* (6th Edition).Ed. Hudson illustrated, Editor Prentice Hall, New jersey USA.

- Johnson JL, Emino ER (1979) Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)* 51:275–277.
- Juárez MA, Passera CB (2002) *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell*, 26:319–324.
- Martínez-Ballesta MC, Alcaraz-López C, Muries B, Mota-Cadenas C (2010) Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae* 127:112–118.
- Materan ME, Vega MC, Sanchez-Olate M, Sáez K, Rodríguez R, Ríos D (2008) Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* D. Don mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia* 33:66–70.
- Mhatre M, Bapat V (2007) Micrografting in grapevine. En Jain SM, Haggman H (Eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer Holanda. 249–258 pp.
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chávez-Ávila VM (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem) K Shum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39:388–393.
- Moghadam ARL, Ardebili ZO, Rezaie L (2012) Effect of indole butyric acid on micrografting of cactus. *African Journal of Biotechnology* 11: 6484–6493.
- Murashige T, Shabde MN, Hasegawa PM, Takatori FH, Jones JB (1972) Nutrient medium formation de plantlets. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97:158–161.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473–497.
- Musacchi S, Pagliuca G, Kindt M, Piretti MV, Sansavini S (2000) Flavonoids as markers for pear-quince graft incompatibility. *Journal of applied botany* 74:206–211.
- Nava R, Vegas-García A, Marín RC, Villegas Z (2011) Propagación clonal de plantas Élite de *Carica papaya* L. usando microinjertación *in vitro e in vivo*. *Interciencia* 36: 517–523.
- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100: 471–479.

- Nobel PS (2002) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, 280 p.
- Quijala E, Montalvo G, Matos J (2004) Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4:195-199.
- Ruvalcaba-Ruiz D, Rojas-Bravo D, Valencia-Botin AJ (2010) Propagación *in vitro* de *Coryphanta retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:139-143.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique Microscopy*. Oxford University Press, 322 p.
- SAS Institute (2003) *SAS/STAT User's Guide*. Release 6.03 Ed. Cary, NC. USA.
- Shedbalkar UU, Adki VS, Jadhav JP, Bapat VA (2010) *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol.* 3:136–150.
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. 4 ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 690 p.
- Usenik V, Krsk B, Vican M, Stampar F (2006) Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Scientia Horticulturae*, 109: 332-338.
- Zavaleta-Mancera HA, Engleman EM (1994) Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (*Sapotaceae*). *Phytomorphology* 44:169-175.

3.6. APÉNDICE

3. 1. A. Porcentaje de prendimiento de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 30 d después de la siembra *in vitro*.

Especie	Corte (Tipo)	Prendimiento del microinjerto (%) ^z	Crecimiento de la yema injertado (mm) ^z
<i>E.Chamaecereus</i>	A	16 ba	0.26 b
	B	24 ba	0.57 b
	C	64 a	1.83 ba
<i>M. plumosa</i>	A	8 b	0.26 b
	B	16 ba	0.57 ba
	C	43 ba	1.83 ba

^z Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 10.

3. 2. A Porcentaje de prendimiento de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 60 d después de la siembra *in vitro*.

Especie	Corte (Tipo)	Prendimiento del microinjerto (%) ^z	Crecimiento de la yema injertada (mm) ^z
<i>E.Chamaecereus</i>	A	24 b	0.57 ba
	B	43 ba	0.94 ba
	C	88 a	2.94 a
<i>M. plumosa</i>	A	8 b	0.42 b
	B	24 b	1.80 ba
	C	54 ba	5.63 a

^z Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 10.

3. 3. A. Porcentaje de prendimiento de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 90 d después de la siembra *in vitro*.

Especie	Corte (Tipo)	Prendimiento del microinjerto (%)^z	Crecimiento de la yema injertada (mm)^z
<i>E. Chamaecereus</i>	A	24.37 b	2.31 b
	B	43.30 ba	2.72 b
	C	87.59 a	22.09 a
<i>M. plumosa</i>	A	7.59 b	0.69 b
	B	24.37 b	2.85 b
	C	53.57 ba	7.76 ba

^z Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey (p≤0.05) n = 10.

3. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 30 d de cultivo *in vitro*.

Fuente de variación	Prendimiento del microinjerto (%)^z	Crecimiento de la yema injertada (mm)^z
Explante	0.07 NS	0.71 NS
Corte	0.29 *	2.99 *
Explante*Corte	0.13 *	1.35 *
Error	0.50	0.53
C.V.	26.31	58.45
R2	0.19	0.19
Media	87	1.25

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

3. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 60 d de cultivo *in vitro*.

Fuente de variación	Prendimiento del microinjerto (%)^z	Crecimiento de la yema injertada (mm)^z
Explante	0.21 *	3.85 NS
Corte	0.41 *	6.10 *
Explante*Corte	0.22 *	3.58 *
Error	0.05	1.10
C.V.	24.76	75.37
R2	0.26	0.23
Media	94	1.3

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

3. 6. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de microinjertos entre *Hylocereus undatus* con *E. chamaecereus* y *M. plumosa* a los 90 d de cultivo *in vitro*.

Fuente de variación	Prendimiento del microinjerto (%)^z	Crecimiento de la yema injertada (mm)^z
Explante	0.22 *	9.85 NS
Corte	0.42 *	33.65 *
Explante* Corte	0.21 *	17.33 *
Error	0.05	2.98
C.V.	24.73	73.91
R2	0.26	0.35
Media	94%	2.33

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

**CAPITULO IV. Callogénesis en *Gymnocalycium mihanovichii*
cv. Hibotan**

CAPITULO IV. Callogénesis en *Gymnocalycium mihanovichii* cv. Hibotan

RESUMEN

Gymnocalycium mihanovichii cv. Hibotan es una planta cromática (aclorofilica) ornamental de gran belleza debido a su atractivo color rojo, con alto valor comercial como mutante cromático que ha entrado en el comercio internacional. Tomando en cuenta las posibilidades que brindan las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y considerando los diferentes parámetros evaluados y metodologías descritas en diferentes cultivos, es factible aplicar dichas tecnologías a *G. mihanovichii* cv. Hibotan para obtener plantas con características élite e incrementar su producción. Con base en su importancia económica el objetivo de esta investigación fue establecer una metodología para la inducción de organogénesis *in vitro* de este cultivar. Para lograr este propósito se sembraron tallos de rebrotes jóvenes de 1.0 -1.5 cm de longitud en el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con diferentes combinaciones de cinetina (CIN; 4.4, 8.8, 13.2 y 17.6 μM); benciladenina (BA; 1.1, 2.2 y 4.4 μM); ácido indolacético (AIA; 2.85, 5.70 μM); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 2.25, 4.5, 6.75, 9 y 11.25 μM) y ácido naftalenacético (ANA; 2.68 y 5.35 μM), sacarosa (30 g L⁻¹) y agente solidificante agar (Merck®) (6 g L⁻¹). Los frascos de cultivo se incubaron en dos condiciones de fotoperíodo 16 h y oscuridad. El material fue subcultivado cada 30 d para proliferación del callo en el mismo medio de inducción. Se determinó una respuesta exponencial en la proliferación de callo en el medio básico MS (1962) suplementando con CIN + 2,4-D (8.8 + 4.5 μM), en explantes colocados tanto en fotoperíodo como en oscuridad y se obtuvo en promedio 7.27g de peso fresco a los 90d. El análisis histológico de la respuesta morfogénica, confirmó que los callos están formados por la división de células parenquimáticas y tejido fundamental.

Palabras clave: *Gymnocalycium mihanovichii* cv. Hibotan, Cactaceae, callos.

ABSTRACT

Gymnocalycium mihanovichii cv. Hibotan, is a beautiful ornamental chromatic mutant (without chlorophyll) cacti mainly due to its attractive red color. It has a high commercial value as chromatic mutant and probably is the most important and profitable genotype in the international trade. Taking into account the possibilities offered by *in vitro* plant tissue culture techniques and considering the different parameters evaluated and methodologies described in different cultures, it is feasible to apply these technologies to *G. mihanovichii* cv. Hibotan, features for elite plants and increase production. Based on its economic importance the goal of this research was to establish a methodology for induction of *in vitro* indirect organogenesis of *G. mihanovichii* cv. Hibotan. To achieve this purpose, stem sections including areoles (young shoots of 1.0 -1.5 cm in length) were placed in the basic medium of Murashige and Skoog (MS) (1962) supplemented with different combinations of kinetin (CIN; 4.4, 8.8, 13.2 and 17.6 mM), benzyladenine (BA; 1.1, 2.2 and 4.4 M), indoleacetic acid (IAA; 2.85, 5.70 mM), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 2.25, 4.5, 6.75, 9 and 11.25 M), and naphthaleneacetic acid (NAA; 2.68 and 5.35 M), sucrose (30 g L⁻¹) and solidifying agent agar (Merck®) (6 g L⁻¹). Cultures explants were maintained in two different incubation conditions (photoperiod of 16 h and dark conditions). The material was subcultured every 30 d for callus proliferation on the same induction media. It was determined an exponential response of callus proliferation on the MS(1962)basic media supplemented with CIN + 2,4-D(8.8 + 4.5 μM), explants placed in both dark and photoperiod was obtained as an average of 7.27g fresh weight at 90d. Histological analysis of the morphogenic response confirmed that callus are formed by the division of parenchyma cells and fundamental tissue.

Key Words: *Gymnocalycium mihanovichii*, *Cactaceae*, callus.

4.1. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae agrupa a una gran diversidad de plantas, entre las que destacan los cactus columnares (viejitos y tetechos); los cactus candelabroiformes (cardones, órganos y pitayas); las biznagas y biznaguitas (chilitos); algunas trepadoras (*Heliocereus spp.*); las pitahayas (*Hylocereus spp.*), y una gran variedad de nopales, entre otras. La familia es originaria del continente americano y apareció hace cerca de 80 millones de años. El grupo está constituido por cerca de 2,000 especies, las cuales se encuentran distribuidas en el continente americano, desde el norte de Canadá hasta la Patagonia, y desde el nivel del mar, hasta las dunas costeras (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999; Jiménez-Sierra, 2011).

En general son las plantas más representativas del paisaje mexicano, son llamativas en su mayoría y algunos de sus principales atractivos son la belleza de sus formas, sus exóticas flores y, en muchos casos, los colores que presentan (Jiménez-Sierra, 2011). Durante los últimos años, la demanda de cactus se ha ido incrementando paulatinamente, especialmente de especies consideradas como raras, las cuales son comercializadas por coleccionistas nacionales e internacionales (CITES, 1992). Esto constituye un peligro a nivel mundial, debido a que 57% de estos taxones son endémicos y a que 30% se encuentran en alguna categoría de riesgo. Debido a esta demanda de especies ornamentales es necesario recurrir a sistemas de propagación de cactáceas que puedan abastecer la demanda de coleccionistas nacionales y extranjeros.

El género *Gymnocalycium* es de 70 especies sudamericanas de cactus. El nombre del género *Gymnocalycium* (del griego, "cáliz desnudo") refiere a que los brotes florales no tienen ni pelos ni espinas. Se distribuye en Argentina, parte de Uruguay, Paraguay, Bolivia y Brasil. Muchas especies son bastante pequeñas, de 4 a 15 cm (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

Gymnocalycium mihanovichii cv. Hibotan es un cactus de color rojo considerado raro y con alto valor en el mercado como especie ornamental por su gran belleza. Esta coloración del mutante se debe a que pierde la clorofila y predominan las antocininas que son los que determinan el color de los tallos. Es el primer mutante cromático conocido desde 1941 en Japón. Se trataba de una planta de color rojo de *Gymnocalycium mihanovichii* sin clorofila (el pigmento que da a las plantas su color verde), el cual se mantuvo vivo mediante un injerto (Figura 4.1). En la actualidad se conocen más de 50 mutantes cromáticos de *G. mihanovichii* cv. Hibotan que han recibido su nombre de acuerdo al color (CITES, 1992). Suele tener colores vistosos que puede ir desde el amarillo hasta el lila oscuro pasando por el rojo. De forma globosa con flores de color verde y blanco con algún tono rosáceo. Este mutante que carece de clorofila para sobrevivir debe estar injertado sobre otro cactus verde que le proporcione el alimento obtenido a través de la fotosíntesis, para lo cual se usa normalmente un *Hylocereus* spp. (CITES, 1992).



Figura 4. 1. Injerto de *G. mihanovichii* (injerto) sobre *Hylocereus undatus* sp. Briton & Rose (portainjerto) mostrando: Gm:*G. mihanovichii*; Hu:*H. undatus*; tp:tallo principal; rebr:rebotes jóvenes.

Desde 1970 se han producido otros mutantes cromáticos de *Cactaceae* spp., como *Gymnocalycium* spp. (Cuadro 4.1) (por ejemplo, *Gymnocalycium denudatum* [Link & Otto] Pfeiffer ex Mittler y *Gymnocalycium* “Pentacanthum” Hort.), que han ingresado en el comercio internacional en grandes cantidades.

Cuadro 4. 1. Clasificación botánica de *G. mihanovichii* cv. Hibotan.

Reino: <i>Plantae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Orden: <i>Caryophyllales</i>
Familia: <i>Cactaceae</i>
Subfamilia: <i>Cactoideae</i>
Tribu: <i>Trichocereae</i>
Genero: <i>Gymnocalycium</i>
Especie: <i>G. mihanovichii</i>
Fuente: International Plant Names Index (2011)

Aunque el mejoramiento genético convencional (reproducción sexual, cruzamientos selectivos y las mutaciones) continúa siendo la principal fuente de nuevos cultivares y variedades en cactáceas para el mercado de ornamentales, este presenta limitantes como es la necesidad de sucesivas y prolongadas cruza para fijar la característica de interés. Este proceso puede tardar años y con frecuencia el producto final es una combinación de características deseables e indeseables (Hunt, 1999). Otras formas de propagación asexual o vegetativa incluyen el enraizamiento de esquejes, hijuelos e injertos; no obstante, algunas especies presentan serias dificultades en este tipo de propagación, debido principalmente a la poca o nula producción de brotes, las bajas tasas de crecimiento relativo y en algunos casos el tamaño

reducido de sus semillas, aunados a los bajos índices de viabilidad (Sarasan, 2006).

Con base en lo antes mencionado, se necesitan establecer alternativas de reproducción asistida que aseguren la preservación de estas especies. Las técnicas de micropropagación en cactáceas han confirmado ser efectivas, rápidas y seguras en la reproducción masiva de plantas. Este proceso de propagación se lleva a cabo a partir del uso de órganos o fracciones de tejido como explantes, sin depender necesariamente de la disponibilidad de semillas (Giusti *et al.*, 2002; Wyka *et al.*, 2006).

Se ha considerado que mediante las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es posible dar seguimiento al desarrollo de las plantas bajo condiciones asépticas, en un medio de cultivo artificial y balance hormonal adecuado, y otros suplementos orgánicos e inorgánicos junto con un estricto control de los factores ambientales (luz y temperatura) que inciden en la generación del óptimo desarrollo (crecimiento y diferenciación) de la planta, a fin de lograr las respuestas requeridas durante el proceso de reproducción, como la morfogénesis celular de los explantes (Engelmann, 2011).

Con base en la información disponible, las técnicas del cultivo *in vitro* han servido para mejorar más de 50 especies de cactus que han sido evaluadas y sometidas a condiciones *in vitro* para su micropropagación, de las cuales en 31 de ellas se han establecido sistemas de propagación clonal masiva para su rescate y preservación, ya que son categorizadas como especies raras o endémicas, amenazadas o en peligro de extinción. En este sentido, sobresalen las contribuciones hechas en *Mammillaria haageana*, *M. huitzilopochtli*, *M. san angelensis*, *M. candida*, *M. woodsii*, *M. pectinifera*, *M. mathildae*, *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, *M. zephyranthoides*, *Pelecycphora aselliformis*, *P. strobiliformis*, *Strombocactus disciformis*, *Turbinicarpus pseudomacrochele*, *T. Lophophoroides*,

T. laui, *Aztekium ritteri*, *Obregonia denegrii*, *Coryphanta minima*, *Epithelantha micromeris*, *Ariocarpus retusus*, *A. kotschoubeyanus*, *Lophophora difusa*, *L. williamsii* y *Astrophytum myriostigma* (Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Mata-Rosas *et al.*, 2001; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Arias-Azcona, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Ramirez-Malagon *et al.*, 2007; García-Rubio y Malda-Barrera, 2010. Sin embargo, para especies que carecen de clorofila no se han reportado trabajos *in vitro* ni informes sobre las técnicas de embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, como es el caso de *G. mihanovichii* cv. Hibotan, que mejoren características fisiológicas importantes como: el tamaño de la planta, colores y la estabilidad génica, las cuales incrementarían en esta especie su potencial como planta de ornato a nivel nacional e internacional.

La utilización de la morfogénesis *in vitro* vía organogénesis indirecta consiste en la regeneración de brotes adventicios o raíces a partir de callos diferenciados. Éstos se caracterizan por su capacidad de regeneración por tener unas estructuras denominadas meristemoides que, al ser cultivados en la proporción adecuada de hormonas, presentan el potencial de producir nuevas plantas, ya que a partir del explante original se obtiene el callo y luego a partir de células individuales de éste, se puede obtener un gran número de plantas (Pierik, 1990).

Con base en los antecedentes indicados el objetivo de esta investigación fue inducir la organogénesis indirecta *in vitro* de *G. mihanovichii* cv. Hibotan.

Los objetivos específicos fueron: 1. Evaluar la respuesta de *G. mihanovichii* cv. Hibotan a diferentes tipos y concentraciones de auxinas y citocinina; 2. Evaluar la influencia de la luz en las respuestas morfogénicas observadas; 3. Cuantificar el crecimiento de callos bajo condiciones de fotoperiodo y oscuridad y 4. Hacer la descripción histológica de la anatomía del callo.

Las hipótesis planteadas en esta investigación fueron: 1. Que la respuesta morfogénica (organogénesis indirecta) de *G. mihanovichii* cv. Hibotan varía en función del tipo y concentración hormonal adicionado al medio de cultivo *in vitro* y depende de las condiciones del fotoperiodo y oscuridad; 2. A partir del estudio de los diferentes componentes histológicos de los callos, se podrá reconocer su capacidad morfogénica.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética y en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo*, México.

4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plántulas proporcionadas por el Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados (Figura 4.2).



Figura 4. 2. Plantas de *G. mihanovichii* cv. Hibotan donadoras de explantes. *Gm*: *G. mihanovichii* cv. Hibotan; *Hu*:*H. undatus*; *rebr*:rebrote jóvenes.

4.2.2 Establecimiento del cultivo aséptico

4.2.2.1 Tipo de Explante y desinfección del material

De las plantas madre en proceso de brotación, cuidadosamente se separaron rebrotes jóvenes de 1.0 -1.5 cm de longitud (segmentos de tallos con areola, explantes), los cuales se lavaron con detergente y agua corriente durante 25 min para eliminar algunos contaminantes superficiales. Los explantes limpios se disecaron en segmentos de tallo incluyendo las costillas de los rebrotes con areolas (Figura 4.3), y se introdujo 1 mm de cada uno de ellos en el medio MS (1962).

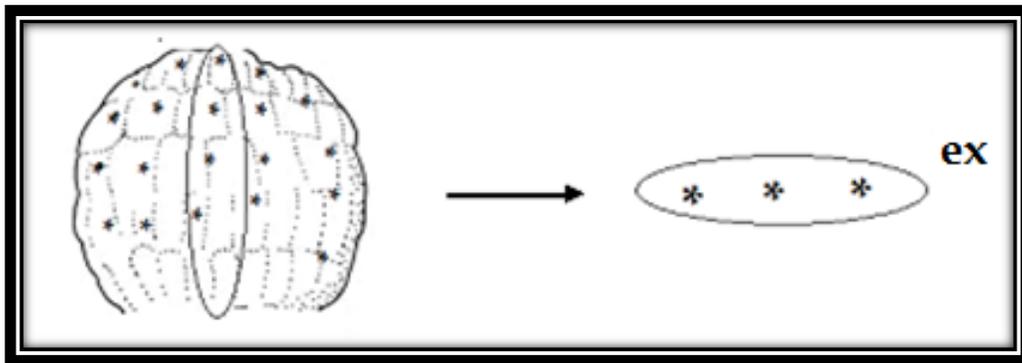


Figura 4. 3. Segmentos de tallos con areolas obtenidos de plantas de *G. mihanovichii* cv. Hibotan. ex=explante.

Posteriormente se probaron nueve tratamientos de desinfección conformados por diferentes concentraciones de Cloralex[®], Microdyn[®] y diferentes tiempos de aplicación (Cuadro 4.2).

Cuadro 4. 2. Tratamientos de desinfección para evaluar la contaminación de explantes de tallos con areolas de *G. mihanovichii* cv. Hibotan.

Tratamiento (Núm.)	Desinfectantes	Tiempo (min)
1	Cloralex® 30%	10
2	Cloralex® 35%	10
3	Cloralex® 40%	10
4	Cloralex® 30% + Microdyn® 1.5% (v/v)	5
5	Cloralex® 35% + Microdyn® 1.5% (v/v)	5
6	Cloralex® 40% + Microdyn® 1.5% (v/v)	5
7	Cloralex® 30% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
8	Cloralex® 35% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10
9	Cloralex® 40% + Microdyn® 1.5% (v/v)	10

Bajo condiciones asépticas (campana de flujo laminar horizontal, VECO®), los brotes se enjuagaron con agua destilada estéril y después se procesaron de acuerdo a los diferentes tratamientos de desinfección superficial. Sin embargo, durante cada tratamiento se agitó constantemente el recipiente que contenía los explantes para favorecer el contacto de la solución desinfectante con el tejido. Al finalizar cada tratamiento, se enjuagó varias veces el material vegetativo con agua destilada estéril para eliminar los restos del desinfectante.

4.2.2.2 Medio de cultivo básico

El medio de cultivo básico utilizado en este experimento fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (0.6% p/v Merck®). El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N, con un potenciómetro (Orión® modelo 611). Se sirvieron 10 mL de esta solución en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad y finalmente se procedió a esterilizar en un autoclave vertical (AESAs®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min.

4.2.2.3 Condiciones de incubación

Los frascos de cultivo que contenían un segmento de tallo con areolas se colocaron durante 10 d en un cuarto de incubación a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen de fotoperiodo de 16 h proporcionado por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W (2500 lux), en una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $45 \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y humedad relativa de 30%.

4.2.2.4 Variables cuantificadas

Las variables evaluadas fueron: contaminación (%), oscurecimiento (%) y supervivencia de explantes (%) a los 10 d de la siembra *in vitro*.

4.2.3 Inducción de callos

4.2.3.1 Medio de cultivo

Con el propósito de estudiar la respuesta morfogénica (callos) de los explantes cultivados *in vitro*, se evaluaron 14 tratamientos hormonales de cinetina (CIN; Sigma®), benciladenina (BA; Sigma®); ácido indolacético (AIA; Sigma®); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Sigma®) y ácido naftalenacético (ANA; Sigma® (Cuadro 4.3) adicionados al medio de cultivo básico MS (1962) Se sirvieron 10 mL del medio en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. La esterilización del medio se efectuó como se mencionó en el inciso 4.2.2.2.

Cuadro 4. 3. Relación de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callos en explantes de tallos con areolas en *G. mihanovichii* cv. Hibotan.

Tratamiento (núm.)	BA		AIA		CIN		ANA		2,4-D	
	(mg L ⁻¹)	(µM)								
1 Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.0	4.4	0.5	2.85						
3	0.5	2.2	0.5	2.85						
4	0.25	1.1	0.5	2.85						
5	1.0	4.4	1.0	5.70						
6	0.5	2.2	1.0	5.70						
7	0.25	1.1	1.0	5.70						
8					2.0	8.8	1.0	5.36		
9					1.0	4.4	0.5	2.68		
10					4.0	17.6			2.5	11.25
11					4.0	17.6			2.0	9.0
12					3.0	13.2			1.5	6.75
13					2.0	8.8			1.0	4.5
14					1.0	4.4			0.5	2.25

4.2.3.2 Condiciones de incubación

Para estudiar el efecto de la oscuridad y fotoperiodo sobre la inducción de callos en *G. mihanovichii* cv. Hibotan, después de la siembra los frascos de vidrio (140) conteniendo un segmento de tallo con areola, fueron colocados en oscuridad total y para el efecto de fotoperiodo, se pusieron bajo un régimen de 16 h luz proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente de 75 W (2500 lux), en una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 45 moles m⁻² s⁻¹ ambos en condiciones de incubación durante 30 d a 26 ± 2°C y humedad relativa de 30%.

Se evaluaron 28 tratamientos con 10 repeticiones resultado de la combinación factorial de dos condiciones de incubación (oscuridad y fotoperiodo) y 14 tratamientos hormonales (2 X 14).

4.2.3.1 Variables cuantificadas

La variable cuantitativa medida fue: peso fresco de callo (g) a los 30 d en medio de inducción.

Las variables cualitativas observadas fueron: explantes hidratados, explantes oscurecidos, apariencia de callo y apariencia de brotes.

4.2.4 Proliferación de callos

Después de la etapa de inducción, se llevó a cabo la etapa de proliferación de callos. Los explantes y callos generados en la etapa inicial de inducción, fueron transferidos (subcultivados) en el mismo medio de inducción (inciso 4.2.3.1) cada 4 semanas (callos), por un periodo de 12 semanas, obteniéndose 3 registros de datos a los 60, 90 y 120 d de cultivo *in vitro*. Los explantes se incubaron en las condiciones descritas en el inciso 4.2.2.3.

4.2.4.1 Variables cuantificadas

La variable evaluada fue: peso fresco de callo (g) a los 60 y 90 d en medio de inducción.

Las variables cualitativas observadas fueron: explantes hidratados, explantes oscurecidos, apariencia de callo y apariencia de brotes.

4.2.5 Análisis Histológico

Los callos generados después de 60 d de cultivo se fijaron muestras en solución FAA (3.6% de formaldehído, 50% de etanol a 96%, 5% de ácido acético en 35% de agua destilada) (Ruzin, 1999). Los tejidos fijados se lavaron con agua destilada y se deshidrataron mediante un procesador de tejidos automático secuencial: etanol (50, 70, 96 y 100%), xilol (100%) y xilol:etanol

(1:1), por 30 min en cada cambio. Las muestras se procesaron e incluyeron en parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Médium, McCormick Scientific®), orientadas para su corte longitudinal. Se obtuvieron cortes (10 µm) transversales y anticlinales con un micrótopo rotatorio (Spencer® de American Optical Company). Los cortes se adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con safranina “0” y verde fijo FCF (Zavaleta y Engleman, 1994) Los cortes se observaron en un microscopio óptico (AxiosKop 2 Plus, ZEISS®) y se fotografiaron con una cámara digital (AxiosKop MRc5, ZEISS®).

Las etapas experimentales establecidas para determinar la respuesta morfogénica de *G. mihanovichi* cv. Hibotan se resumen en la Figura 4.4.

4.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada variable de cada experimento se analizaron en un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones y la unidad experimental estuvo constituida por un explante en cada frasco. El análisis de varianza se hizo con el sistema de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias.

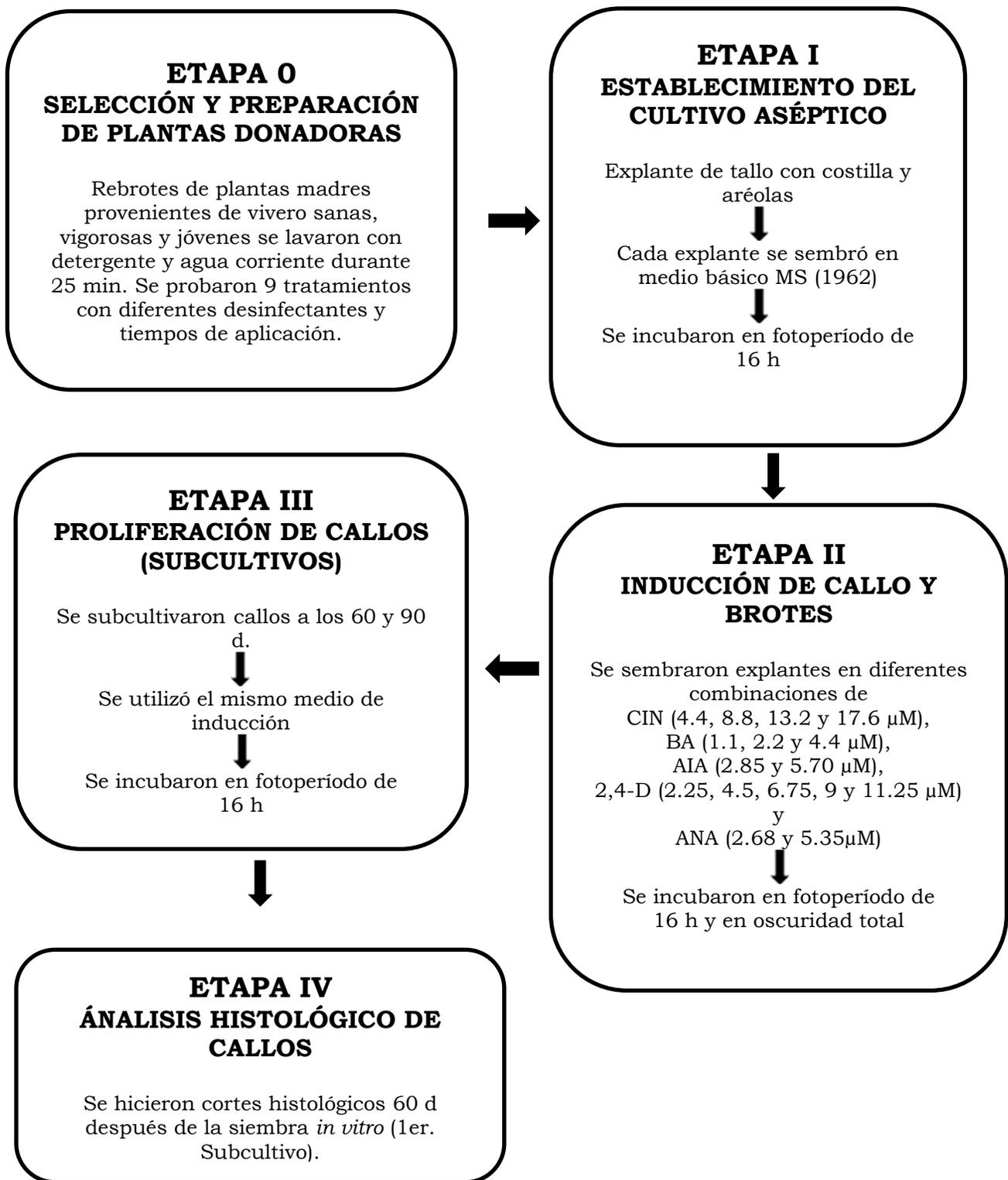


Figura 4. 4. Esquema de las etapas de regeneración *in vitro* de *G. mihanovicii* cv. Hibotan vía organogénesis indirecta y análisis histológico de los callos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Establecimiento del cultivo Aséptico

El método de desinfección empleado tuvo efectos significativos sobre los porcentajes de supervivencia, contaminación y oscurecimiento del explante ($p \leq 0.05$) (Apéndice 4.1A). El proceso de desinfección de explantes de segmentos de tallo con areolas de *G. mihanovichii* cv. Hibotan resultó exitoso, ya que en todos los tratamientos se logró obtener el mayor número de explantes libres de agentes contaminantes (Figura 4.5). La sola utilización de Cloralex® resulto efectiva para desinfectar los explantes presentando de 16-34% de contaminación pero se necesita la adición de Microdyn® para llegar al máximo de explantes libres de contaminantes (100%), además de que el tiempo de exposición también resultó importante, ya que con el mayor tiempo (10 min) se presentó más oscurecimiento del explante (Cuadro 4.4).

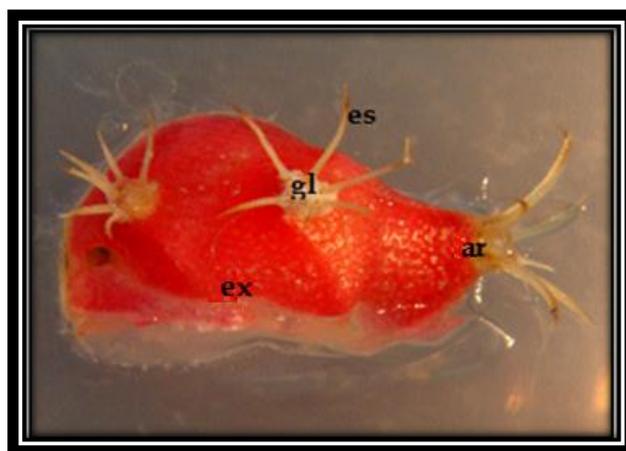


Figura 4. 5. Segmento de tallo con areolas de *G. mihanovichii* cv. Hibotan (Explante) libre de contaminación sembrado *in vitro* en medio de cultivo MS (1962). ex:explante; ar:areolas; es:espinas; gl:gloquidios.

Los explantes se oscurecieron menos cuando el tiempo de exposición fue breve, por ejemplo 5 min en la combinación de Cloralex® 35% + Microdyn®

1.5% (V/V) redujo a 8% los explantes contaminados y 7% de oscurecimiento con un porcentaje de supervivencia de 100%. En cambio el tratamiento con Cloralex® al 40% durante 10 min favoreció la totalidad de explantes desinfectados (100%) con 34% de oscurecimiento y supervivencia de 64% (Cuadro 4.4). Cabe mencionar que estos tratamientos fueron diseñados en el laboratorio donde se desarrolló esta investigación con base en la experiencia obtenida con trabajos anteriores en cactáceas y usando el mismo tipo de explante. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Papafotiou *et al.* (2001), que señalan que para obtener éxito en la etapa de desinfección en este tipo de explantes se deben utilizar plántulas juveniles cultivadas *ex vitro*, y no utilizar cactus de más de cinco años de edad, ya que podría ser una de las razones del fracaso de investigaciones por el elevado número de pérdidas en la desinfección (Figura 4.5).

Cuadro 4. 4. Porcentajes de supervivencia, contaminación y oscurecimiento en explantes de tallos con areolas provenientes de *G. mihanovichii* cv. Hibotan provenientes de tratamientos de desinfección a los 10 d después de la siembra *in vitro*.

Desinfectantes	Supervivencia (%)	Contaminación (%)	Oscurecimiento (%)
Cloralex® 30%(10min)	64 ba	34 a	64 bac
Cloralex® 35%(10min)	76 ba	24 ba	76 ba
Cloralex® 40%(10min)	54 bc	16 ba	100 a
Cloralex® 30%/Microdyn® 1.5% (v/v) (5 min)	100 a	8 ba	7 d
Cloralex® 35%/Microdyn® 1.5% (v/v) (5 min)	64 ba	8 ba	24 dc
Cloralex® 40%/Microdyn® 1.5% (v/v) (5 min)	64 ba	0 b	34 bdc
Cloralex® 30%/Microdyn® 1.5% (v/v) (10min)	64 ba	0 b	16 d
Cloralex® 35%/Microdyn® 1.5% (v/v) (10min)	54 bc	0 b	34 bdc
Cloralex® 40%/Microdyn® 1.5% (v/v) (10min)	24 c	0 b	64 bac

^z Medias con letra diferente, dentro de columnas, son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n=10$.

4.3.2 Inducción de callos

Las dosis hormonales combinadas y el régimen de fotoperiodo y oscuridad afectaron significativamente el peso fresco de callos ($p \leq 0.05$) (Apéndice 4.2A). Después de 30 d en medio de inducción *in vitro* se observó la formación de callo. La diferenciación y desarrollo de callos se logró en todos los tratamientos que incluyeron la suplementación de auxinas y citocininas, (Figura 4.6; Apéndice 4.3A) independientemente de la concentración. Efectos similares reportan Choreño *et al* (2002), quienes registraron la formación de callo de *Cephalocereus senilis* a los 21 d posteriores a la siembra y en este estudio se obtuvo callo a los 30 d posteriores a la siembra de los explantes, lo que podría significar que los explantes pierden dormancia entre los 20 y 30 d posteriores a su exposición a tratamientos hormonales.

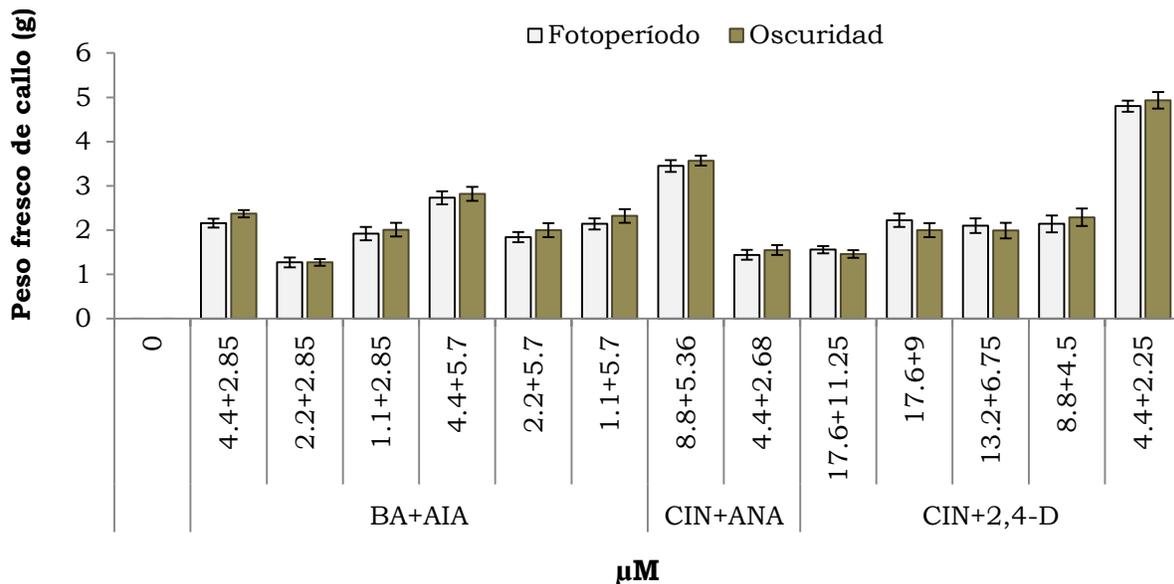


Figura 4. 6. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionadas al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 30 d de cultivo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

En la literatura se ha descrito que las auxinas estimulan la formación de callo por lo que tienden a usarse en los medio para su inducción y proliferación (Santos *et al.*, 2005) y coincide con lo obtenido en este trabajo donde los explantes cultivados con CIN y 2,4-D (8.8 y 2.25 μM respectivamente) desarrollaron el mayor crecimiento de callo con un peso promedio de 5 g en oscuridad a los 30 d, seguido del tratamiento con CIN (8.8 μM) y ANA (5.36 μM) con 3.5 g en fotoperiodo (Figura 4.6; Apéndice 4.3A). Estos resultados coinciden con lo reportado por Lema-Ruminska (2011), en la especie *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstruosa, en la cual se indujeron callos usando concentraciones similares de 2,4-D (4.5 y 9.0 μM) en fotoperiodo. Por su parte, Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) desarrollaron un protocolo para la regeneración vía organogénesis indirecta de brotes en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. “Blanco sin Espinas”, usando la combinación de 2,4-D y BA en concentraciones de 2.26 y 2.21 μM respectivamente; mientras que en *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum un cactus mexicano en peligro de extinción, la formación de callo se logró utilizando BA (13.3 μM) y ANA (5.4 μM) (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). En contraste en un estudio reportado en *S. megalanthus*, sólo se utilizó la hormona citocinina Tidiazuron (TDZ) (200 μM) y resultó eficiente para desencadenar la formación de callo (Pelah *et al.*, 2002).

En la Figura 4.7 se observa que el crecimiento de callo fue bajo para esta etapa de inducción, pero se presentó en cada uno de los tratamientos que contenían hormonas, siendo el tratamiento de CIN + 2,4-D (8.8 + 4.5 μM) el que favoreció el mayor peso fresco de callo, tanto en condiciones de fotoperiodo como en oscuridad. A este respecto, Santos-Díaz *et al.* (2005) describieron un método para micropropagar *Ariocarpus kotschoubeyanus*, en condiciones de oscuridad, donde los explantes formaron callo hasta 48 d, lo que representa una diferencia de 18 d más a lo conseguido en el presente estudio.

En ambas condiciones de incubación: fotoperiodo y oscuridad, el callo presentó una textura dura y compacta de diversos colores (blanco, rosado, rojo)

con apariencia aterciopelada. La formación de callo inició en la zona del corte del explante (a partir de células de la zona de la epidermis) y conforme se desarrolló cubrió completamente al explante y, en la mayoría de los tratamientos hormonales, la formación de callo se presentó simultáneamente (Figura 4.7), similar a lo reportado por Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010). En explantes de *Turbinicarpus valdezianus* var. *albiflorus* se observó la producción de abundantes pigmentos en el tejido calloso (Rosa-Carrillo *et al.*, 2012). Este fenómeno ha sido reportado y estudiado en el género *Mammillaria*, en donde se generaron callos que exhibieron pigmentos (betaxantinas) (Santos-Díaz *et al.*, 2005).

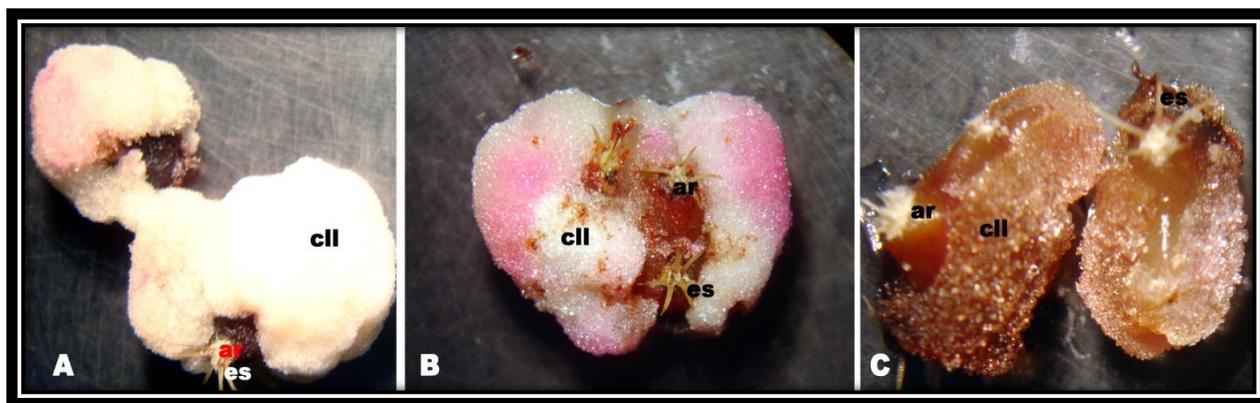


Figura 4. 7. Explantes de *G. mihanovichii* cv. Hibotan que generaron callo en medio MS (1962) suplementado con CIN: 2,4-D (8.8 y 4.5 μ M) a los 30 d de la siembra *in vitro* en diferentes condiciones de incubación. A) Callo color blanco producido en oscuridad; B) Callo color rosa en fotoperiodo 16 h; C) Callo color rojizo en fotoperiodo de 16 h. cli:callo; ar:areola; es:espinas.

El tiempo requerido para la formación de callo en otras especies de cactáceas es variable. Se han reportado periodos que van desde dos semanas de inducción como en *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu y Bhau, 2000) de 3-4 semanas en *Cereus peruvianus* y *Turbinicarpus laui* respectivamente (Mata-

Rosas *et al.*, 2001 y Aparecida de Oliveira *et al.*, 1995), y hasta 8-12 semanas en *Carnegiea gigantea* (Baker y Marín 1999).

Existen varios reportes donde se menciona la formación de callo a partir de la zona de corte del explante, y se ha obtenido en presencia de auxinas y citocininas, solas o combinadas (Wakhlu y Bhau, 2000). Pelah *et al.*, (2002) lograron la formación de callo verdoso y friable en *Selenicereus megalanthus* a los 14 d después de la iniciación con tratamientos de TDZ (100, 200 y 400 μM); mientras que, Perez-Molphe *et al.* (1998) lo consiguieron en varias especie de cactáceas con BA y ANA (8.8 y 5.36 μM). De la Rosa-Carrillo *et al.* (2012) en explantes de *T. hoferi*, *T. jauernigii*, *T. pseudomacroechele* subsp. *lausseri*, *T. pseudomacroechele* subsp. *pseudomacroechele*, *T. schmiedickeanus* sp. *gracilis*, *T. swobodae* y *T. ysabelae*, tratados con BA, el callo no fue demasiado abundante y en *M. candida*, la proliferación de callo fue mayor en los tratamientos con ANA (21.4 μM) (Elías-Rocha *et al.*, 1998).

4.3.3 Proliferación de callos

Las dosis combinadas de hormonas y el fotoperíodo afectaron significativamente el peso fresco de callo (g) a los 60 y 90 d ($p \leq 0.05$) (Apéndice 4.4A-7A). Después de 60 d de cultivo se observó que el desarrollo de callo en los explantes presentó ciertas variaciones morfológicas, ya que crecieron en tamaño pero su interior era hueco con oscurecimiento (Figura 4.8). Algo parecido fue reportado por Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) en explantes apicales de *Coryphanta retusa* en medios suplementado con BA (4.4, 8.8 y 13.2 μM) y ANA (2.68 y 5.36 μM).

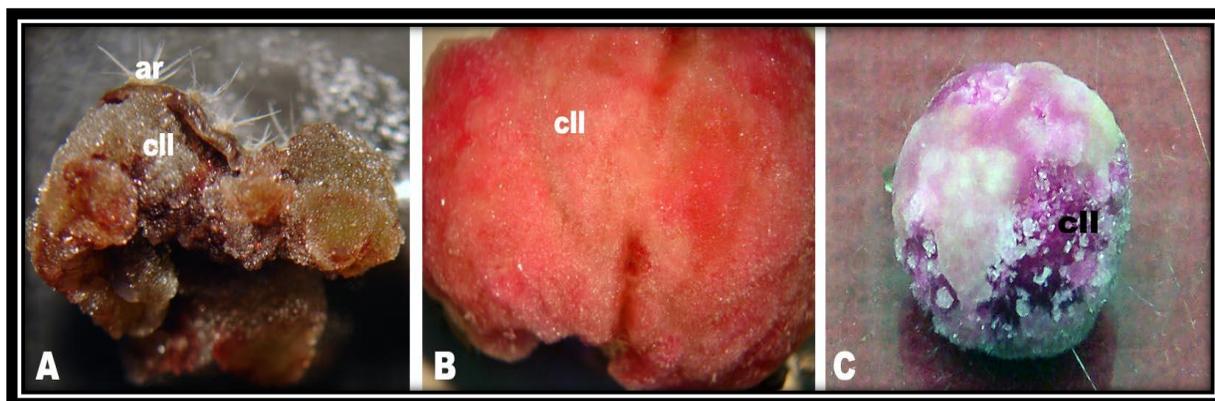


Figura 4. 8. Explantes de *G. mihanovichii* cv. Hibotan con callo cultivados en medio MS (1962) a los 90 d *in vitro* en la fase de proliferación. A) Callo oscuro obtenido con 2,4-D y CIN (17.6 y 11.25 μ M); B) Callo rojo en crecimiento de 100% en todo el explante con CIN y 2,4-D (8.8 y 4.5 μ M); C) Callo rosado cubierto por callo blanquecino, el explante en medio CIN y 2,4-D (4.4:2.25 μ M). cII:callo; ar:areolas.

La mayor proliferación de callo se obtuvo en las combinaciones de CIN y 2,4-D (8.8 y 4.5 μ M respectivamente). Con este tratamiento de inducción se produjeron 7.1 g en explantes colocados en fotoperiodo y 7.2 en oscuridad (Figura 4.9; Apéndice 4.6A). Otro tratamiento que también favoreció el desarrollo de callo fue el medio de cultivo suplementado con CIN (8.8 μ M) y ANA (5.36 μ M) con un peso fresco promedio de 5.1 g (Figura 4.9). Esta respuesta es similar a la reportada por Aparecida de Oliveira, *et al.* (1995), donde concentraciones de 18.1 μ M de 2,4-D combinadas con 18.6 y 27.9 μ M de CIN favoreció la formación de callo en *Cereus peruvianus* Mill; además se desarrollaron callos friables y compactos que no mostraron diferenciación de algún tipo de especialización, sólo crecimiento en masa.

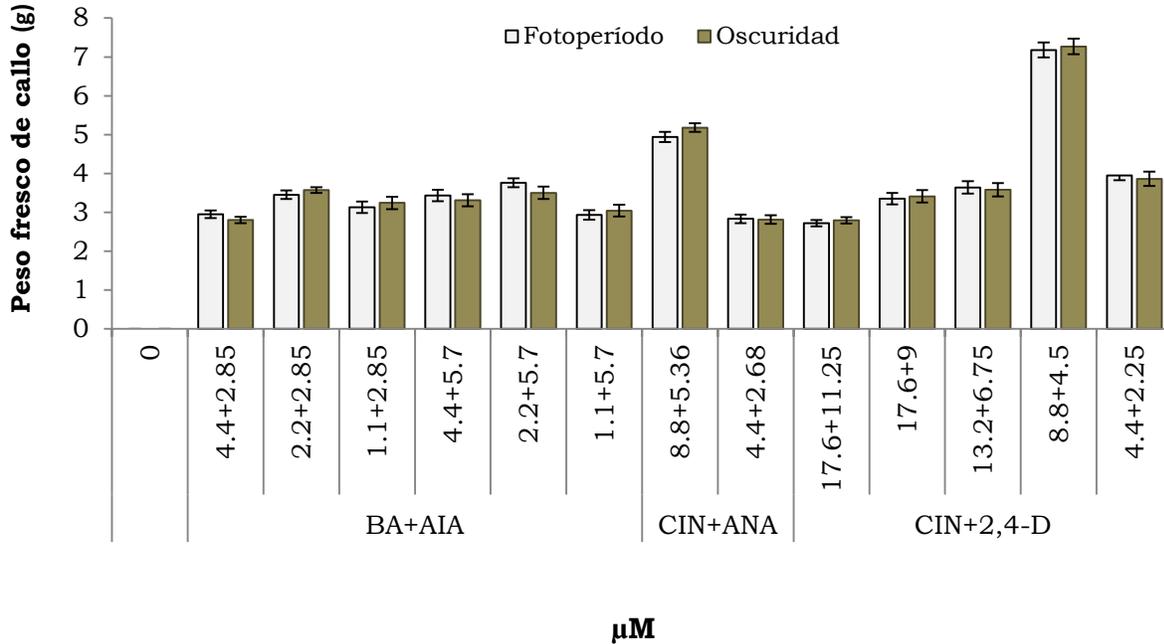


Figura 4. 9. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callo en *G. mihanovicii* cv. Hibotan a los 60 d de cultivo en condiciones de fotoperiodo.

El tratamiento con 17.6 μM de 2,4-D y 11.25 μM de CIN provocó oscurecimiento general del explante sin formación de callo (Figura 4.8). Otra característica observada fue que el callo producido por CIN (4.4 μM) y 2,4-D (2.25 μM) provocó el incremento de callo blanquecino que cubrió casi el 100% del callo rosado a los 90 d pero sin formación de brotes o raíces (Figura 4.10; Apéndice 4.7A).

El callo se mantuvo vivo durante 60 d más después de la inducción, sin lograr la regeneración de brotes o raíces, y después de este tiempo, la masa de callo detuvo su crecimiento (Figura 4.10). Pierick (1990) menciona que si el crecimiento de callo se detiene después del subcultivo, es porque el medio no es el adecuado para su desarrollo y puede ser necesario modificar las concentraciones de hormonas. En esta investigación se postula que el tipo y

concentración hormonal presentes en el medio de cultivo influyen en la respuesta morfológica de los explantes, y está en concordancia con lo encontrado en otras especies de cactus en experimentos de micropropagación (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). También se destaca, al igual que en esta investigación, que en explantes de *P. aselliformis* los callos obtenidos crecieron muy rápido y fueron incapaces de mostrar respuestas morfológicas (Pelah, 2002).

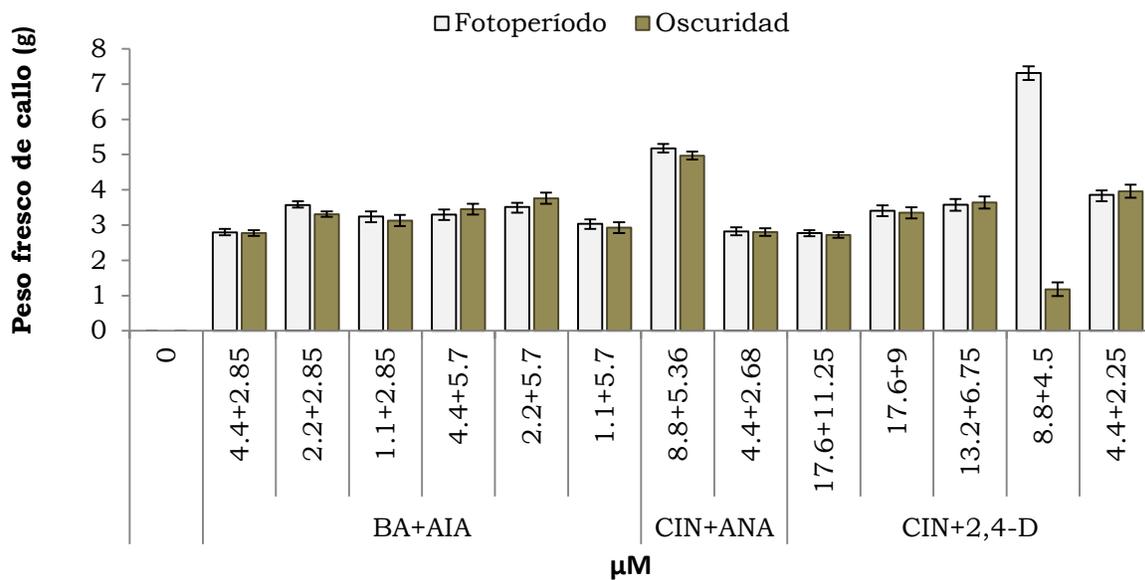


Figura 4. 10. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 90 d de cultivo en condiciones de fotoperíodo.

Las concentraciones evaluadas de las diversas citocininas y auxinas solo presentaron diferencias en el crecimiento de callo no en la inducción ya que todos los explantes produjeron callo.

4.3.4 Análisis anatómico

En *G. mihanovichii* cv. Hibotan, el callo *in vitro* presentó una masa compacta de color rosa con crecimiento exponencial; histológicamente mostró una epidermis monoestratificada bien diferenciada y desarrollada, estuvo formado por tejido no diferenciado de células isodiamétricas engrosadas no lignificadas. También se detectaron zonas restringidas de procambium disperso en la masa del callo. El corte histológico evidenció necrosis en la zona del explante original y no hubo diferenciación de brotes (Figura 4.11).

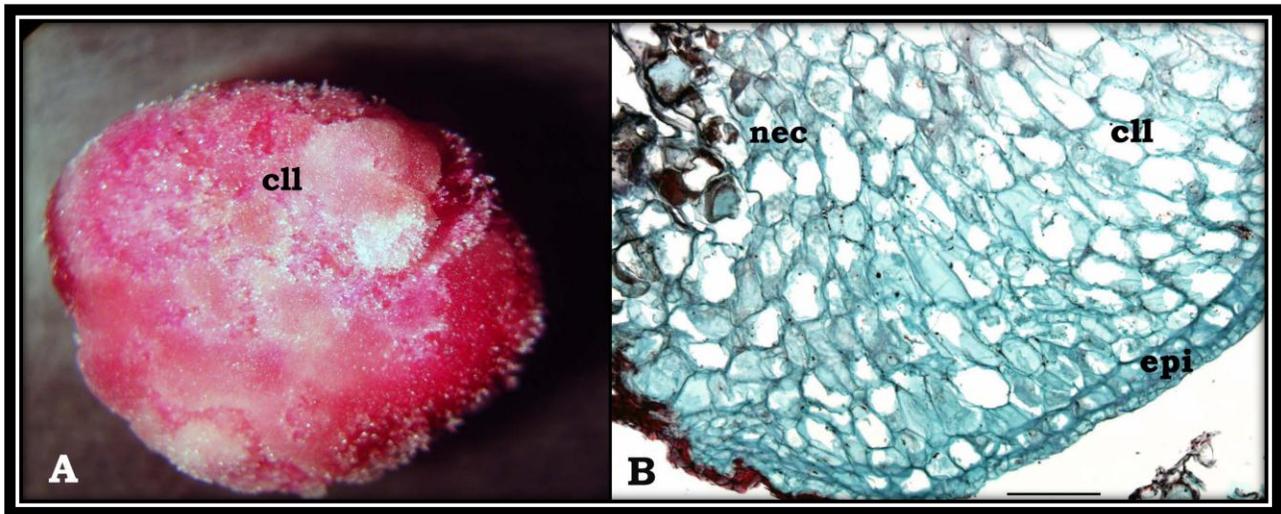


Figura 4. 11. Análisis histológico de callo de *G. mihanovichii* cv. Hibotan cultivado *in vitro*. A) Morfología externa del callo; B) Anatomía del callo corte transversal, barra=100 μ m. cli: callo; Epi: epidermis; nec: necrosis.

4.4. CONCLUSIONES

Se estableció la organogénesis indirecta en explantes de *G mihanovichii* cv. Hibotan, mostrando la generación y proliferación de callo en todos los tratamientos hormonales evaluados en esta investigación.

La esterilización superficial garantizó 100% de explantes libres de contaminación cuando se desinfectaron con la solución de cloro comercial Cloralex® al 35% (hipoclorito de sodio comercial con 6% v/v de cloro activo) más 1.5% de Microdyn® (plata coloidal estable a 0.048%) durante 5 min.

Durante la inducción de callo en fotoperiodo se consiguieron 4.8 g con CIN (4.4 μM) y 2,4-D (2.25 μM) adicionados al medio MS (1962); mientras que en la oscuridad fue de 4.9 g en las mismas concentraciones hormonales. En ambos casos a los 30 d de cultivo.

La mayor proliferación de callo tanto en fotoperiodo como en oscuridad fue de 7.1 y 7.2 g respectivamente y se obtuvo con CIN (8.8 μM) y 2,4-D (4.5 μM) en medio básico MS (1962) a los 60 d de cultivo.

El crecimiento de callos (g) se incrementó en fotoperiodo con CIN (8.8 μM) y 2,4-D (4.5 μM) adicionados al medio MS (1962), lográndose un peso fresco de 7.3 g a los 90 d; sin embargo, en ese mismo periodo de tiempo, pero en oscuridad, disminuyó 32% el peso fresco (4.9 g).

El análisis anatómico mostró que el callo estuvo formado por tejido fundamental hasta los 90 d después de la siembra *in vitro* por lo que no generó brotes adventicios ni embriones somáticos.

4.5. LITERATURA CITADA

- Angulo-Bejarano PI, Paredes-López O (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in *prickly pear cactus* (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae* 128: 283-288.
- Aparecida de Oliveira S, Machado MFPS, Prioli AJ, Mangolin CA (1995) *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol* 37:47-50.
- Arias-Azcona A, Santa-Cruz RME, Soltero-Quintana R (2001) Micropropagación de *Turbincarpus schmiedickeanus* (Bödeker) F. Buxbaum y Bakeberg var. *klinkerianus*, Cactaceae. En: Memorias Electrónicas del IX Congreso Nacional de Biotecnología, SMBB, 10-15 Septiembre de 2001. Veracruz, México.
- Bravo-Hollis H, Scheinvar L (1999) El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. UNAM. México.
- Baker WP, Marín LE (1999) Successful cloning of the “saguaro” (*Carnigea gigantea*, Cactaceae). *Journal of the Arizona-Nevada. Academia of Sáciense*, 31:97-100.
- Choreo-Tapia JM, González-Rosas H, Terrazas-Salgado T, Hernández-Libera A (2002) Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areola. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8: 183-196.
- CITES (1992) Cactaceae checklist. Ed: D. Hunt. Royal Botanic Gardens, Kew Surrey. ISBN 0 947643427.
- De la Rosa-Carrillo ML, Domínguez-Rosales MS, Pérez-Reyes ME, Pérez-Molphe-Balch E (2012) Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbincarpus*. *Interciencia* 37:114-120.
- Elias-Rocha MA, Santos-Diaz MS, Arredondo-Gomez A (1998) Propagation of *Mammillaria cândida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia* 6:96-101.
- Engelmann F (2011) Uses of biotechnologies for de conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47:5-16.
- García -Rubio OR, Malda-Barrera GX (2009) Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro. *CIENCIA@UAG* 2:3-16.

- Gusti P, Vitti D, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F, Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Hunt D (1992) CITES Cactaceae List. 1. Ed. Witstable Litho Ltd. Witstable, Kent.
- Jiménez-Sierra CL (2011) Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista digital univesitaria*.12:3-23.
- Lema-Ruminska J (2011) Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots, and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstruosa *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106:531–535.
- Mata-Rosas M, Monroy de la Rosa MA, Moebius-Goldammer K, Chavez-Avila VM (2001) Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 37:400-404.
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chavez-Avila VM (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus* (Lem.)K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 39:388-393.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Papafotiou M, Balotis GN, Louka PT, Chronopoulos J (2001) *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163–167.
- Pelah D, Kaushik RA, Mizrahi Y, Sitrit Y (2002) Organogénesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.
- Perez-Molphe-Balch E. y Davila-Figueroa CA (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora Aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38: 73–78.
- Pierik RLM (1990) Cultivo *in vitro* de las planta superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España 326 p.
- Ramirez-Malagon R, Aguilar-Ramírez I, Borodanenko A, Pérez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 660-665.

- Rodríguez-Garay B, Rubluo A (1992) *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium Ritteri* (Boedeker). *Cact. Succ. J. (U. S.)* 64: 116-120.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D., Valencia-Botin, AJ (2010) Propagación *in vitro* de *Coryphanta Retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:139-143.
- Ruzin SE (1999) *Plant Microtechnique Microscopy*. Oxford University Press, and 322 pag.
- Santos-Díaz MS, Méndez-Ontiveros R, Arredondo-Gómez A, Santos-Díaz ML (2003) *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39: 480-484.
- Santos-Díaz MS, Velásquez-García Y, González-Chávez MM (2005) Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria Candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 619-626.
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, Mcmichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants progress in the past decade. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 42:206-214.
- SAS Institute (2003) *SAS/STAT User's Guide*. Release 9.1 Ed. Cary,NC. USA.
- Velázquez-Enciso LE, Soltero-Quintana R (2001) Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber *ex* Britton *et* Rose, var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46: 56-62.
- Wakhlu AK, Bhau B (2000) Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphanta elephantidens* (Lem). Lem. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 211-214.
- Wyka TP, Hamerska M, Wróblewska M (2006) Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:27-32.
- Zavaleta-Mancera HA, Engleman EM (1994) Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology* 44:169-175.

4.6. APÉNDICE

4. 1. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de supervivencia, contaminación y oscurecimiento *in vitro* de explantes de tallo con areola de *G. mihanovichii* cv. Hibotan en diferentes tratamientos de desinfección a los 10 d después de la siembra *in vitro*. (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Supervivencia (%)	Contaminación (%)	Oscurecimiento (%)
Desinfectantes	0.09 *	0.05 *	0.24 *
Error	0.01	0.02	0.02
C.V.	12.65	17.54	16.79
R ²	0.74	0.49	0.68
Media	100%	77%	97%

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

4. 2. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 30 d de cultivo en fotoperiodo y oscuridad. (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Explante con callo (%)
Hormonas	2.56 *
Incubación*Hormonas	1.24 *
Error	0.06
C.V.	15.64
R ²	0.68
Media	15.9%

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

4. 3. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la inducción de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 30 d de cultivo en fotoperiodo y oscuridad.

Incubación	BA		AIA		CIN		ANA		2,4-D		Peso fresco de callo		
	(mg L ⁻¹)	(µM)	(g) ^z										
Fotoperiodo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	g	
	1.0	4.4	0.5	2.85							2.16	fbedc	
	0.5	2.2	0.5	2.85							1.27	f	
	0.25	1.1	0.5	2.85							1.92	fed	
	1.0	4.4	1.0	5.70							2.73	bedc	
	0.5	2.2	1.0	5.70							1.84	fed	
	0.25	1.1	1.0	5.70							2.14	fbedc	
					2.0	8.8	1.0	5.36				3.45	bac
					1.0	4.4	0.5	2.68				1.44	fe
					4.0	17.6				2.5	11.25	1.56	fed
					4.0	17.6				2.0	9.0	2.22	fbedc
					3.0	13.2				1.5	6.75	2.1	fbedc
					2.0	8.8				1.0	4.5	2.14	fbedc
					1.0	4.4				0.5	2.25	4.8	a
Oscuridad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	g	
	1.0	0.5					4.4	2.85			2.37	fbedc	
	0.5	0.5					2.2	2.85			1.27	f	
	0.25	0.5					1.1	2.85			2.01	fedc	
	1.0	1.0					4.4	5.70			2.82	bdc	
	0.5	1.0					2.2	5.70			2.0	fedc	
	0.25	1.0					1.1	5.70			2.32	fbedc	
			2.0	1.0					8.8	5.36		3.57	ba
			1.0	0.5					4.4	2.68		1.55	fed
			4.0		2.5				17.6		11.25	1.46	fe
			4.0		2.0				17.6		9.0	2.0	fedc
			3.0		1.5				13.2		6.75	1.99	fedc
			2.0		1.0				8.8		4.5	2.29	fbedc
			1.0		0.5				4.4		2.25	4.93	a

^zMedias con letra diferente, dentro de columnas, son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n=10$.

4. 4. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la proliferación de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 60 d de cultivo en fotoperiodo (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Explante con callo (%)
Hormonas	3.84 *
Incubación*Hormonas	1.85 *
Error	0.052
C.V.	11.79
R ²	0.790
Media	19.4

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

4. 5. A. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la proliferación de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 90 d de cultivo en fotoperiodo (Los valores se transformaron usando $\sqrt{Y+0.5}$).

Fuente de variación	Explante con callo (%)
Hormonas	3.85 *
Incubación*Hormonas	1.85 *
Error	0.05
C.V.	12.13
R ²	0.78
Media	19.6

*: Significativo; NS: No significativo; C.V.: Coeficiente de variación.

4. 6. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la proliferación de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 60 d de cultivo en fotoperiodo.

Incubación	BA		AIA		CIN		ANA		2,4-D		Peso fresco de callo		
	(mg L ⁻¹)	(µM)	(g) ^z										
Fotoperiodo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	e	
	1.0	4.4	0.5	2.85							2.95	d	
	0.5	2.2	0.5	2.85							3.45	cd	
	0.25	1.1	0.5	2.85							3.13	d	
	1.0	4.4	1.0	5.70							3.43	cd	
	0.5	2.2	1.0	5.70							3.76	cbd	
	0.25	1.1	1.0	5.70							2.93	d	
					2.0	8.8	1.0	5.36				4.94	cb
					1.0	4.4	0.5	2.68				2.83	d
					4.0	17.6				2.5	11.25	2.72	d
					4.0	17.6				2.0	9.0	3.35	cd
					3.0	13.2				1.5	6.75	3.64	cbd
					2.0	8.8				1.0	4.5	7.18	a
	Oscuridad					1.0	4.4			0.5	2.25	3.95	cbd
0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	e	
1.0		0.5				4.4	2.85				2.80	d	
0.5		0.5				2.2	2.85				3.57	cbd	
0.25		0.5				1.1	2.85				3.24	d	
1.0		1.0				4.4	5.70				3.31	cd	
0.5		1.0				2.2	5.70				3.50	cbd	
0.25		1.0				1.1	5.70				3.04	d	
			2.0	1.0				8.8	5.36		5.18	b	
			1.0	0.5				4.4	2.68		2.81	d	
			4.0		2.5			17.6		11.25	2.79	d	
			4.0		2.0			17.6		9.0	3.41	cd	
			3.0		1.5			13.2		6.75	3.58	cbd	
			2.0		1.0			8.8		4.5	7.27	a	
		1.0		0.5			4.4		2.25	3.86	cbd		

^zMedias con letra diferente, dentro de columnas, son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$) $n=10$.

4. 7. A. Efecto de concentraciones de benciladenina (BA), ácido indolacético (AIA), cinetina (CIN), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) adicionados al medio MS (1962) para evaluar su efecto en la proliferación de callo en *G. mihanovichii* cv. Hibotan a los 90 d de cultivo en fotoperiodo.

Incubación	BA		AIA		CIN		ANA		2,4-D		Peso fresco de callo		
	(mg L ⁻¹)	(µM)	(g) ^z										
Fotoperiodo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	f	
	1.0	4.4	0.5	2.85							2.79	e	
	0.5	2.2	0.5	2.85							3.57	dce	
	0.25	1.1	0.5	2.85							3.24	e	
	1.0	4.4	1.0	5.70							3.30	de	
	0.5	2.2	1.0	5.70							3.51	dce	
	0.25	1.1	1.0	5.70							3.04	e	
					2.0	8.8	1.0	5.36				5.17	bc
					1.0	4.4	0.5	2.68				2.82	e
					4.0	17.6			2.5	11.25		2.77	e
					4.0	17.6			2.0	9.0		3.41	de
					3.0	13.2			1.5	6.75		3.58	dce
					2.0	8.8			1.0	4.5		7.31	a
					1.0	4.4			0.5	2.25		3.86	dce
Oscuridad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	f	
	1.0	0.5					4.4	2.85			2.77	e	
	0.5	0.5					2.2	2.85			3.31	de	
	0.25	0.5					1.1	2.85			3.13	e	
	1.0	1.0					4.4	5.70			3.45	dce	
	0.5	1.0					2.2	5.70			3.76	dce	
	0.25	1.0					1.1	5.70			2.93	e	
			2.0	1.0					8.8	5.36		4.97	dc
			1.0	0.5					4.4	2.68		2.80	e
			4.0		2.5				17.6		11.25	2.72	e
			4.0		2.0				17.6		9.0	3.35	de
			3.0		1.5				13.2		6.75	3.64	dce
			2.0		1.0				8.8		4.5	1.18	ba
			1.0		0.5				4.4		2.25	3.96	dce

^z Medias con letra diferente, dentro de columnas, son diferentes; Tukey (p≤0.05) n=10.

CONCLUSIONES GENERALES

Se estableció el proceso morfogénico para *M. plumosa* en el que se produjeron dos respuestas: diferenciación de tejidos desorganizados o caulogénesis y la diferenciación de estructuras organizadas u órganos (organogénesis directa e indirecta): brotes y raíces a partir del cultivo de areolas.

El número promedio de brotes producidos en la inducción de *M. plumosa* fue de 11 por activación areolar y 3 de brotes adventicios siendo el potencial de proliferación de 800 brotes en promedio después de 20 semanas de cultivo, incrementándose el número de plantas al aumentar los subcultivos.

La regeneración de brotes para ambas rutas estuvo bajo el control de la combinación auxina: citocinina (2,4-D y CIN), siendo el mejor tratamiento 2,4-D (18.0 μM) y CIN (9.30 μM) tanto en la etapa de inducción como en la de multiplicación de brotes.

Para la producción de plantas completas de *M. plumosa* no se necesitó modificar el medio de cultivo MS (1962) ya que espontáneamente los brotes desarrollaron raíces antes de separarse del explante o del callo.

La supervivencia de explantes fue del 85% sembrados en el sustrato de peat-moss y arena de río (1:1) y controlando las condiciones de humedad y temperatura tanto *in vitro* como *ex vitro*.

El estudio histológico permitió confirmar el origen adventicio de los brotes obtenidos de los callos de *M. plumosa*.

Se estableció el proceso morfogénico para *E. chamaecereus* “aurea” en el que se indujo la organogénesis directa a partir de la activación areolar donde

los explantes apicales que se subcultivaron durante 120 d con BA (13.2 μ M) y ANA (5.35 μ M) en medio MS (1962) generaron la mayor cantidad brotes (55.6).

El análisis anatómico en *E. chamaecereus* “aurea” mostró que el callo de 60 d no generó brotes organogénicos ni embriogénicos, constando sólo de tejido fundamental.

El establecimiento de microinjertos de *E. chamaecereus* y *M. plumosa* sobre portainjertos de *H. undatus* resultó favorable con un 90% de prendimiento sin presentarse contaminación después de 90 d.

La compatibilidad entre especies resultó mayor en los explantes para el corte tipo C (horizontal), porque aseguró y contribuyó a una mejor unión entre especies para *E. chamaecereus* con prendimiento de 90% (60-90 d) y para *M. plumosa* de 60% (90 d).

Con el estudio anatómico se confirmó el desarrollo de haces vasculares de conexión entre el portainjerto y el explante, lo que aseguró la supervivencia del injerto, presentándose crecimiento del brote injertado para *E. chamaecereus* de 22 mm y para *M. plumosa* de 7.8 mm.

Se estableció el proceso morfogénico para *G. mihanovichii* cv. Hibotan en el que se produjo la diferenciación de callos a partir del cultivo de segmentos de tallo con areolas, donde la mayor inducción de callo se obtuvo con CIN (8.8 μ M) y 2,4-D (4.5 μ M) en medio básico MS (1962) en fotoperiodo (16 h luz) y oscuridad.

De acuerdo al análisis anatómico el callo de *G. mihanovichii* cv. Hibotan estuvo conformado por tejido fundamental hasta los 90 d y no se presentó la diferenciación de brotes adventicios ni embriones somáticos.