



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

INJERTOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN TRES CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

PEDRO REYES HERRERA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe PEDRO REYES HERRERA, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor MANUEL LIVERA MUÑOZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis INJERTOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN TRES CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 22 de ABRIL de 2019



Firma del
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis: **Injertos y reguladores de crecimiento en tres cactáceas endémicas de México**; realizada por el alumno: **Pedro Reyes Herrera**; bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

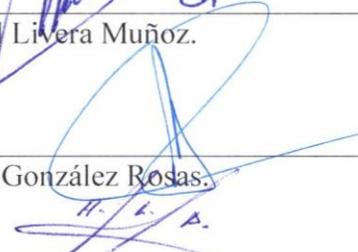
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Manuel Livera Muñoz.

ASESOR



Dr. Héctor González Rosas.

ASESOR



M.C. Alfredo Eligio Hernández Livera.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo del 2019.

Injertos y reguladores de crecimiento en tres cactáceas endémicas de México.

Pedro Reyes Herrera, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Las cactáceas son plantas que han adquirido características morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir en regiones áridas y semiáridas. Se les utiliza de diferentes formas y destaca su uso como plantas de ornato. La presión de diferentes factores, entre los que destaca el saqueo y comercio ilegal, las ha puesto en riesgo de extinción. Por esto, es importante generar alternativas en la producción comercial de cactáceas. Se evaluaron dos tipos de micro injertos, perforación y caras planas, en plántulas de *Opuntia robusta* CP-Tepemor, para incrementar la vida de mutantes aclorofílicos que mueren a los diez días de germinados y se evaluaron los micro injertos de plántulas normales para determinar cuál de las dos técnicas resultaba en un mejor crecimiento de los injertos, se utilizaron patrones de la misma especie. También se evaluó el efecto en la germinación y desarrollo de semillas de *Ferocactus wislizeni*, *Ferocactus pilosus* y *Opuntia* CP-Tepemor, con la escarificación de H₂SO₄ al 100% por 5 min, remojo en AG₃ (500 ppm por 24 h) y puestas en cultivo *In vitro*; con las semillas de *Ferocactus* se realizó una prueba de viabilidad con Cloruro de Tetrazolio e Índigo Carmín para determinar cuál es mejor prueba. En los micro injertos, el de caras planas tuvo una supervivencia del 30% de las plántulas injertadas mientras que el injerto de perforación tuvo el 73% de supervivencia; los mutantes aclorofílicos rosas en caras planas sobrevivieron hasta cinco días en promedio y en perforación hasta 23 días; las variables medidas en los micro injertos en perforación tuvieron índices de frecuencia de mayor valor en las variables de grosor, ancho, altura y número de areolas. El uso de H₂SO₄ mas AG₃ tuvo diferencias significativas en el crecimiento de plántulas de *F. wislizeni*, para *F. pilosus* se observaron diferencias significativas en la germinación y crecimiento de las plántulas con H₂SO₄ + AG₃; las plántulas sin AG₃ trasplantadas y puestas en el invernadero no sobrevivieron. La prueba de viabilidad que permitió apreciar la tinción en semillas de *Ferocactus wislizeni* y *F. pilosus* fue la de Índigo Carmín.

Palabras clave: micro injertos, H₂SO₄ + AG₃, Índigo Carmín.

Injertos y reguladores de crecimiento en tres cactáceas endémicas de México.

Pedro Reyes Herrera, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Cactaceae are plants that have acquired morphological and physiological characteristics that allow them to survive in arid and semi-arid regions. They are used in different forms and highlights its use as ornamental plants. For the latter case, the demand for species that in México have a protective condition due to the illegal looting of their habitats has increased. For this reason, it is important that alternatives are generated in the commercial production of cacti. Two types of micro grafts were evaluated; cleavage and flat faces, in *Opuntia* CP-Tepemor seedlings, to increase the life of achlorophilic mutants that die within ten days of germination and micro grafts of normal seedlings were evaluated to determine which of two techniques resulted in better growth of the grafts, were used patterns of the same species. The effect on seed germination and development of *Ferocactus wislizeni*, *Ferocactus pilosus* and *Opuntia* CP-Tepemor was also evaluated, with scarification at 100% of H₂SO₄ for 5 min, soaking in AG₃ (500 ppm for 24 h) and place *In vitro* culture; with the seeds of *Ferocactus* a viability test was performed with Tetrazolium Chloride and Indigo Carmine to determine which is the best test. For the micro grafts, the flat faces had a 30% survival of the grafted seedlings while the cleavage graft had 73% survival, pink flat faces achlorophilic mutants survived up to five days on average and cleavage up to 23 days; the measured variables in wedge micrografts had frequency indexes with higher value in the variables of thickness, width, height and number of areolas. The use of H₂SO₄ plus AG₃ had significant differences in the growth of *F. wislizeni* seedlings, for *F. pilosus* significant differences were observed in the germination and growth of the seedlings with H₂SO₄+AG₃; the seedlings without AG₃ transplanted and put in the greenhouse did not survive. The viability test that allowed appreciating the staining in *Ferocactus wislizeni* and *F. pilosus* seeds was that of Indigo Carmin.

Keywords: micro grafts, H₂SO₄+AG₃, Indigo Carmine.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la oportunidad de superarme y cumplir esta gran meta a lado de mi familia.

Al Colegio de Postgraduados, por su apoyo y enseñanza, especialmente al PRGP-Fisiología Vegetal, por la gran oportunidad de cursar la Maestría en Ciencias.

Al Dr. Manuel Livera Muñoz, por fungir como mi Consejero y por el esmero en la dirección de la presente tesis. Agradezco su paciencia y el gran apoyo que de forma incondicional me brindó para culminar esta investigación.

Al Dr. Héctor González Rosas, por su gran apoyo en la realización del experimento, así como la disposición de su laboratorio, la orientación y contribución a la tesis.

Al M. C. Alfredo Eligio Hernández Livera, por su gran apoyo en las prácticas y enseñanza, así como en la investigación de la tesis en el tema de injertos de cactáceas.

Al Dr. José Alfredo Carrillo Salazar, por su valiosa colaboración en la revisión y corrección de la presente tesis.

A todos los profesores del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, por su enorme enseñanza.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

DEDICATORIA

A mi madre **IRENE HERRERA RÓJAS**, por darme la vida y todo el amor y apoyo que se puede tener.

A mi esposa, **GLORIA NAYELI CASILLAS RUIZ**, por su amor, apoyo y comprensión.

A mis hijos, **DONOVAN REYES CASILLAS** y **JADE REYES CASILLAS**, por ser mi fuerza e inspiración.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS.....	7
HIPÓTESIS.....	8
REVISIÓN DE LITERATURA	9
Generalidades de <i>Opuntia robusta</i> H. J. Wendland (Anderson, 2001).....	10
Generalidades de <i>Ferocactus wislizeni</i> (Engelmann) Britton & Rose (Anderson, 2001).	11
Generalidades de <i>Ferocactus pilosus</i> (Galeotti) Werdermann (Anderson, 2001).	12
Germinación de cactáceas.	13
Injertos en cactáceas.	14
Cultivo <i>In vitro</i> de cactáceas.....	15
BIBLIOGRAFÍA	17
CAPÍTULO 1. RESPUESTA A LA INJERTACIÓN DE PLÁNTULAS MUTANTES DE <i>Opuntia robusta</i> C. Wendel. var. CP-Tepemor	27
RESUMEN	27
SUMMARY	28
1.1. INTRODUCCIÓN	29
1.2 OBJETIVOS.....	32
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.3.1. Dinámica de la germinación y producción de plántulas de diferente tipo... 33	
1.3.2. Prendimiento y sobrevivencia de plántulas injertadas.	33
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

1.4.1. Dinámica de la germinación y producción de plántulas de diferente tipo...	36
1.4.2. Prendimiento y sobrevivencia de plántulas injertadas.....	40
1.5. CONCLUSIONES	49
1.6. BIBLIOGRAFÍA	50
CAPÍTULO 2. USO DE AG₃ COMO COADYUVANTE PARA LA GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.	55
RESUMEN	55
SUMMARY	56
2.1. INTRODUCCIÓN	57
2.2. OBJETIVOS.....	62
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.3.1. Germinación.	63
2.3.2. Registro de variables.....	64
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
2.4.1. Germinación.	66
2.4.2. Índice de Velocidad Germinativa.	70
2.4.3. Toma de datos de variables cuantitativas.	71
2.4.4. Brotación apical.....	73
2.4.5. Pruebas de viabilidad.....	74
2.5. CONCLUSIONES	79
2.6. BIBLIOGRAFÍA	80
CONCLUSIONES GENERALES	86

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO 1. RESPUESTA A LA INJERTACIÓN DE PLÁNTULAS MUTANTES DE *Opuntia robusta* C. Wendel. var. CP-Tepemor

Cuadro 1.1. Tipos de plántula injertadas con dos técnicas.....	34
Cuadro 1.2. Frecuencias relativas de plántulas de <i>O. robusta</i> var. CP-Tepemor germinadas en los años 2016 y 2017.....	39
Cuadro 1.3. Plántulas injertadas y vivas al mes 4.	40
Cuadro 1.4. Relación del Callo con la turgencia y la altura de los injertos de plántulas de CP-Tepemor, a los 120 días de injertado.	43
Cuadro 1.5. Pérdida de turgencia en injertos de mutantes rosas.	47

CAPÍTULO 2. USO DE AG₃ COMO COADYUVANTE PARA LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.

Cuadro 2.1. Germinación e Índice de Velocidad Germinativa por tratamiento.	70
Cuadro 2.2. Comparación de variables por tratamiento.	71
Cuadro 2.3. Brotación apical por tratamiento.....	73
Cuadro 2.4. Tinción en pruebas de viabilidad y germinación.....	74

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. RESPUESTA A LA INJERTACIÓN DE PLÁNTULAS MUTANTES DE *Opuntia robusta* C. Wendel. var. CP-Tepemor

Figura 1.1. Tipo de plántula en la germinación de semillas de CP-Tepemor.	36
Figura 1.2. Cinética de la germinación de las semillas de CP-Tepemor.....	37
Figura 1.3. Periodo de germinación de semillas de CP-Tepemor y plántulas obtenidas por semana.	37
Figura 1.4. Tipos de plántulas producidas por CP-Tepemor: Plántulas rosas (A), verdes (B), moradas (C) y variegadas (D).	38
Figura 1.5. Frecuencias relativas de las variables de crecimiento de los injertos	41
Figura 1.6. Injertos: Rosa en perforación después de diez días (A), injerto verde en caras planas después de 45 días (B), injerto morado en perforación después de 45 días (C) e injerto variegado en perforación después de 70 días.	42
Figura 1.7. Brotación vegetativa en areolas del patrón de <i>O. robusta</i> var. CP- Tepemor (A) y formación de callo en el injerto (B).	44
Figura 1.8. Aborto del injerto por aparición de raíces adventicias en hipocótilo (A) y raíces adventicias en cladodio (B).	44
Figura 1.9. Corrugación del tallo (X) por pérdida de turgencia en injerto de caras planas (A) y turgencia aparente normal en injerto de perforación (B).	45
Figura 1.10. Plántula rosa injertada en caras planas. A los diez días de germinada (A) y a los cinco días de injertada (B).	46

CAPÍTULO 2. USO DE AG₃ COMO COADYUVANTE PARA LA GERMINACIÓN IN VITRO DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.

Figura 2.1. Porcentaje de germinación de los tratamientos.	66
Figura 2.2. Germinación de semillas por especie y tratamiento.	68

Figura 2.3. Germinación acumulada para los tratamientos.....	69
Figura 2.4. Semillas germinadas con remojo en AG₃: A= <i>F. wislizeni</i>, B= <i>F. pilosus</i>. Tamaño de la referencia= 10 mm	71
Figura 2.5. Detalles de plántulas. A= <i>F. pilosus</i>, B= <i>F. wislizeni</i>, C y D= Detalles de las areolas en <i>F. pilosus</i> y <i>F. wislizeni</i>, respectivamente. Tamaño de la referencia= 10 mm	72
Figura 2.6. Tinción progresiva de <i>F. pilosus</i> con Tz y corte de la semilla.....	75
Figura 2.7. Tinción de semillas de <i>F. wislizeni</i> con IC.....	76

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las cactáceas son plantas que crecen en condiciones áridas y semiáridas y la característica que las distingue es que presentan areolas que pueden generar hojas, espinas, flores, frutos, nectarios y ramas vegetativas (Mauseth, 2006); además presentan adaptaciones morfológicas como espinas, cutícula cerosa, raíces con desarrollo horizontal, tallos carnosos, y mecanismos fisiológicos como el metabolismo ácido crasuláceo (MAC) y letargo en las semillas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015) que les permite sobrevivir en esos ambientes.

Originarias de América, se estima que hay alrededor de 1400 especies con 62 géneros y 677 especies, de las cuales 518 son endémicas México, lo que coloca al país como el principal centro de diversidad de cactáceas (Estrada-Arellano *et al.*, 2018); no obstante, la destrucción de su hábitat y el saqueo son factores que reducen sus poblaciones, porque tienen limitantes para restablecerse después de alguna perturbación en su hábitat (Hernández y Godínez, 1994).

El aprovechamiento de algunas cactáceas data de miles de años, como el caso de las plantas columnares del Valle de Tehuacán y la zona de la Mixteca baja (Luna-Morales, 2004) y los nopales (*Opuntia spp.*) se consumen desde la época prehispánica (Gondim-de Albuquerque *et al.*, 2018) y forman parte del escudo nacional; algunas especies ahora tienen importancia en varios países donde son aprovechadas como verdura, forraje, fruta, en la agroindustria y la farmacéutica (Feugang y Stintzing, 2006). En los ecosistemas, contribuyen en el proceso de edafogénesis y supervivencia de poblaciones microbianas

(Alaníz-Rodríguez *et al.*, 2015), sirven de refugio y brindan nutrientes a fauna nativa (Delgado-Fernández *et al.*, 2017).

Entre sus usos destaca el ornamental debido a la belleza de sus flores, el color y forma de sus espinas y tallos, el tamaño, presencia de fieltro, pelos, colores diversos provocados por mutaciones, entre otras características; por ello el saqueo ilegal de especies de su hábitat ha puesto en riesgo de extinción a muchas especies (Duarte *et al.*, 2014); ante esto el gobierno Mexicano creó la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, para la protección de especies nativas de México, incluidas las cactáceas. Sin embargo, el interés de los coleccionistas para adquirir estas plantas no ha cesado; por lo anterior es necesario establecer estrategias para su conservación y aprovechamiento sustentable, que entre las acciones incluyan estudios de las poblaciones silvestres para conocer su estatus (Estrada-Arellano *et al.*, 2018), importancia ecológica (Rosano-Hinojosa *et al.*, 2018), cultural (Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010); para el establecimiento de centros de investigación y propagación de estas plantas, como el Jardín botánico Helia Bravo-Hollis, en Puebla, el Jardín Botánico de la U.N.A.M, el Museo del desierto de Coahuila y viveros comerciales, cuyo propósito sea el de propagar y comercializar plantas cultivadas para evitar la recolección ilegal de estas plantas; a nivel internacional hay trabajos de viveros o instituciones como el Jardín Botánico de Huntington, (Trager, 2013); el Arizona Cactus Garden y el Jardin Exotique de Mónaco.

Asimismo, es importante conocer los aspectos ecológicos que favorecen las poblaciones de especies amenazadas, para su conservación (Álvarez *et al.*, 2004); e incluir estrategias de

protección y restauración de estas poblaciones en los protocolos de propagación de cactáceas. (Hernández-Oria *et al.*, 2007).

La reproducción sexual de las cactáceas en algunos casos se ve afectada por factores que ponen en riesgo las poblaciones en su hábitat, como son la producción limitada de semillas (Choreño-Tapia *et al.*, 2002), bajas tasas de germinación (Rodríguez-de Francisco *et al.*, 2013), crecimiento lento y baja tasa de supervivencia de las plántulas (Arellano-Perusquia *et al.*, 2013), aunado a que algunas especies tiene un gradiente de germinación afectado por factores como el tamaño, edad de las semillas y agentes inhibidores de germinación (Guillén-Trujillo *et al.*, 2011) entre otros. Debido a su morfología (Reyes-Agüero *et al.*, 2005) y las características de las areolas (Mauseth, 2006) la reproducción asexual en algunas especies como *Chamacereus silvestrii*, *Echinopsis sp.*, *Opuntia sp.*, entre otras, es exitosa; aunque, en otras como *Turbinicarpus sp.*, *Ferocactus sp.* o algunas *Mammillarias* como la *M. theresae* o *M. plumosa*, se dificulta su reproducción asexual aunque generen vástagos o hijuelos.

El injerto en cactáceas es una técnica utilizada con el objetivo de favorecer la floración, brotación vegetativa, mayor crecimiento y supervivencia de las plantas injertadas, además de la presentación comercial de las plantas, destaca la injertación de mutantes aclorofílicos que requieren ser injertados para sobrevivir (Rowley, 2009); consiste en la unión del tejido vascular de dos plantas a través de cortes en éstas; sin embargo, hay factores que determinan el prendimiento de los injertos en cactáceas, como la técnica utilizada, incidencia de hongos, bacterias, estrés por deshidratación en los tejidos, formación de callo, uso de reguladores de crecimiento, entre otros (Ladan-Moghadam *et al.*, 2012).

Un micro injerto en cactáceas es la técnica donde se usan fracciones menores de tejido de la planta a injertar sobre el patrón o porta injerto; se usa para incrementar la respuesta en la productividad de algunas especies raras, eliminar enfermedades, rejuvenecer tejidos maduros, tener producción de brotes todo el año, incrementar la productividad con combinaciones genotípicas específicas de injertos y para la adaptación de las plantas a condiciones adversas (Ladan-Moghamad *et al.*, 2012); puede brindar ventajas en variedades aclorofílicas que su ciclo de vida se ve afectado por su condición (Estrada-Luna *et al.*, 2002). En la germinación de semillas de *O robusta* var. CP-Tepemor se han encontrado diferentes tipos de plántulas con hipocótilo y cotiledones de color rosa, morado y con variegación, además de verdes. Las plántulas de color rosa no sobreviven después de 10 días de emergencia, sin que se presente brotación del tallo (Pacheco-Aguilar, 2017) este tipo de mutantes aclorofílicos pueden ser una alternativa en la generación de cactáceas con un alto valor comercial, como es el caso de *Gymnocalycium mihanovichii*, cuyos ejemplares aclorofílicos son injertados para que sobrevivan y se desarrollen (Myeong-II *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos en cactáceas es una alternativa para la rápida propagación de especies de forma asexual, aunque también se utiliza con semillas, para mejorar la germinación y la obtención de material vegetal inocuo; el medio de cultivo MS con agar o gelrite como gelificante y el uso de reguladores de crecimiento como la bencil-adenina, bencil amino purina ó kinetina en combinación con ácido naftalen acético o ácido indolacético para la propagación y el Ácido indolacético o el ácido indolbutírico para el enraizamiento de los brotes, funciona en diferentes combinaciones de acuerdo a cada

especie (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998, Seeman *et al.*, 2007, Lema-Ruminska y Kuluz, 2014).

Ferocactus wislizeni es una especie atractiva por la presencia en promedio de 16 espinas por areola, color marrón, de 5 cm de largo y por sus flores rojas o amarillas de 5 cm de longitud y diámetro; mientras que *Ferocactus pilosus* tiene como atractivo la presencia en promedio de 9 espinas color rojo de 5 cm y sus flores amarillas (Anderson, 2001). El uso de AG₃ en la germinación, en el cultivo *In vitro* de cactáceas, se ha probado en *Ferocactus hixtrix* (Loustalot-Laclette *et al.*, 2014) y *Mammillaria pectinifera* (Navarro y Demenegui, 2007); sin embargo al usar la misma concentración en los tratamientos, se tienen diferentes respuestas en cada especie; las especies de *Ferocactus* tienen potencial como plantas de ornato y su reproducción por semilla puede mejorar con la adición exógena de reguladores de crecimiento vegetal, como el AG₃ (Amador-Alfárez *et al.*, 2013).

En las evaluaciones de lotes de semillas, es importante conocer las características que pueden presentar éstas cuando se usen, aspectos como la viabilidad, el vigor y la germinación posibilitan este conocimiento. Los ensayos de germinación en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad pueden aportar datos de su viabilidad, mientras que el vigor se relaciona con las propiedades relacionadas con la actividad de la semilla en la germinación y a nivel de plántula (Pérez-García y Pita-Villamil, 2001); las pruebas de viabilidad de semillas que no presentan letargo, son técnicas para la observación de la capacidad de germinación que implica la respuesta de la semilla ante su exposición a un compuesto o proceso (Barone *et al.*, 2016), dentro de éstas se encuentran las de tinción de tejidos, que es la que se recomienda cuando se presenta letargo o una velocidad de

germinación muy baja; la prueba de Cloruro de Tetrazolio (Tz) tiñe las partes que presentan actividad metabólica de la semilla, las partes no teñidas son indicadoras de tejido muerto; la prueba de Índigo Carmín (IC) es más específica, ya que su indicador se basa en la tinción exclusiva de las partes muertas de la semilla (Benito-Matías *et al.*, 2004).

En cactáceas, las semillas presentan diversos mecanismos asociados a la supervivencia en su hábitat a lo largo del tiempo, como la presencia de funículo y testa lignificada en *Opuntia* (Guerrero-Muñoz *et al.*, 2006), testa resistente a ácidos gástricos de animales dispersores en *Hylocereus*, *Pachycereus*, *Ferocactus*, o requerimientos específicos de luz y temperatura, como en *Carnegiea gigantea* y *Stenocereus thurberi* (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000), esto puede generar variación en el tiempo de germinación de las semillas al plantarse, así como el vigor en las plántulas (Navarro y González, 2007), por lo que es necesario llevar a cabo pruebas como la tinción de semillas para determinar la viabilidad de las semillas ya que no se tienen muchos registros de trabajos de esta índole.

OBJETIVOS

1. Evaluar dos técnicas de micro injertación de plántulas de *O. robusta* var. CP-Tepemor.
2. Evaluar el efecto de la escarificación con H₂SO₄ y AG3, en la germinación de semillas *In vitro* de *Ferocactus wislizeni*, *Ferocactus pilosus* y *O. robusta* var. CP-Tepemor, el crecimiento subsecuente de las plántulas y la adaptación a condiciones de invernadero de plántulas de *F. wislizeni* y *F. pilosus* obtenidas *In vitro*.
3. Evaluar dos pruebas de viabilidad en semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus*.

HIPÓTESIS

1. Las técnicas de micro injertación de plántulas de *O. robusta* var. CP-Tepemor, difieren en el prendimiento, así como en el periodo de vida de plántulas mutantes aclorofílicas.
2. La escarificación con H_2SO_4 y AG_3 en semillas de *F. wislizeni*, *F. pilosus* y *O. robusta* var. CP-Tepemor, favorecen la germinación *In vitro* y el crecimiento de las plántulas, así como su adaptación a condiciones de invernadero.
3. El uso de Índigo Carmín en las pruebas de viabilidad en semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus* puede ser igual de efectiva que la prueba de Cloruro de Tetrazolio.

REVISIÓN DE LITERATURA

La flora en México presenta una amplia variación, que le da una importancia a nivel mundial; en ella destacan las cactáceas que se distribuyen principalmente en las regiones áridas y semiáridas del país que ocupan el 67% del territorio y que tienen un papel importante en la ecología, cultura, sociedad y economía (Ojeda-Zacarías *et al.*, 2012).

La familia Cactaceae es de origen Americano y se distribuye desde Canadá hasta Argentina; estas plantas tienen diferentes usos como alimento (Chougui *et al.*, 2013), medicina (Silva-Hugues *et al.*, 2015), como parte de rituales místicos (Guzmán-Chávez y Kindl, 2017) y otros entre los que destaca su importancia ornamental. Específicamente en México, 296 taxones están amenazados, protegidos o en peligro de extinción (Arias-Montes *et al.*, 2005), por la destrucción de su hábitat resultado del cambio de uso de suelo, apertura de zonas para agricultura, ganadería, construcción de caminos y saqueo ilegal de sus poblaciones silvestres (Santos-Díaz *et al.*, 2001). En la regulación internacional, la NOM-059-ECOL-2001) enlista 255 taxones de cactáceas Mexicanas, 65 se encuentran en el “Libro Rojo” de la unión internacional para la conservación de la naturaleza (UICN) y 41 en el Apéndice I de la guía de la Convención sobre comercio de especies amenazadas de flora y fauna silvestre (CITES) y el resto en el apéndice II (Jiménez-Sierra, 2011); por lo cual se deben buscar sistemas de producción intensivos para evitar la extracción de las cactáceas de sus hábitats. (Seeman *et al.*, 2007).

La demanda de cactáceas como plantas de ornato o de colección es alta a nivel comercial internacional por la rareza, belleza y su hermosa floración; en cuanto a su reproducción se pueden obtener individuos nuevos de forma asexual, con esquejes o

hijuelos, o sexual a través de la germinación de semillas y en algunas especies no se cuenta con una metodología que resulte satisfactoria, sobre todo en las especies en peligro de extinción (Salas-Cruz *et al.*, 2011).

La evolución de los cactus generó un proceso de diversificación; se pueden encontrar géneros como *Pereskia* y *Pereskiaopsis*, con individuos arborescentes, con hojas carnosas y madera, *Maihuenopsis* y *Opuntia*, con tallos carnosos, fotosintéticos y hojas reducidas. Las areolas pueden generar brotes, espinas, fieltro, flores y frutos. Sus adaptaciones morfológicas y fisiológicas les permiten subsistir en hábitats variados, no sólo en climas áridos (Mauseth, 2006).

Generalidades de *Opuntia robusta* H. J. Wendland (Anderson, 2001).

El género *Opuntia* pertenece a la Tribu *Opuntieae*, la especie *O. robusta* comprende plantas grandes, arbustivas muy ramificadas, con tronco definido, cladodios verde-azulado, orbiculares, de 15 a 40 cm de longitud, robustos, gruesos de 1.5 a 2.5 cm de espesor, areolas distantes entre sí 4 a 5.5 cm, ovadas, más elevadas en las partes inferiores del cladodio, glóquidas numerosas, amarillentas a morenas, hojas cortas cónicas en cladodios jóvenes. Espinas vigorosas, 2 a 12, de 5 cm de longitud, blancas. Flores grandes, amarillas, de 5 a 7 cm de longitud, lóbulos del estigma vedes. Fruto anchamente subgloboso, areolas con abundantes glóquidas amarillas grandes, de 4 a 8 cm de longitud, verde amarillento a purpurino, comestible. Se distribuye en los estados centrales de México.

Generalidades de *Ferocactus wislizeni* (Engelmann) Britton & Rose (Anderson, 2001).

Plantas con tallos simples, globosos o columnares, hasta 3 m de altura y 60 cm de diámetro. Costillas de 20 a 30, de 3 cm de altura: Areolas grandes, ovales, 2.5 cm de longitud, con lana de color castaño cuando jóvenes. Espinas variables en número, tamaño y color; espinas radiales hasta 12, de 5 cm de longitud, desde setosas hasta aciculares; espinas centrales 4, dispuestas en cruz, color variable, redondeadas, rectas, 5 cm de longitud, la inferior más gruesa, aplanada con la punta ganchuda, de 8 a 10 cm de longitud; espinas glandulares cortas, brotando entre el fascículo de espinas y la región florífera. Flores infundibuliformes de 4 a 5 cm de longitud y diámetro, rojas o amarillentas, estambres numerosos, filamentos rojos de 5 a 10 mm. Fruto angostamente ovoide, hasta de 5 cm de longitud y 3 cm de diámetro, amarillo, provisto de escamas carnosas ciliadas. Semillas redondeadas o a veces anguladas, de 2.25 a 2.5 mm de longitud, con testa alveolada y arrugada. Se distribuye al Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos de América.

Esta especie es nativa del Desierto de Chihuahua y de Sonora, con potencial para adaptarse en su hábitat al cambio climático (Cortés *et al.*, 2014), con una subespecie y siete variedades reportadas (Fencl y Kalas, 2013) tiene potencial como planta de ornato (Tarango-Arámbula, 2005), pero se tiene baja germinación en la reproducción sexual por agentes inhibidores (Bowers, 2000) y puede ser susceptible al ataque de Coleópteros (Ferro *et al.*, 2013).

Generalidades de *Ferocactus pilosus* (Galeotti) Werdermann (Anderson, 2001).

Planta simple o cespitosa. Tallos columnares, hasta de 3 m de altura y 50 cm de diámetro. Costillas 13 a 20, no tuberculadas en plantas adultas, algo agudas. Areolas ovadas, hasta de 20 mm de longitud y 8 mm de ancho, densamente tomentosas cuando jóvenes, confluentes en plantas adultas. Espinas no diferenciadas en radiales y centrales, 4 más centrales de 5 cm de longitud, dispuestas en cruz, 2 a 5 subcentrales algo más cortas que las principales y varias más apicales y basales aún más pequeñas, todas ellas subuladas, anuladas, ligeramente curvas, extendidas de color rojo o amarillo o ambos colores, cerdas marginales radiadas en torno de la areola. Espinas glandulares persistentes. Flores numerosas, dispuestas en corona cerca del ápice del tallo, de unos 4 cm de longitud, amarillas o rojas, incluidas entre las espinas, antera amarilla, lóbulos amarillos. Fruto ovoide, de 3 a 4 cm de longitud, amarillo. Semillas de 1.5 a 2 mm de longitud, testa alveolada, negra o color castaño oscuro, hilo basal algo largo, pequeño. Habita en el Norte del Altiplano Mexicano.

Esta especie se encuentra en la NOM-059-ECOL-2001 de SEMARNAT, como especie protegida (Pr), debido entre otros factores a que es una especie de crecimiento lento (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2018), el consumo de frutos por fauna nativa y colecta para consumo humano reduce el banco de semillas (Solano-Picazo y Blancas, 2018) y en la propagación por semillas tiene baja germinación por agentes inhibidores (Bowers, 2000).

Germinación de cactáceas.

La germinación de semillas de cactáceas se presenta sin dificultad en algunas especies, bajo requerimientos bióticos y abióticos particulares, sin embargo, en algunas la presencia de latencia, puede hacer que la reproducción por semillas se dificulte debido a bajas tasas de germinación (Ruiz-González *et al.*, 2011); otro problema es que en las poblaciones silvestres, los individuos adultos que producen semillas tienen poblaciones reducidas (Rodríguez –de Francisco *et al.*, 2013); además de que el número de semillas que producen algunas especies es reducida (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2011). A nivel ambiental, hay factores como la disponibilidad de agua, luz, tipo de suelo, temperatura y salinidad que pueden afectar la germinación de las cactáceas en su hábitat, además del tamaño de la semilla y que algunas especies pueden presentar latencia en las semillas. (Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004).

La latencia en las semillas es el estado en que por diversos factores, las semillas no germinan a pesar de que no tienen algún daño y son fisiológicamente viables y tienen las condiciones de temperatura, humedad, luz y concentración de gases que requieren; la causa de la latencia puede ser diversa y se relaciona con contenido de agua por la semilla, tamaño de la semilla, tipo de testa, estado de madurez del embrión y en algunos casos por factores químicos endógenos de la semilla; se conocen diversos métodos para contrarrestar la latencia en semillas, entre los que se encuentran la escarificación química con alguna hormona (giberelinas) o ácido, (HCl, H₂SO₄) o utilizando otros métodos como escarificación física, tratamientos con temperatura (estratificación), humedad y sequía entre otros (López-Velarde, 2014).

La escarificación en cactáceas es un método que se usa en las semillas para reblandecer la testa y a su vez eliminar agentes inhibidores, con la finalidad de favorecer la germinación, se usan ácidos como el clorhídrico o el sulfúrico concentrados y tiempos de exposición de las semillas, que van desde 1, 3 a 5 min. (Navarro y González, 2007).

Las cactáceas durante distintas etapas de su vida establecen relaciones bióticas que son favorables para su crecimiento, con otras plantas en su hábitat, a lo que se le conoce como nodrizaje (Muro-Pérez *et al.*, 2011); para la germinación de las semillas de cactáceas es importante el nodrizaje, para reducir la temperatura en el día, mantener la humedad y temperatura del suelo, evitar escorrentías de agua, protección contra daño por herbívoros e insectos, entre otros factores (Muro-Pérez *et al.*, 2009).

Injertos en cactáceas.

El injerto en cactáceas es una técnica que une a dos plantas para formar un solo individuo, a través de la unión de tejido vascular y la formación de un callo en éste (Erwin, 1996). El injerto o púa aporta la parte aérea y el porta injerto la raíz y la parte del tallo; el porta injerto brinda nutrientes, reguladores y soporte al injerto, se usa para la propagación, el rescate de ejemplares dañados o enfermos, para incrementar la floración o acelerar el crecimiento. Algunos de los tipos de injerto usados en cactáceas son el plano o caras planas, perforación, de brote y lateral (Bayat *et al.*, 2015). El injerto de cactus es necesario en algunas variedades aclorofílicas como los cultivares de *Gymnocalycium mihanovichii*, generalmente injertados en *Hylocereus trigonus* aunque también se pueden injertar en *Cereus peruvianus* y otras cactáceas Actualmente la producción de estos injertos en Corea

una actividad empresarial altamente redituable, que los incentiva a generar nuevos cultivares para el mercado internacional (Man-Park *et al.*, 2012).

Cultivo *In vitro* de cactáceas.

La micro propagación de plantas por medio de cultivo *In vitro*, es una industria de gran importancia a nivel mundial, que tiene muchas ventajas en comparación con los sistemas de producción de plántulas de forma tradicional; en México se concentra la producción *In vitro* en plantas ornamentales, algunos cultivos hortícolas y cactáceas (Vega-Cortés *et al.*, 2012). Se ha observado que en cactáceas, las plántulas derivadas del cultivo de tejidos crecen mucho más rápido y producen mayor número de nuevos brotes que en condiciones *ex vitro* (Malda *et al.*, 1999); además se reduce el tiempo de brotación, se obtienen individuos genéticamente iguales a la planta de donde proviene el explante usado y provee al mercado una planta sana y de buena calidad; el cultivo de tejidos también es útil para generar bancos de germoplasma para coadyuvar al rescate y conservación de poblaciones de cactáceas en riesgo (Arellano-Perusquia *et al.*, 2013).

Los medios de cultivo cumplen la función de brindar los elementos nutritivos necesarios para el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *In vitro* y la respuesta morfogénica depende de los elementos que integran el medio (López-Escamilla *et al.*, 2016), dentro de los elementos presentes en un medio de cultivo se pueden encontrar las fuentes de carbono, vitaminas, macro y micro nutrimentos, reguladores de crecimiento vegetal y agentes gelificantes, en concentraciones que permitan tener un potencial osmótico adecuado para el desarrollo óptimo de los explantes (Cárdenas-Lara y Villegas-Monter, 2002).

Las giberelinas son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicas que sintetizan las plantas (Squeo y Cardemil, 2006), involucradas en procesos de desarrollo vegetal; su síntesis está determinada por el fotoperiodo y condiciones de bajas temperaturas, aunque cabe resaltar que no se encuentran presentes en algunas plantas, como las variedades enanas de maíz, frijol y *Arabidopsis*; su efecto más notable es la inducción del crecimiento en la altura (Squeo y Cardemil, 2006). En cultivo de tejidos su uso se relaciona con tratamientos en la semilla para romper la latencia, aunque no en todos los casos se obtiene una respuesta favorable (Amador-Alfárez *et al.*, 2013; Loustalot-Laclette *et al.*, 2014; Sánchez-Villegas y Rascón-Chu, 2017; Rodríguez-Ruíz *et al.*, 2018); no obstante, se debe investigar a fondo el uso de AG₃ en cactáceas, ya que hay reportes que demuestran un efecto significativo en las variables estudiadas; Sánchez-Urdaneta y Peña-Valdivia (2011) demostraron que el AG₃ tiene buena movilidad en los tejidos de *Opuntia ficus-indica*, Varela-Delgadillo *et al.* (2018) indujeron partenocarpia en frutos de *Opuntia ficus indica* y Navarro y González (2007) obtuvieron un mayor porcentaje de germinación al usar AG₃ en semillas de *Ferocactus robustus* en comparación con un tratamiento de remojo en agua a 50°C/5 min.

BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz-Rodríguez, E., A. Mora-Olivo, J. Jiménez-Pérez, M. A. González-Tagle, J. I. Yerena-Yamallel, J. G. Martínez-Ávalos, L. E. González-Rodríguez. 2015.** Composición y diversidad del matorral desértico rosetófilo en dos tipos de suelo en el Noreste de México. *Acta Botánica Mexicana*. 110: 105-117.
- Álvarez, R., H. Godínez-Álvarez, U. Guzman, P. Dávila. 2004.** Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: Implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 75: 7-16.
- Amador-Alfárez, K. A., J. Díaz-González, S. Loza-Cornejo, E. Y. Bivián-Castro. 2013.** Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*. 35: 109-131.
- Anderson, E. F. 2001.** The cactus family. Timber Press, Inc. Oregon, USA. 776 p.
- Arellano-Perusquia, A., M. C. G. López-Peralta, F. Chablé-Moreno, A. A. Estrada-Luna. 2013.** Effect of grow regulators on the organogenesis and multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*. 13: 160-167.
- Arias-Montes, S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto-Galván, J. Golubov. 2005.** Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La lista roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y suculentas mexicanas*. 50: 100-125.

- Barone, J., E. Duarte, C. Luna. 2016.** Determinación de la eficacia de métodos de evaluación de calidad de semillas de especies forestales nativas de la selva del Atlántico. *Quebracho*. 24: 70-80.
- Bayat, N., R. Naderi, A. R. Maidani. 2015.** Does Grafting Time Affect the Cactus Performance? *Journal of Biology Environmental Science*. 9: 143-149.
- Benítez-Rodríguez, J. L., A. Orozco-Segovia, M. Rojas-Aréchiga. 2004.** Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. *The Southwestern Naturalist*. 49: 11-17.
- Benito-Matías, L.F., N. Herrero-Sierra, I. Jiménez, J.L. Peña-Rubira. 2004.** Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de Tetrazolio e Índigo carmín. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 17: 23-28.
- Bowers, J. E. 2000.** Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank? *Journal of Arid Environments*. 45: 197-205.
- Cárdenas-Lara, M. A., A. Villegas-Monter. 2002.** Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *In vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25: 213-217.
- Castillo-Campohermoso, A. D., A. López-Espinosa, I. Ocampo-Fletes. 2010.** Conocimiento y uso de cactáceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Ra Ximhai*. 6: 347-353.
- Choreño-Tapia, J. M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado, A. Hernández-Livera. 2002.** Propagación *In vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 8: 183-196.

- Chougui, N., A. Tamendjari, W. Hamidi, S. Hallal, A. Barras, T. Richard, R. Larbat.** 2013. Oil composition and characterization of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. Food Chemistry 139: 796-803.
- Cortés, L., Domínguez, I., T. Lebgue, O. Viramontes, A. Melgoza, C. Pineda, J. Camarillo.** 2014. Variation and Distribution of Four Cacti Species Due to Climate Change in Chihuahua, México. International Journal of Resources Public Health. 11: 390-402.
- Delgado-Fernández, M., J. G. Escobar-Flores, K. Franklin.** 2017. El cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) y sus interacciones con la fauna de la Península de Baja California, México. Acta Universitaria. 27: 11-18.
- Duarte, M., P. C. Guerrero, G. Carvallo, R. O. Bustamante.** 2014. Conservation network design for endemic cacti under taxonomic uncertainty. Biological Conservation. 176: 236-242.
- Erwin, J. E.** 1996. Temperature and Photoperiod Affect Grafted cactus Scion Necrosis. Hort Technology. 6: 393-396.
- Estrada-Arellano, J. R., A. E. Estrada-Castillón, M. M. Salinas-Rodríguez, J. Sánchez-Salas, E. O. Rueda-Puente, C. Márquez-Hernández.** 2018. Cactus diversity in the Sierra del Rosario, Durango, México. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 5: 133-141.
- Estrada-Luna, A. A., C. López-Peralta, E. Cárdenas-Soriano.** 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.

- Fencl, R., R. Kalas. 2013.** *Ferocactus wislizeni* susp. *Ajoensis* (Cactaceae), A new subspecies from south-western Arizona. *Bradleya*. 31: 5-14.
- Ferro, M. L., N. H. Nguyen, A. Tishechkin, J.-S. Park, V. Bayless, C. E. Carlton. 2013.** Coleoptera collected from rooting fishhook barrel cacti (*Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton and Rose), with a review of nearctic coleoptera associated with succulent necrosis. *The Coleopterist Bulletin*. 67: 419-443.
- Feugang, J., Stintzing, F. 2006.** Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia spp.*) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*. 11: 2574-2589.
- Guerrero-Muñoz, P., H. A. Zavaleta-Mancera, A. F. Barrientos-Priego, C. Gallegos-Vázquez, C. A. Nuñez-Colín, E. Valadez-Moctezuma, J. Cuevas-Sánchez. 2006.** Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia*. *Fitotecnia Mexicana*. 29: 37-43.
- Guillén-Trujillo, A., A. Palacios-Espinosa, J. L. Espinoza-Villavicencio. 2011.** Ecuaciones de predicción para estimar el potencial productivo de *Ferocactus* spp. *Interciencia*. 36: 785-788.
- Gondim-de Albuquerque, J., J. De Souza-Aquino, J. Gondim-de Albuquerque, T. G. Silva-de Farias, H. B. Escalona-Buendía, E. Bosquez-Molina, P. Moreira-Azoubel. 2018.** Consumer perception and use of nopal (*Opuntia ficus indica*): A cross-cultural study between México and Brazil. *Food Research International* (Artículo en Prensa)
- Guzmán-Chávez, M. G., O. Kindl. 2017.** Cosmopolítica versus etnonacionalismo. Conflictos en torno a usos rituales del espacio en Wirikuta. *Relaciones Estudios de Historia y Sociedad*. 152: 217-265.

- Hernández, H. M., Godínez, H. A. 1994.** Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.
- Hernández-Oria, J. G., R. Chávez-Martínez, E. Sánchez-Martínez. 2007.** Factores de riesgo en las cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto Chihuahuense, México. *Interciencia*. 32: 728-734.
- Jiménez-Sierra, C. L. 2011.** Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12: 3-23.
- Ladan-Moghadam, A. R., Z. Oragui-Ardebili, L. Rezaie. 2012.** Effect of índole butyric acid on micro grafting cactus. *African Journal of Biotechnology*. 11: 6484-6493.
- Lema-Ruminska, J., D. Kuluz. 2014.** Micropropagation of cacti-A review. *Haseltonia*, 18: 46-63.
- López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera, C. Loaiza-Alanís. 2016.** Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *In vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae). *Polibotánica*. 42: 153-166.
- López-Velarde, A. P., E. A. Ramírez-Hernández, A. Rocha-Estrada, M. A. Guzmán-Lucio, M. A. Alvarado-Vázquez. 2014.** Cuando las semillas duermen: La latencia. *Planta* 9: 18-21.
- Loustalot-Laclette, E., G. X. Malda-Barrera, H. Suzan-Azpiri, L. G. Hernández-Sandoval, A. Guevara-Escobar. 2014.** Estudio de germinación y crecimiento en semillas de *Ferocactus hixtrix* (De Candolle). *Cactáceas y suculentas Mexicanas*. 59: 79-95.

- Luna-Morales, C. del C. 2004.** Recolección, cultivo y domesticación de cactáceas columnares en la Mixteca baja, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 95-102.
- Malda, G., H. Suzán, R. Backhaus. 1999.** *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*. 81: 71-87.
- Man-Park, P., M. II-Jeong, B. Woo-Yae, M. Sun-Kim, Y. Ran-Lee, B. Sik-Yoo. 2012.** A New Grafted Cactus with Brighth Yellow Color, “Hwangseon”. *K. J. Hort. Sci. Technol.* 30: 342-344.
- Mauseth, J. D. 2006.** Structure-Function Relationships in highly Modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*. 98: 901-926.
- Muro-Pérez, G., U. Romero-Méndez, J. D. Flores-Rivas, J. Sánchez-Salas. 2009.** Algunos aspectos sobre el nodrizaje en *Astrophytum myriostigma* Lem. (1839) (Cactae: Cactaceae), en la Sierra El sarnoso, Durango, México. *Boletín Nakari*. 20: 43-48.
- Muro-Pérez, G. J. Sánchez-Salas, E. Jurado, J. Flores. 2011.** Importancia de las plantas nodrizas en la sobrevivencia de las cactáceas. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 8: 11-14.
- Myeong-II, J., C. Bong-Nam, K. Mi-Seon, J. J. S. Song, K. Jae-Yeong, Y. J. Park. 2006.** A new dark red graft cactus (*Gymnocalycium mihanovichii*) Cultivar, “Suhong”. *Korean Journal of Breed Science*. 38: 127-128.
- Navarro, M. del C., A. P. Deménegui. 2007.** Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. *Zonas Áridas*. 11: 233-239.

- Navarro, M. del C., E. M., González. 2007.** Efecto de la escarificación de Semillas en la Germinación y Crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). Zonas Áridas 11: 195-205.
- Ojeda-Zacarías, M. del C., R. E. Vázquez-Alvarado, J. A. Santos-Haliscak, G. Moreno-Degollado, V. Aguirre-Arzola, L. Iracheta-Donjuan, P. López-Gómez, M. Castellanos-Juárez. 2012.** Micro propagación de pitahaya, *Hylocereus undatus* (Haworth). Revista Salud Pública y nutrición. 4: 119-128.
- Pacheco-Aguilar, M. A. 2017.** Germinación de semillas y evaluación de la diversidad genética en plántulas de CP-Tepemor (*Opuntia robusta*) utilizando microsatélites. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados.
- Pérez-García, F., J. M. Pita-Villamil. 2001.** Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1-16.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. del R. Morones-Ruiz, H. J. Elizalde-Viramontes. 1998.** Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. In Vitro Cell. Dev-Biol.-Plant 34: 131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. del S. Santos-Díaz, R. Ramírez-Malagon, N. Ochoa-Alejo. 2015.** Tissue culture of ornamental cacti. Scientia Agricola. 72: 540-561.
- Reyes-Agüero, J. A., J. R. Aguirre-Rivera, H. M. Hernández. 2005.** Notas sistemáticas y una descripción detallada de *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Cactaceae. Agrociencia. 39: 395-408.
- Rojas-Aréchiga, M., C. Vázquez-Yanes. 2000.** Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments. 44: 85-104.

- Rodríguez-de Francisco, L. E., M. A. Daquinta, E. Fornet-Hernández, R. Cantillo-Ardeból, J. Vázquez. 2013.** Propagación *In vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. Ciencia y Sociedad. 38: 345-375.
- Rodríguez-Ruiz, E. R., W. A. Poot-Poot, J. A. Rangel-Lucio, H. Vaquera-Huerta, O. J. González-Gaona, J. Treviño-Carreón. 2018.** Germinación *In vitro* de biznaga cabuchera. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9: 691-699.
- Rosano-Hinojosa, A. M., A. P. Martínez-Falcón, C. Moreno, S. Martínez-Hernández, A. Ramírez-Hernández. 2018.** Diversidad de Coleópteros (Insecta: Coleoptera) asociados a cactáceas en descomposición en un matorral crasicaule Mexicano. Entomología Mexicana. 5: 233-238.
- Rowley, G. 2009.** *Gymnocalycium* in Cultivation-A survey of Cultivars. Haseltonia. 15: 80-101.
- Ruiz-González, S. P., M. Rojas-Aréchiga, M. del C. Mandujano. 2011.** Descripción morfológica y germinación de las semillas de *Echinomastus unispinus*. Cactáceas y suculentas Mexicanas. 56: 36-44.
- Salas-Cruz, L. R., R. Foroughbackch-Pournabav, M. de L. Díaz-Jiménez, M. L. Cárdenas-Ávila, A. Flores-Valdés. 2011.** Germinación *In vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3: 565-575.
- Sánchez-Urdaneta, A. B., C. B. Peña-Valdivia. 2011.** Movilización de AG3, TDZ y urea asperjados en cladodios de nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 1: 150-160.

- Sánchez-Villegas, A., A. Rascón–Chu. 2017.** Efecto de la escarificación química y del ácido giberélico en la germinación de *Mammillaria mainiae*. Cactáceas y suculentas Mexicanas. 62: 4-12.
- Santos-Díaz, M. del S., J. M. M. del Campo-Macías, A. Arredondo-Gómez, M. de L. Santos-Díaz. 2001.** Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (CACTACEAE). Revista Fitotecnia Mexicana. 24: 133-138.
- Seeman, P., C. Rodríguez, G. Jara. 2007.** Cultivo *In Vitro* de cactáceas con fines de conservación *ex situ*. Agro Sur. 35: 24-26.
- SEMARNAT. 2010.** Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y de especificaciones para su inclusión, exclusión y cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.
- Silva-Hugues, A. F., D. E. Wedge, C. L. Cantrell, C. R. Carvalho, Z. Pan, R. M. Moraes, V. L. Maddox, L. H. Rosa. 2015.** Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. Microbiological Research. 175: 67-77.
- Squeo, F. A., L. Cardemil. 2006.** Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, Chile. 15: 1-28.
- Solano-Picazo- C., J. Blancas. 2018.** Etnobotánica de Wirikuta: Uso de recursos vegetales silvestres en el desierto de San Luis Potosí, México. Revista Etnobiología. 16: 54-77.

- Tarango-Arámula, L. A. 2005.** Problemática y alternativas de desarrollo de las zonas áridas y semi áridas de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 4: 17-21.
- Trager, J. N. 2013.** The Huntington botanical Gardens Presents the 2013 Offering of International Succulent Introductions. *Cactus and Succulents Journal*. 85: 48-59.
- Varela-Delgadillo, Ó. E., M. Livera-Muñoz, A. Muratalla-Lúa, J. A. Carrillo-Salazar. 2018.** Inducción de partenocarpia en *Opuntia spp.* *Revista Fitotecnia Mexicana*. 41: 3-11.
- Vega-Cortés, C. M., J. C. Sánchez-Pérez, M. Alvarado-Rodríguez, L. Almanza-Sánchez, S. Fraire-Velázquez. 2012.** Establecimiento de un sistema de micro propagación de *Peniocereus greggii* (Engelman) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica*. 4: 1-7.
- Villavicencio-Gutiérrez, E. E., A. González-cortés, A. Arredondo-Gómez, L. Iratecha-Donjuan, S. Comparan-Sánchez, R. Casique-Valdés. 2011.** Micro propagación de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha Cactácea ornamental del desierto Chihuahuense, en estatus de riesgo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2: 37-54.

CAPÍTULO 1. RESPUESTA A LA INJERTACIÓN DE PLÁNTULAS MUTANTES

DE *Opuntia robusta* C. Wendel. var. CP-Tepemor

RESUMEN

El genotipo CP-Tepemor (*Opuntia robusta*) produce plántulas verdes, variegadas, moradas y una proporción de mutantes aclorofílicos de color rosa que mueren a los diez días de germinada. Las de color rosa podrían utilizarse como ornato si sobrevivieran por un mayor tiempo. Los objetivos de esta investigación fueron 1) caracterizar la dinámica de la germinación y la producción de plántulas de diferente tipo y 2) evaluar el prendimiento y la sobrevivencia de plántulas injertadas. Los tratamientos fueron ocho, resultado de la combinación de dos técnicas de injertación (caras planas y perforación) y cuatro tipos de plántulas (rosa, morada, variegada y verde); se utilizaron patrones de *O. robusta* var. CP-Tepemor obtenidas por semilla de 10 cm de altura. Se utilizó un diseño completamente al azar, la unidad experimental fue un injerto. De las plántulas que germinaron 22% fueron mutantes rosas; se tomó nota del prendimiento o aborto del injerto hecho con cada técnica. En los injertos que prendieron, a los 120 días se registró el largo, ancho, grosor de tallo y número de areolas. El injerto de perforación tuvo el 73% de prendimiento, mientras que el de caras plana tuvo el 30%. En las variables registradas se tuvieron diferencias a favor de los injertos de perforación; los injertos de perforación de plántulas rosa tuvieron un periodo de vida de hasta 23 días, mientras que cuando se injertaron con el método de caras planas solamente sobrevivieron 5 días. El hipocótilo como tejido de unión del injerto generó callo en los injertos que sobrevivieron en ambos casos. Los patrones de *O. robusta* var. CP-Tepemor presentaron características deseables para ser usados como porta injertos. En un segundo experimento donde se injertaron plántulas verdes de *O. robusta* con las dos técnicas de injertación mencionadas, se obtuvieron porcentajes de prendimiento similares, comparados con *O. robusta* var. CP-Tepemor.

Palabras clave: micro injertos, caras planas, perforación, mutantes aclorofílicos.

SUMMARY

The CP-Tepemor (*Opuntia robusta*) genotype produces green, variegated, purple and a proportion of pink achlorophyll mutants seedlings that die within ten days of germination. The pink ones could be used as decoration if they could survive for a long time. The objectives of this research were: 1) to characterize the germination dynamics and the production of different types of seedlings and 2) to evaluate the union and survival of grafted seedlings. The treatments were eight, result of the combination of two grafting techniques and four types of seedlings (rose, purple, variegated and green); Patterns of *O. robusta* var. CP-Tepemor by seed of 10 cm of height was used. The experimental unit was one graft. Of the seedlings that germinated 22% were pink mutants; the principle of abortion of the graft done was noted with each technique. In the grafts survivor, 120 days after were take size of long, wide, high and number of areolas. The cleavage graft has 73% of exit, while that of the flat faces had 30%. There are significant differences in the registered variables with the cleavage graft. The cleavage grafts of the pink mutants survive a period of life of up to 23 days whereas when they were grafted with the flat faces method they only survived 5 days. The hypocotyl as the tissue of the graft union generated the callus in the grafts that survived in both cases. The patterns of *O. robusta* var. CP-Tepemor has desirable characteristics to be used as a graft carrier. In a second experiment where they were grafted green seedlings of *O. robusta*, with the two grafting techniques mentioned, similar percentages of union were obtained, compared with *O. robusta* var. CP-Tepemor.

Keywords: micro grafts, flat faces, cleavage, achlorophyll mutants.

1.1. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas representan un recurso genético para enfrentar el cambio climático, particularmente las temperaturas altas y sequías (Rivera, 2013); son originarias de América con excepción de *Rhipsalis baccifera*, que proviene de África (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). Comprenden 110 géneros y cerca de 1779 especies (Hunt, 2006); México es centro de origen de 72 géneros (Guzmán *et al.*, 2007) y 518 especies (Estrada-Arellano *et al.*, 2018). Destacan por su importancia ecológica y su gran diversidad de usos, como son el alimenticio, medicinal, forrajero y ornamental, entre otros.

La supervivencia de las cactáceas está amenazada porque están sujetas a presión por la colecta ilegal, debido principalmente a su alto valor ornamental y destrucción de su hábitat, entre otros factores; por lo que la CONABIO las incluye en su lista de plantas con protección federal (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

El género *Opuntia* con 67 especies, en México (Akcelrad-Lerner, 2018) no destaca por su uso ornamental, sino por su uso para consumo humano (verdura y fruta), forraje y farmacéutico (Chougui *et al.*, 2013). Éstas plantas se usan desde la época prehispánica (Kiesling, 2013), y en la actualidad hay un gran interés en ellas como alimento y fuente de productos nutraceuticos (Fuegang y Stintzing, 2006) e industrial (Galicia-Villanueva *et al.*, 2017). Nazareno (2013) resume las propiedades que contienen los tallos, frutos y semillas de *Opuntia* spp., y cita su importancia como fuente de betacianinas y betaxantinas, vitaminas, minerales, fibra, polisacáridos, flavonoides, tocoferoles, compuestos fenólicos y el uso de éstos para preservar la salud humana por sus efectos como antioxidantes, antivirales, mejoradores de la digestión, salud vascular y acción cicatrizante.

Las especies de *Opuntia* son parte importante del paisaje del país, pero en el mercado tienen poca demanda como ornamento. Sin embargo, algunas especies se pueden usar como porta injertos (Estrada-Luna *et al.*, 2002).

El injerto es una técnica para unir dos plantas diferentes, una que será el patrón o porta injerto, que aporta la raíz y el injerto o púa que aporta la parte aérea; en cactáceas se usa con diferentes objetivos: mejorar el desarrollo de especies de crecimiento lento, rescatar plantas con raíces dañadas o enfermas, acortar el periodo juvenil, mejorar la producción de flores y frutos, lograr la supervivencia de plantas mutantes aclorofílicas o para obtener plantas ornamentales exóticas, entre otros.

Las técnicas básicas para injertar son tres.(Huffman, 2003): 1) caras planas, donde al patrón y al injerto se les hacen cortes horizontales para que después se unan, 2) perforación, al patrón se le hace un corte horizontal y después una perforación en el centro, al injerto en la base se le da forma de cuña y se inserta en la perforación, 3) cuña, donde al patrón se hace una incisión con dos cortes diagonales encontradas entre sí y al injerto en su base se le hacen dos cortes para darle forma de cuña de tal forma que se puedan ensamblar. Estrada-Luna *et al.* (2002) utilizaron la técnica de micro injerto *In vitro* en *Opuntia* spp. en caras planas, Arévalo (2000) la técnica de púa y Huffman (2003) reportó varias técnicas de injerto de cuña en cladodios maduros de *Opuntia* sp.(cuña en V, cuña caras planas, cuña en U).

Estrada-Luna *et al.* (2002) germinaron semillas *In vitro* de cinco especies de *Opuntia* (*O. streptacantha*, *O. robusta*, *O. cochinera*, *O. leucotricha*, *O. ficus-índica*) y con las plántulas obtenidas realizaron injertos, se usaron como patrones plantas de cada una de las

cinco especies; encontraron que la mejor opción es hacer injertos en patrones de la misma especie.

La variedad CP-Tepemor de *Opuntia robusta* se caracteriza por tener cladodios jóvenes (nopalitos) con pigmentación morada. Al auto polinizarla las semillas producen plántulas verdes y mutantes moradas, rosas y bicolors con intensidad de color variable. Las plántulas rosas son aclorofílicas y mueren a los 15 días de germinadas (Pacheco-Aguilar, 2017); las plántulas aclorofílicas se pueden injertar para lograr su supervivencia, como en el caso de *Gymnocalycium mihanovichii* (Myeong-II *et al.*, 2006) y *Chamacereus silvestrii* (Chang-Hui *et al.*, 2006) por lo que estos mutantes de CP-Tepemor pueden tener potencial como plantas injertadas para ornato.

Los cultivares aclorofílicos de *Gymnocalycium mihanovichii* presentan colores diversos que comprenden el rosa intenso, rojo, naranja, amarillo, morado y variegados que logran sobrevivir cuando se injertan en *Hylocereus* (Rowley, 2009). De esta manera continuamente se obtienen nuevas variedades, como es el caso de la variedad de color amarillo “Hwangseon” obtenida en Corea en el 2012 y que sobrevive injertándola (Man *et al.*, 2012).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la dinámica de germinación de semillas de la variedad CP-Tepemor; así como el crecimiento de cuatro tipos de plántulas de CP-Tepemor, injertadas con dos técnicas, en patrones de *O. robusta*.

1.2 OBJETIVOS

- Evaluar la dinámica de germinación de semillas de la variedad CP-Tepemor y cuantificar los tipos de plántula producidas.
- Determinar el prendimiento y crecimiento de cuatro tipos de plántulas de CP-Tepemor, injertadas con dos técnicas, en patrones de *O. robusta*.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Dinámica de la germinación y producción de plántulas de diferente tipo.

El experimento se condujo en condiciones de invernadero en Montecillo, Texcoco, Estado de México. Se escarificaron 200 semillas de *O. robusta* var. CP-Tepemor con H_2SO_4 al 100% en agitación por cinco minutos, seguido de la neutralización del ácido con Na_2CO_3 y tres enjuagues con agua destilada, después se colocaron para su germinación en contenedores de plástico con tapa y turba con diez semillas por contenedor. La germinación se registró diariamente y se tomó nota del tipo de plántula germinada. El periodo de germinación se evaluó durante diez semanas, se calcularon las frecuencias relativas de las diferentes plántulas clasificadas por color.

1.3.2. Prendimiento y sobrevivencia de plántulas injertadas.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, se usaron patrones de CP-Tepemor de seis meses de edad para hacer los injertos, a cada uno se le injertó una plántula; los tratamientos fueron ocho, resultado de la combinación de dos tipos de injerto: cara plana y perforación y cuatro tipos de plántulas. La unidad experimental fue un injerto y cada tratamiento tuvo diferentes repeticiones de acuerdo a las plántulas obtenidas (Cuadro 1). Se realizó la aleatorización de los patrones con el paquete Agricolae del Programa R para asignarles el tratamiento correspondiente. Se injertaron las primeras 60 plántulas que germinaron a los diez días de sembradas, en etapa de cotiledones presentes; para hacer ambos injertos se realizó un corte en el patrón a ocho cm de la base, de forma horizontal. Para el tratamiento de caras planas a la plántula se le eliminó la raíz haciendo un corte en el

hipocótilo en diagonal y se unió al corte del patrón, para el injerto de perforación al porta injerto en el corte horizontal se le hizo una cavidad vertical, insertándole una punta metálica, en la que se insertó el hipocótilo de la plántula al que se le hicieron dos cortes en diagonal para formar una cuña.

Cuadro 1.1. Tipos de plántula injertadas con dos técnicas.

Tratamiento	Descripción	No. de injertos
1	C.P. Verde	21
2	C.P. Variegada	-
3	C. P. Morada	1
4	C.P. Rosa	8
5	P. Verde	19
6	P. Variegada	2
7	P. Morada	1
8	P. Rosa	8

C.P.=Cara Plana, P.= Perforación.

Cada injerto estuvo diez días en una cámara húmeda para favorecer el prendimiento y luego se pasó a condiciones de invernadero. Se registró el prendimiento o aborto de la plántula injertada. En los injertos exitosos, a los 120 días de la brotación del tallo, se registraron las siguientes variables del injerto: largo, ancho, grosor y número de areolas.

Durante este periodo se tomó nota de las siguientes variables cualitativas: su presencia o ausencia de callo/raíces en el injerto; turgencia del hipocótilo y cotiledones de la plántula: deshidratada cuando se observó una disminución del tamaño de la plántula acompañado de

la aparición de bordes secos en el tejido, o normal; color de la plántula: verde, morado, rosa o variegado; días para la brotación del tallo de las plántulas injertadas.

Se determinó la relación que tuvieron las variables con la supervivencia y el éxito o fracaso de los injertos en los tratamientos. Para los mutantes aclorofílicos, en los tratamientos, se registraron las variables cualitativas: turgencia, aparición de tallo, supervivencia.

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Dinámica de la germinación y producción de plántulas de diferente tipo.

En total germinaron 65 de las 200 semillas (33%) de las cuales se tuvieron los siguientes porcentajes de acuerdo al color de las plántulas (Figura 1.1):

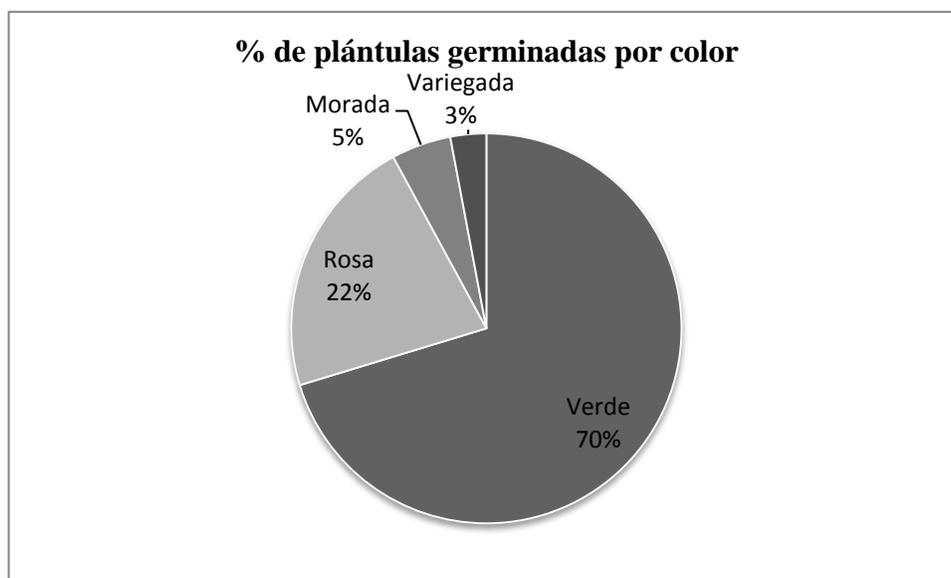


Figura 1.1. Tipo de plántula en la germinación de semillas de CP-Tepemor.

La germinación inició a partir de la segunda semana y continuó de forma paulatina, después de diez semanas no hubo más germinación. La aparición de los mutantes rosas tuvo lugar entre la segunda y séptima semana con un promedio de 2 plántulas rosas por semana, las verdes germinaron en todo el periodo con un promedio de 5 plántulas por semana, mientras que las moradas y las variegadas germinaron entre la tercera y la quinta semana (Figura 1.2). Entre las semanas dos y siete se presentó la germinación de 46 plántulas de diversos colores, 71% del total germinadas (Figura 1.3), en este periodo germinaron todas las rosas, moradas y variegadas (Figura 1.4). Las semillas de *Opuntia* tienen un periodo de germinación que se relaciona con la morfología (Guerrero-Muñoz *et*

al., 2006), capacidad de imbibición (Monroy-Vázquez *et al.*, 2017), edad de las semillas (Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2016), presencia de inhibidores (Ochoa *et al.*, 2015) o promotores de la germinación (Pinheiro *et al.*, 2001), entre otros.

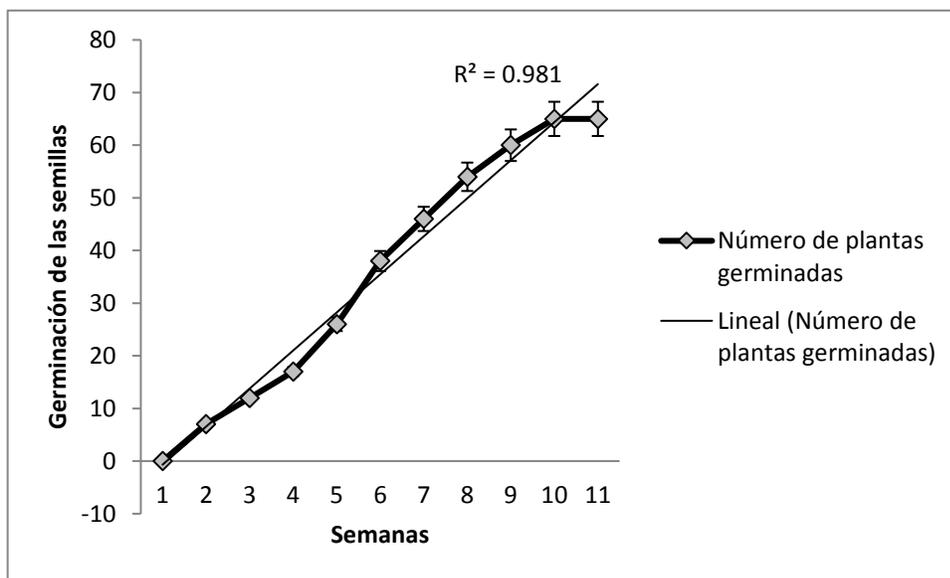


Figura 1.2. Cinética de la germinación de las semillas de CP-Tepemor.

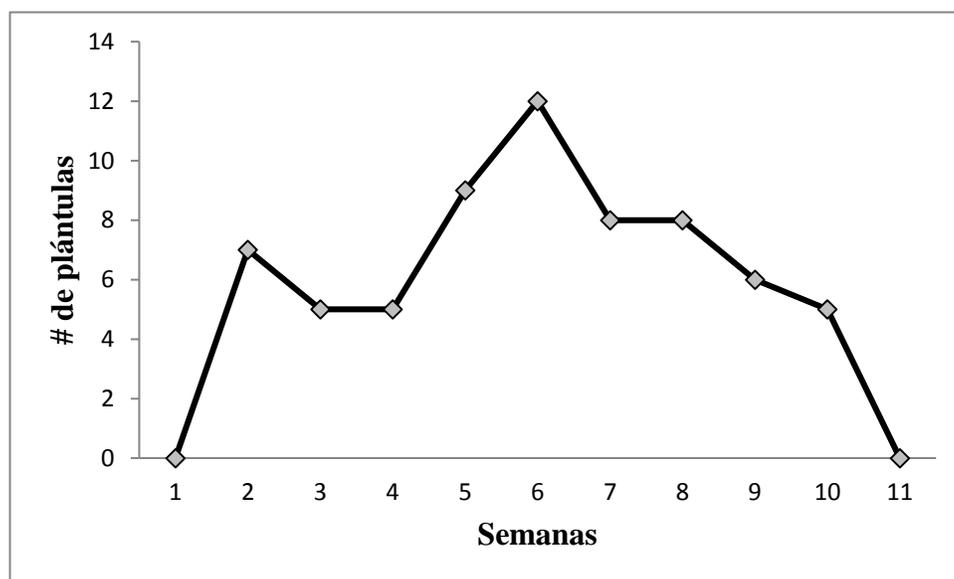


Figura 1.3. Periodo de germinación de semillas de CP-Tepemor y plántulas obtenidas por semana.



Figura 1.4. Tipos de plántulas producidas por CP-Tepemor: Plántulas rosas (A), verdes (B), moradas (C) y variegadas (D).

Las semillas de *O. robusta* var. CP-Tepemor fueron escarificadas con H_2SO_4 , lo que adelgazó la capa de lignina de la testa, la barrera física que limita la germinación se afectó; pero existen otros factores que disminuyen la germinación de las semillas de cactáceas, tal es el caso de inhibidores de la germinación, como el ácido abscísico (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011). Por lo que puede ser necesario el uso de promotores de la germinación como el ácido giberélico para mejorar la germinación de mutantes de *O. robusta* var. CP-Tepemor o algún agente que incida en la degradación de las hormonas o tenga un efecto que coadyuve a eliminar el letargo.

Altare *et al.* (2006) mencionan que la capacidad de germinación de *O. ficus-indica* es baja debido a la lignificación de los tegumentos de la semilla que envuelven el embrión, lo que obstruye la emergencia de la raíz; en un experimento que realizaron encontraron que la escarificación con H_2SO_4 concentrado durante cinco minutos en combinación con una incubación con H_2O_2 al 2.5% promovieron el 87% de semillas germinadas en un periodo de 60 días. El H_2SO_4 como escarificante degradó la lignina de la testa de las semillas y el H_2O_2 actuó como agente oxidante, degradó inhibidores de la germinación.

Al comparar el porcentaje de germinación obtenido en éste experimento (33%) con los porcentajes de germinación del 2016 del trabajo de Pacheco-Aguilar (2017) para CP-Tepemor (50%) y dado que las semillas de ambos experimentos procedieron del mismo lote, obtenido en 2015 por autofecundación, entre 2016 y 2017 se tuvo una disminución del porcentaje de germinación del 17%, ya que las semillas pueden perder viabilidad al pasar el tiempo y como fueron semillas obtenidas por autofecundación, pudo también disminuir la calidad de las mismas, como lo que observaron Padilha-Menezes *et al.* (2015) en frutos autofecundados de *Hylocereus undatus*.

Las frecuencias relativas de ambos experimentos se contrastaron en el Cuadro 1.2, el promedio de las frecuencias de los tres periodos de germinación del experimento de Pacheco en el 2016, comparados con las frecuencias de este experimento presentaron una disminución en la frecuencia relativa de los mutantes rosas, morados y variegados germinados en 2017, mientras que aumentó la frecuencia relativa para las plántulas verdes.

Cuadro 1.2. Frecuencias relativas de plántulas de *O. robusta* var. CP-Tepemor germinadas en los años 2016 y 2017.

Tipo de plántula	Germinación		D.f.r.g.
	2016*	2017	
	Frecuencia relativa		
Verdes	0.62	0.71	+0.09
Rosas	0.27	0.21	-0.06
Moradas	0.09	0.05	-0.04
Variegadas	0.01	0.03	-0.02
Total	1	1	

† D.f.r.g.: Diferencia de frecuencia relativa de germinación, el símbolo + indica un aumento, mientras que el símbolo – indica una disminución en la frecuencia relativa del 2017. La frecuencia relativa correspondiente a la germinación del 2016 es el promedio de tres periodos de germinación de semillas de *O. robusta* var. CP-Tepemor (*Pacheco, 2016).

1.4.2. Prendimiento y sobrevivencia de plántulas injertadas.

Se realizaron 60 injertos; de acuerdo a la aleatorización, las plántulas se injertaron con el tratamiento asignado conforme germinaban, a los diez días de germinadas, de la siguiente forma (Cuadro 1.3):

Cuadro 1.3. Plántulas injertadas y vivas al mes 4.

Tratamiento	Descripción	No. de injertos	Injertos vivos al mes 4
1	C.P. Verde	21	9
2	C.P. Variegada	-	-
3	C. P. Morada	1	-
4	C.P. Rosa	8	-
5	P. Verde	19	19
6	P. Variegada	2	2
7	P. Morada	1	1
8	P. Rosa	8	-

C.P.: Caras Planas, P.: Perforación.

Las variables morfológicas registradas en el cuarto mes después del injerto (Figura 1.5) corresponden a los injertos que sobrevivieron de cada tratamiento, agrupadas en intervalos de clase y con su frecuencia relativa.

Para la variable altura, en los intervalos de más de 6 cm hasta el de 24 cm, para caras planas se tuvo el 20% de frecuencia, mientras que en el de perforación fue del 60%, es decir, que los injertos de perforación tuvieron una altura mayor en un 40% que los de caras planas.

En los intervalos de la variable ancho de más de un cm, los injertos de caras planas agruparon al 20% del total, mientras que en perforación fue del 50%, por lo que el injerto en perforación favoreció 30% más el crecimiento en ancho que caras planas.

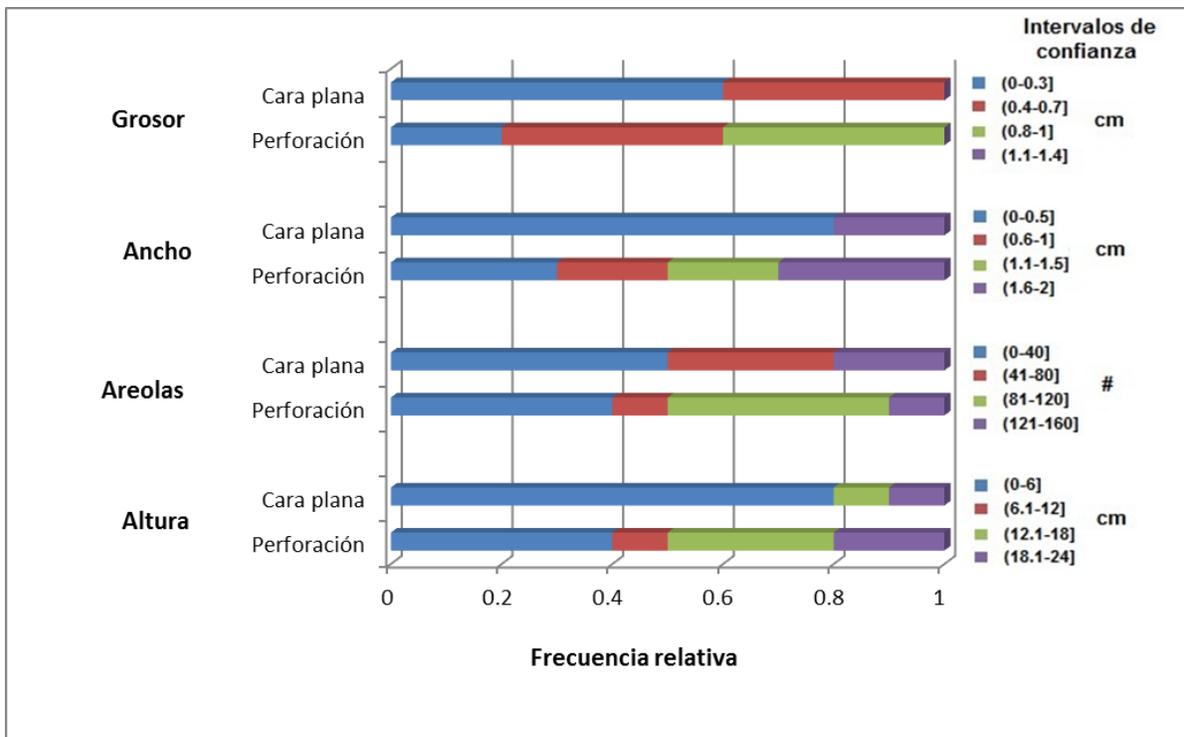


Figura 1.5. Frecuencias relativas de las variables de crecimiento de los injertos

En caras planas a partir del I.C. de 41 areolas hasta 160, se tuvo el 50%, para perforación se tuvo el 60%, por lo que los injertos de perforación aumentaron en 10% más la generación de areolas que caras planas. En conjunto, los injertos de caras planas desarrollaron en las plántulas 489 areolas en total con un promedio de 54 areolas por injerto, mientras que en perforación fueron 1736 areolas en total, con un promedio de 82; al

comparar los promedios, se observó que los injertos de perforación generaron en promedio 28 areolas más que los de caras planas.

En cuanto al grosor del tallo, los injertos en caras planas tuvieron una frecuencia del 40% en los intervalos de 0.4 hasta 1 cm, mientras que en perforación se presentó el 80%, por lo que los injertos de perforación favorecieron en un 40% el desarrollo en grosor, comparado con caras planas.

El tallo de las plántulas rosas no brotó, de las verdes y las moradas brotó en promedio a los 15 días de injertadas, tanto en caras planas como en perforación; sólo una plántula variegada desarrolló su ápice hasta los 45 días en perforación. (Figura 1.6).

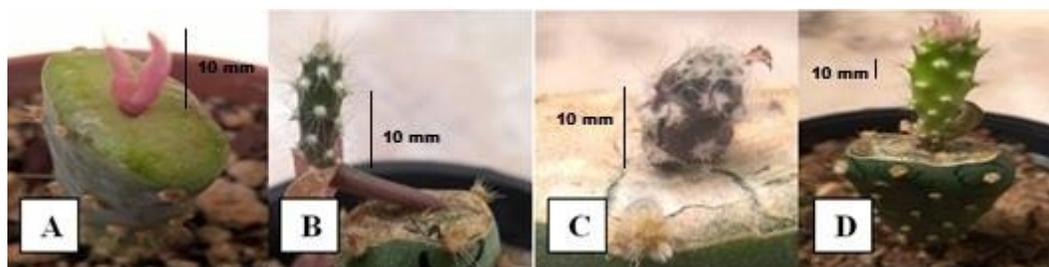


Figura 1.6. Injertos: Rosa en perforación después de diez días (A), injerto verde en caras planas después de 45 días (B), injerto morado en perforación después de 45 días (C) e injerto variegado en perforación después de 70 días.

En un injerto, se le conoce como callo o empalme al tejido que resulta de la unión celular del tejido del patrón con el tejido de la planta injertada, esto implica varios procesos donde los tejidos vasculares de ambas plantas se reorganizan a nivel celular, para lo cual es importante la acción de auxinas y citocininas (Melnik *et al.*, 2015). La formación de callo en caras planas se presentó en dos injertos, los cuales se mantuvieron turgentes y con una altura promedio de 20 cm; para los injertos de perforación, el callo se desarrolló en 13

injertos, lo cual permitió que se mantuvieran turgentes y con una altura promedio de 13 cm; por lo que los injertos de perforación favorecieron la formación de callo en el injerto en un 33% más que en caras planas (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4. Relación del Callo con la turgencia y la altura de los injertos de plántulas de CP-Tepemor, a los 120 días de injertado.

Tipo Injerto	Color	Callo	Turgencia	Altura
Caras planas	V	A	D	0.6
	V	A	D	0.6
	V	A	D	0.7
	V	A	D	1.1
	V	A	D	1.2
	V	A	D	1.4
	V	A	D	1.6
	V	P	N	16.8
Perforación	V	P	N	23.2
	V	A	D	0.5
	V	A	D	0.7
	V	A	D	0.8
	V	A	D	0.8
	V	A	D	1.1
	V	A	D	1.25
	M	A	N	1.3
	V	A	D	2.2
	V	A	D	2.6
	V	P	N	4.6
	Var	P	N	8.6
	V	P	N	14
	V	P	N	14.1
	Var	P	N	14.3
	V	P	N	15.3
V	P	N	15.4	
V	P	N	17.3	
V	P	N	17.4	
V	P	N	18.7	
V	P	N	18.7	
V	P	N	19.5	
V	P	N	20.1	

Color= V: verde, M: morado, Var: variegado; B.T.I.: Brotación del tallo en el injerto, en días; Callo: A= ausente, P= presente; Turgencia= D: deshidratado, N: normal, Altura= cm

Los brotes vegetativos en los patrones no compitieron con la plántula injertada, ya que se eliminaron al presentarse, en el 20% del total de los patrones del experimento, se

presentó doble brotación en una sola areola, en caras planas en 4 y en perforación en 8 patrones (Figura 1.7).

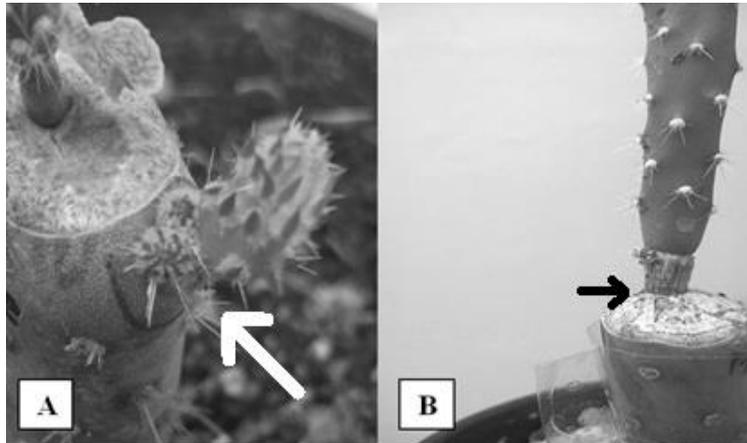


Figura 1.7. Brotación vegetativa en areolas del patrón de *O. robusta* var. CP-Tepemor (A) y formación de callo en el injerto (B).

El aborto de los injertos en caras planas se pudo originar por la actividad de las auxinas en la aparición de raíces, o por una técnica deficiente en la injertación (Figura 1.8).

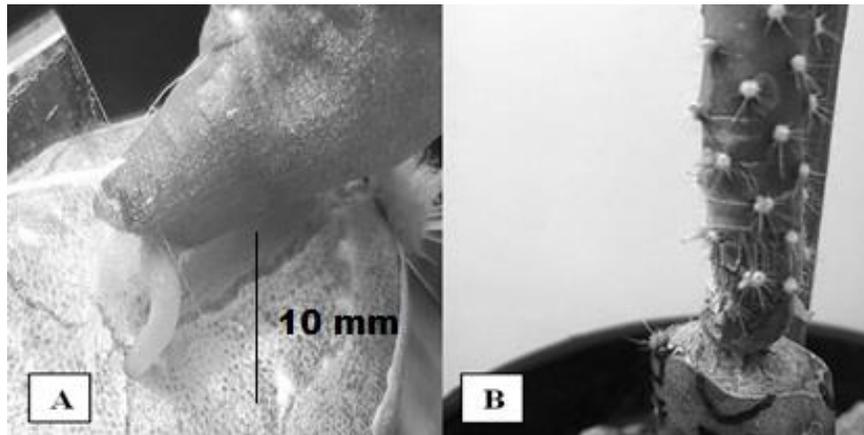


Figura 1.8. Aborto del injerto por aparición de raíces adventicias en hipocótilo (A) y raíces adventicias en cladodio (B).

Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) y Lema-Ruminska y Kuluz (2014) mencionan que las auxinas en conjunto con citocininas son imprescindibles para la activación de las areolas y la formación de callo en cultivo *In vitro* de *Opuntia*; Zambrano-Forero *et al.* (2015) reportaron la actividad de las auxinas en la generación de raíces *In vitro* en *Hylocereus undatus*, por lo que para este tipo de injertos, puede ser necesario el uso de citocininas para evitar la aparición de raíces en el injerto y se forme el callo en la unión de los tejidos.

Con relación a la turgencia aparente de la plántula (Figura 1.9), el 78% de los injertos de caras planas y el 37% de perforación presentaron deshidratación, lo cual estuvo relacionado con el tamaño del injerto y la apariencia del mismo; los injertos en perforación disminuyeron la deshidratación en 41% comparado con caras planas.

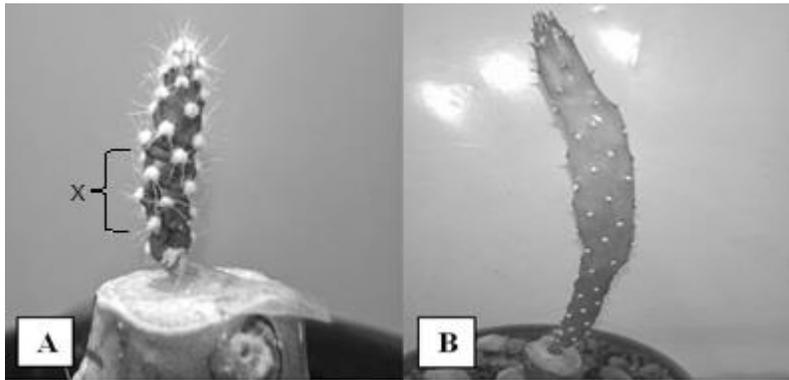


Figura 1.9. Corrugación del tallo (X) por pérdida de turgencia en injerto de caras planas (A) y turgencia aparente normal en injerto de perforación (B).

En los mutantes injertados en caras planas la turgencia se perdió en promedio a los 3 días, el hipocótilo fue el primer tejido que se deshidrató y al final los cotiledones se quedaron separados del injerto, la plántula murió en promedio en 5 días (Figura 1.10).

En el injerto de perforación se observó un periodo en promedio de turgencia de 15 días, deshidratándose también el hipocótilo, la plántula murió a los 18 días en promedio. En relación a las plántulas que murieron al injertarse, en caras planas murieron el 70% de las plántulas injertadas y el 27% en perforación, el injerto de perforación favoreció la supervivencia de las plántulas injertadas en un 43% más con respecto al de caras planas.

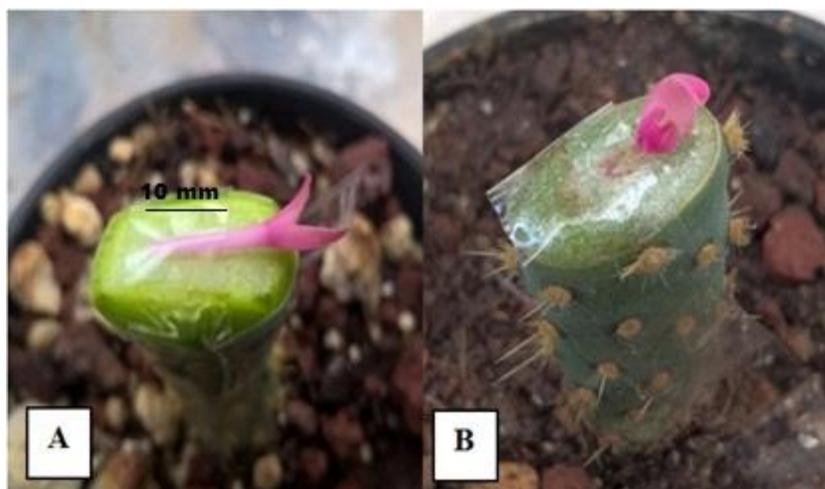


Figura 1.10. Plántula rosa injertada en caras planas. A los diez días de germinada (A) y a los cinco días de injertada (B).

Para los injertos con plántulas rosas no fue posible la aparición del tallo; el 100% de las plántulas no sobrevivieron después de injertadas (Cuadro 1.5). En los injertos de caras planas de las plántulas mutantes, la deshidratación del hipocótilo imposibilitó la formación de la unión o callo, al estar más expuesto que en el injerto de perforación resultando en un periodo de supervivencia menor; sin embargo, en los injertos de perforación también murieron las plántulas injertadas aunque sobrevivieron más tiempo que los de caras planas, lo que posiblemente se debió a que el hipocótilo al estar insertado en el patrón, pudo tener una hidratación mayor.

Cuadro 1.5. Pérdida de turgencia en injertos de mutantes rosas.

Tipo injerto	# mutante	Turgencia	Supervivencia
Caras planas	1	3	5
	2	4	5
	3	3	5
	4	3	4
	5	3	6
	6	4	5
	7	3	5
	8	3	5
Perforación	1	12	15
	2	16	17
	3	16	18
	4	18	20
	5	14	17
	6	20	23
	7	15	19
	8	14	16

La turgencia y la supervivencia se expresaron en días.

En otras investigaciones se ha logrado prolongar la supervivencia de mutantes sin clorofila; por ejemplo, para mutantes aclorofílicos de color rojo de *Gymnocalycium mihanovichii* injertados en *Trichocereus spachianus*, Moghadam *et al.* (2012) encontraron que con una dosis de 100 ppm de AIB en el agua de riego, en tres ocasiones (3,9 y 15 días después del injerto) se obtuvo la mejor respuesta en el porcentaje de prendimiento de los injertos y en su tamaño, número de areolas y areolas activadas; mientras que I-Jin *et al.* (2008) con en el mutante *Lobivia silvestrii* for. variegata, y encontraron que el uso de 150 mg l⁻¹ de TDZ aplicados en el riego incrementó el número de tubérculos con relación al testigo.

En el ensayo realizado de abril a septiembre del 2018 se injertaron plántulas de *O. robusta* en patrones de *O. robusta* var. CP-Tepemor, con el mismo diseño, unidad experimental y tiempo de registro de variables. Se usaron diez plántulas para injertos de caras planas y diez para perforación, las variables registradas fueron el prendimiento, largo, ancho y grosor de los injertos. El prendimiento en perforación fue del 70% y en caras planas el 20%; los injertos en caras planas no prendieron por la aparición de raíces adventicias en el hipocótilo, al quinto día de injertadas en promedio. La actividad de las auxinas en las plantas inicia desde la generación del eje apical-basal del embrión (Azcon-Bieto y Talón, 2013), por otro lado, Retes-Pruneda *et al.* (2007) observaron la actividad de las auxinas al enraizar con éxito plántulas obtenidas en cultivo de tejido de 9 cactáceas; en contraste, De Carvalho-Costa y Soares-de Melo (2012) aislaron bacterias endógenas de *O. ficus indica*(L.) Mill. y encontraron que de 68 bacterias aisladas, el 18% producen AIA. Esto puede explicar la aparición de raíces adventicias en las plántulas del ensayo, además de que los injertos se realizaron en una estación del año diferente al experimento con *O. robusta* var. CP-Tepemor, lo que puede hacer diferencia, como en el trabajo de Bayat *et al.* (2015), que injertaron cinco especies en cinco patrones en primavera y otoño, para encontrar que dos patrones respondieron mejor en otoño y una especie respondió en compatibilidad con un patrón en primavera y otoño.

De las plántulas injertadas en perforación, se tiene en promedio 7.54 cm de alto, 1.04 cm de ancho y 0.6 cm de grosor en injertos de abril-septiembre. A pesar de que no se injertaron los mismos tipos de plantas, el ensayo confirmó que la técnica de injerto de hipocótilo en perforación como una mejor opción que el injerto de hipocótilo en caras planas.

1.5. CONCLUSIONES

- El injerto de perforación fue mejor que el de caras planas porque los injertos de plántulas de diez días de edad tuvieron un mayor porcentaje de prendimiento (73%).
- Las plántulas de CP-Tepemor aclorofílicas, color rosa, injertadas en perforación, sobrevivieron en promedio 13 días más que las injertadas en caras planas.
- No se logró que las plántulas injertadas de CP-Tepemor sin clorofila, color rosa, sobrevivieran un tiempo mayor a 28 días.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Altare, M., S. Trione, J.C. Guevara, M. Cony. 2006.** Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. Journal of the Professional association for cactus development. 7: 91-100.
- Angulo-Bejarano, P.I., O. Paredes-López. 2011.** Development of a regeneration protocol through indirect in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Scientia Horticulturae. 128: 283-288.
- Arévalo-González, M. 2000.** Análisis de la relación patrón-injerto entre cactáceas. Tesis de Maestría en Ciencias en Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco Estado de México. 64 p.
- Azcón-Bieto, J., M. Talón. 2013.** Fundamentos de Fisiología Vegetal 2ª Edición. Mc Graw Hill-Interamericana.
- Bayat, N., R. Naderi, A.R. Maidani. 2015.** Does Grafting Time Affect Cactus Performance? Journal of Biology Environmental Science. 9: 143-149.
- Chang-Hui, C., N. Sang-Yong, L. Sang-Deok, P. Heung-Bae. 2008.** A new Yellow Grafted Cactus (*Chamacereus silvestrii*) Cultivar “Yellow Tree”. Korean Journal of Breed Science. 40: 521-524.
- Chougui, N., A. Tamendjari, W. Hamidi, S. Hallal, A. Barras, T. Richard, R. Larbat. 2013.** Oil composition and characterization of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. Food Chemistry 139: 796-803.
- De Carvalho-Costa, F. E., I. Soares-De Melo. 2012.** Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea,

Vigna unguiculata (L.) Walp. African Journal of Microbiology Research. 66: 1345-1353.

Estrada-Arellano, J. R., A. E. Estrada-Castillón, M. M. Salinas-Rodríguez, J. Sánchez-Salas, E. O. Rueda-Puente, C. Márquez-Hernández. 2018. Cactus diversity in the Sierra del Rosario, Durango, México. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 5: 133-141.

Estrada-Luna, A. A., C. López-Peralta, E. Cárdenas-Soriano. 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.

Fuegang, J., F. Stintzing. 2006. Nutritional and medicinal uses of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. Frontiers in Bioscience. 11: 2574-2589.

Galicia-Villanueva, S., P. E. Escamilla-García, H. Alvarado-Raya, L. V. Aquino – González, H. Serna-Álvarez, L. M. Hernández-Cruz. 2017. Plantación experimental de nopal para evaluación de sistemas de fertilización y extracción de mucílago. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8: 1087-1099.

Guerrero-Muñoz, P., H.A. Zabaleta-Mancera, A. F. Barrientos-Priego, C. Gallegos-Vázquez, C.A. Nuñez-Colín, E. Valadez-Moctezuma, J.A. Cuevas-Sánchez. 2006. Técnica para el estudio de la micro morfología interna de semillas duras en *Opuntia*. Revista Fitotecnia Mexicana. 29: 37-43.

Guzmán, U., S. Arias, P. Dávila. 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. 90 p.

- Huffman, M. 2003.** Cactus grafting methods. Journal of the Professional association for cactus development. 5: 106-114.
- Hunt, D. 2006.** The New Cactus Lexicon. D.H. Books. U.S.A. 527 p.
- I-Jin C., L. Chang-Hee, C. Jun-Hyeung. 2008.** Effects of CPPU, TDZ and BAP on tubercle proliferation of *Chamacereus silvestrii* f. variegata. Korean Journal of Horticultural Science. 26: 124-128.
- Kiesling, R. 2013.** Historia o prehistoria de la tuna o cactus *Opuntia ficus-indica*: Presente y futuro. Cactusnet Newsletter. 13: 13-18.
- Lema-Ruminska, J., D. Kuluz. 2014.** Micro propagation of cacti-a Review. Haseltonia. 19: 46-63.
- Man P., P., M. II J., B. Woo Y., M. Sun K., Y. Ran L., P. Hee P., B. Sik Y. 2012.** A new grafted cactus with bright yellow color, “Hwangseon”. Korean Journal Horticultural Science Technology. 30: 342-344.
- Melnyk, C. W., C. Schuster, O. Leyser, E. M. Meerowitz. 2015.** A Developmental Framework for Graft Formation and Vascular Reconnection in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology. 25: 1306-1318.
- Moghadam, A.R.L., Z.O. Ardebili, L. Rezaie. 2012.** Effect of índole butyric acid on micro grafting of cactus. African Journal of Biotechnology. 11: 6484-6493.
- Monroy-Vázquez, M.E., C.B. Peña-Valdivia, J.R. García-Nava, E. Solano-Camacho, H. Campos, E. García-Villanueva. 2017.** Imbibición, viabilidad y vigor de semillas de cuatro especies de *Opuntia* con grado distinto de domesticación. Agrociencia. 51: 27-42.

- Myeong-II, J., C. Bong-Nam, K. Mi-Seon, J. J. S. Song, K. Jae-Yeong, Y. J. Park. 2006.** A new dark red graft cactus (*Gymnocalycium mihanovichii*) Cultivar, “Suhong”. Korean Journal of Breed Science. 38: 127-128.
- Nazareno, M. 2013.** Cactus como fuente de sustancias promotoras de salud. Cactusnet Newsletter. 13: 95-105.
- Ochoa, M.J., L. M. González-Flores, J. M. Cruz-Rubio, L. Portillo, J. F. Gómez-Leyva. 2015.** Effect of substrate and giberellic acid (GA₃) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* spp. Journal of the Professional association for cactus development. 17: 50-60.
- Pacheco-Aguilar, M. A. 2017.** Caracterización molecular de variedades de nopal (*Opuntia* spp.) con micro satélites. Tesis de Maestría en Ciencias en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco Estado de México.
- Padilha-Menezes, T., J. Darlan-Ramos, A. Teodoro-Bruzi, A. Claudia-Costa, P. de Siqueira-Ramos. 2015.** Autopolinização e qualidade de fruto em pitaia vermelha (*Hylocereus undatus*). Magistra Cruz das Almas-B.A. 27: 387-394.
- Pinheiro-da Costa, S., A. A. Soares, B. Arnholdt-Schmitt. 2001.** Studies on the Induction of Embryogenic Globular Structures in *Opuntia ficus-indica*. Journal of the Professional association for cactus development. 13: 66-74.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. del S. Santos-Díaz, R. Ramírez-Moreno, N. Ochoa-Alejo. 2015.** Tissue culture of ornamental cacti. Scientia Agricola. 72: 540-561.
- Retes-Pruneda, J. L., M. de L. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes, E. Pérez-Molphe-Balch. 2007.** Propagación *In vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*,

Mammillaria, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México. 81:9-16.

Rivera, G. 2013. The importance of habitat knowledge in the understanding of taxonomy in Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*. 85: 196-205.

Rojas-Aréchiga, M., K.M. Aguilar, J. Golubov, M.C. Mandujano. 2011. Effect of gibberellic acid on germination of seeds of five species of cacti from the Chihuahuan desert, Northern México. *The southern naturalist*. 56: 395-435.

Rowley, G. 2009. *Gymnocalycium* in cultivation-A survey of cultivars. *Haseltonia*, 15: 80-101.

Sánchez-Urdaneta, A.B., E. Suárez-Calleja, J. Tusent-Pérez, C. Labarca-Sánchez, V. B. arroyo-Peña, C.B. Colmenares-de Ortega, C.B. Peña-Valdivia. 2016. Tratamientos pre germinativos de semillas y emergencia de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. *Revista de Facultad de Agronomía (LUZ)*. 33: 193-215.

Zambrano-Forero, C, J., J. A. Ríos-Osorio, D. M. Beltrán-Pedroza, N. Mesa-López. 2015. Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *In vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*. 1: 76-87.

Consulta electrónica

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B071.aspx>. Consulta en mayo del 2017.

Akcelrad-Lerner, L. 2018. Especies silvestres de nopales mexicanos. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Versión 1.5. <https://doi.org/10.15468/bqkcbx>

CAPÍTULO 2. USO DE AG₃ COMO COADYUVANTE PARA LA GERMINACIÓN IN VITRO DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.

RESUMEN

Como la mayoría de cactáceas, *Ferocactus wislizeni* (Engelmann) Britton & Rose y *Ferocactus pilosus* (Galeotti) Werdermann, poseen características deseables en una planta de ornato; debido al saqueo y cambio de uso de suelo, entre otros factores, se han reducido sus poblaciones silvestres. *Opuntia robusta* var. CP-Tepemor es una variedad que produce plántulas sin clorofila de color rosa, que mueren a los diez días de germinadas, pero pueden tener futuro como plantas de ornato si se prolonga su supervivencia. Es necesario realizar investigaciones en cactáceas enfocadas a atender problemas relacionados con la germinación de las semillas, ya que puede ser afectada por las adaptaciones que tienen para sobrevivir en sus hábitats, como la testa lignificada y la presencia de inhibidores en la misma, siendo necesario desarrollar técnicas que consideren el uso de reguladores de crecimiento y el cultivo de tejidos. Se realizó un experimento para observar el efecto del AG₃ en la germinación y crecimiento de las plántulas de *F. wislizeni*, *F. pilosus* y *O. robusta* var. CP-Tepemor; de 300 semillas de cada especie se escarificaron 200 semillas con H₂SO₄, de las semillas escarificadas se remojaron 100 semillas de cada especie en AG₃, y semillas sin tratamiento fueron los testigos; todas las semillas se sembraron en cultivo *In vitro*, en medio MS al 100%, se usaron frascos de 115 mL con 20 mL de medio, en cada frasco se colocaron 10 semillas y se tuvieron 10 frascos por tratamiento. Se registró la germinación diaria para calcular el porcentaje de germinación y el Índice de Velocidad Germinativa; de cada tratamiento se eligieron cuatro frascos para tomar cinco plántulas por frasco y registrar las variables altura, diámetro, número de areolas y raíces y se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias para determinar el mejor tratamiento. Se hicieron pruebas de viabilidad en 50 semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus*, con Cloruro de Tetrazolio (Tz) y con Índigo Carmín (IC) para observar la tinción en cada tratamiento y determinar cuál es mejor para evaluar la viabilidad. Al momento de la toma de datos las semillas de *Opuntia* CP-Tepemor no habían germinado. La germinación de *F. wislizeni* con H₂SO₄ no presentó diferencias significativas con el tratamiento de H₂SO₄+AG₃, en *F. pilosus* se observó una diferencia significativa a favor de H₂SO₄+AG₃; en las variables registradas se encontraron diferencias significativas con el uso de AG₃; la prueba de viabilidad con IC presentó mejores resultados para determinar la viabilidad.

Palabras clave: AG₃, Cloruro de Tetrazolio, Índigo Carmín.

SUMMARY

Like most cacti, *Ferocactus wislizeni* (Engelmann) Britton & Rose and *Ferocactus pilosus* (Galeotti) Werdermann have desirable characteristics in an ornamental plant; due to the looting and change of land use, among other factors; their wild populations have been reduced. *Opuntia robusta* var. CP-Tepemor is a variety that produces pink seedlings without chlorophyll, which die within ten days of germination, but may have a future as ornamental plants if their survival is prolonged. It is necessary to carry out research in cacti focused on addressing problems related to seed germination, since it can be affected by the adaptations they have to survive in their habitats, such as the lignified testa and the presence of inhibitors in it, being necessary to develop techniques that consider the use of growth regulators and tissue culture. An experiment was carried out to observe the effect of AG₃ on the germination and growth of the seedlings of *F. wislizeni*, *F. pilosus* and *O. robusta* var. CP-Tepemor; of 300 seeds of each species were scarified 200 seeds with H₂SO₄, from the scarified seeds were soaked 100 seeds of each species in AG₃, and seeds without treatment were the controls; all the seeds were planted *In vitro* culture, in MS 100% medium. Bottles of 115 mL were used with 20 mL of medium; 10 seeds were placed in each bottle and 10 bottles were taken per treatment. Daily germination was recorded to calculate germination percentage and Germination Velocity Index; of each treatment four bottles were chosen to take five seedlings per bottle and record the variables height, diameter, number of areolas and roots and an analysis of variance and comparison test of means was performed to determine the best treatment. Seed viability tests were done on 50 seeds of *F. wislizeni* and *F. pilosus*, with Tetrazolium Chloride (Tz) and with Indigo Carmine (CI) to observe the staining in each treatment and determine which is better to evaluate the viability. At the time of data collection the *Opuntia* CP-Tepemor seeds had not germinated. The germination of *F. wislizeni* with H₂SO₄ did not present significant differences with the treatment of H₂SO₄ + AG₃, in *F. pilosus* a significant difference was observed in favor of H₂SO₄ + AG₃; in the registered variables, significant differences were found with the use of AG₃; the viability test with IC showed better results to determine viability.

Key words: AG₃, Tetrazolium Chloride, Indigo Carmine.

2.1. INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento y conservación de cactáceas es compleja y hay especies en peligro de extinción debido a diferentes factores como el deterioro de su hábitat, el cambio de uso de suelo y el saqueo, entre otros, además de que algunas poblaciones silvestres no tienen un banco de semillas que produzca mayor cantidad de individuos para mantener las poblaciones en forma sustentable y apoyar el desarrollo de las comunidades rurales (Castillo-Campohermoso *et al.*, 2010). Además, las cactáceas no cuentan con planes de manejo y conservación efectivos y la información sobre su crecimiento y desarrollo es escasa (Lostaulot-Laclette *et al.*, 2014). El género *Ferocactus*, cuenta con 29 especies (Anderson, 2001), tiene importancia etnobotánica y ecológica; sus frutos son fuente de alimento para la fauna y el hombre (Solano-Picazo y Blancas, 2018), los tallos de algunas especies se usan para elaborar el dulce de acitrón (Meza-Rangel *et al.*, 2014), las flores además de aportar néctar y polen para los insectos, las consume el hombre frescas o en conserva (Martínez-Adriano *et al.*, 2015); así mismo, los *Ferocactus* se pueden utilizar como ornato. *Ferocactus pilosus* es una especie nativa que se distribuye en Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Tamaulipas que depende de nodrizaje en su hábitat, donde compite con otras especies (Rodríguez-Ruiz *et al.*, 2018), sus flores y frutos conocidos como “cabuches” son recolectados para su consumo (Solano-Picazo y Blancas, 2018) lo que reduce el banco de semillas; también es recolectada de su hábitat para su venta y está sujeta a protección de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010); un problema importante para su reproducción sexual es que las semillas tienen baja germinación por agentes inhibidores (Bowers, 2000). Un *Ferocactus* que se distribuye en Arizona, Nuevo México y Texas en los Estados Unidos de

Norteamérica y en Chihuahua, Sinaloa, Sonora en México es *Ferocactus wislizeni*, (Cortés *et al.*, 2014), con una subespecie y siete variedades reportadas (Fencel y Kalas, 2013) y que también tiene potencial para ser aprovechado como planta de ornato (Tarango-Arámbula, 2005), debido a la forma de sus espinas y al color y tamaño de sus flores; pero es una especie susceptible al ataque de Coleópteros que pueden causar su muerte (Ferro *et al.*, 2013) y que también tiene problemas de baja germinación porque sus semillas presentan letargo (Bowers, 2000).

Para el género *Opuntia* se tiene que las semillas poseen una estructura funicular lignificada, que es parte de la testa de la semilla que rodea el perispermo, embrión y cotiledones, por ello para realizar estudios de morfología, Guerrero-Muñoz *et al.* (2006) fijaron semillas de *Opuntia sp* a un portaobjetos, orientada paralelamente y con una lija de agua desgastó la cubierta de la semilla hasta alcanzar el eje embrionario.

Diversos factores influyen en la germinación las semillas de las especies y es variable su efecto, por ejemplo, para *Mammillaria mazatlensis*, la fluctuación de temperatura entre 30-38°C incrementó en un 10% la germinación con respecto al testigo (30°C constante) (Sánchez-Soto *et al.*, 2010); por otro lado Guillén-Trujillo *et al.* (2011), observaron en *Ferocactus townsonianus* que las semillas colectadas en 2013 y puestas a germinar, tuvieron el porcentaje de germinación más bajo (25.1%), con respecto a semillas del 2003 (46.7%), 2004 (56.2%), 2010 (62%) y 2012 (41.6%); esto sugiere que puede haber agentes que inhiben la germinación en semillas de ésta especie; aunque también influye el tamaño de la semilla, ya que Flores y Jurado (2011) observaron en *Astrophytum myriostigma*, diferencias significativas en el % de germinación de semillas pequeñas (92%) y semillas grandes (42%).

La escarificación de semillas de cactáceas puede eliminar los inhibidores y favorecer la germinación y crecimiento de las plántulas; Navarro *et al.* (2013) encontraron que la escarificación de semillas de *Echinocactus platyacanthus* por cinco minutos con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 100% influyó favorablemente en la germinación (94%) en comparación con el testigo (60%); semillas de *Mammillaria pectinifera* escarificadas con H_2SO_4 por 1 y 5 min y puestas a germinar, tuvieron diferencias significativas en la altura de plántulas de un mes, comparadas con el testigo (Navarro y González, 2007).

El uso de ácido giberélico (AG_3) en tratamientos pre germinativos en semillas de cactáceas se estudió en casos como el experimento de Loustalot-Laclette *et al.* (2014), donde se observó que la inmersión de semillas de *Ferocactus hixtrix* en AG_3 al 5% durante una hora, favoreció el vigor y volumen de las plántulas en los primeros 120 días de vida; sin embargo algunos experimentos con AG_3 en germinación de cactáceas no han presentado resultados favorables; Navarro y Deménegui (2007) usaron un tratamiento de AG_3 en el sustrato (0.243 g de “Activol” en 250 mL de H_2O destilada) para germinación de *Mammillaria pectinifera* y obtuvieron un 15% de germinación menos con respecto al testigo. Amador-Alfárez (2013), colocaron semillas de *Ferocactus hixtrix* y *F. latispinus* en cajas de Petri con agar y AG_3 en diferentes concentraciones (125, 250, 500 ppm) y observaron el % de germinación más bajo (40%) en los tratamientos de 125 y 250 ppm de AG_3 , comparados con el control (75%). Esto da pauta a investigar el uso de AG_3 para tratamiento a las semillas de cactáceas, ya que los resultados pueden variar entre las especies y en la concentración, tiempo y forma en la que se usa el AG_3 .

Las pruebas de viabilidad en semillas, son complementarias a las pruebas de germinación, el objetivo es conocer la calidad y estado de las semillas, para determinar su

capacidad germinativa, en un tiempo menor al que se tomarían las observaciones de una prueba de germinación (Benito-Matías *et al.*, 2004); dentro de las pruebas de viabilidad se puede usar la técnica de tinción con sales de Tetrazolio, que activan las rutas metabólicas de las semillas al estar en contacto con éstas; o la técnica de radiografía con rayos X, que implica el uso de equipo costoso (Pérez-García y Pita-Villamil, 2001).

La prueba de viabilidad con Índigo Carmín (IC) tiñe las semillas no viables de color azul, al aumentar la permeabilidad de la membrana celular por las células muertas (Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique, 2015), esta prueba generalmente se usa en especies forestales; Benito-Matías *et al.* (2004) trabajaron en pruebas de viabilidad con TZ e IC en *Pinus pinea* y encontraron una tinción más rápida de los embriones de las semillas, comparados con Tz, Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique (2015) trabajaron con pruebas de viabilidad con Tz e IC, en semillas de orquídeas y encontraron que la tinción con IC no resultó favorable ya que el exceso de tinción y el tipo de semilla dificultaron la evaluación, Barone *et al.* (2016) trabajaron con semillas forestales del Atlántico en pruebas de viabilidad con Tz, IC y Cloruro férrico y encontraron que la prueba de IC resultó favorable para *Myrocarpus frondosus*, que es una especie de comportamiento recalcitrante. No hay reportes en cactáceas de la prueba de tinción con IC, sin embargo, es necesario realizar este tipo de pruebas para poder tener información sobre su posible utilidad, Manzo-Rodríguez (2015) realizó pruebas de viabilidad con Tz en *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *E. grusonii* y observó que de acuerdo a la concentración del Tz (0.1, 0.5 y 1%), hubo una tinción menor de los embriones con las concentraciones de 0.5 y 1.0% debido a una sobresaturación, esto puede significar un problema al realizar pruebas de viabilidad en cactáceas con Tz, ya que la prueba se puede complicar al no tener una tinción homogénea; por lo que las pruebas con

IC pueden resultar viables en semillas de cactáceas, al teñir específicamente el tejido muerto.

2.2. OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la escarificación con H_2SO_4 y AG_3 , en la germinación de semillas de *F. wislizeni*, *F. pilosus* y *O. robusta* var. CP-Tepemor, *In vitro* y cuantificar el crecimiento de las plántulas.
- Comparar dos técnicas para determinar la viabilidad en semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus*.
- Evaluar el endurecimiento de plántulas de *F. wislizeni*, *F. pilosus* y *O. robusta* var. CP-Tepemor, obtenidas *In vitro*.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Germinación.

El experimento se realizó en Laboratorio de Cultivo de Tejidos, en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, ubicado en Texcoco, Estado de México. Se trabajó con semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus* cosechadas en el 2016 y *O. robusta* var. CP-Tepemor cosechadas en 2017; se tomaron 300 semillas, de las cuales se escarificaron 200 semillas de cada especie, con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 100% en agitación constante por cinco minutos, seguidos de la neutralización del ácido con Na_2CO_3 y tres enjuagues con agua destilada; las 100 semillas sin escarificación de cada especie sirvieron como testigo en el experimento. De las semillas escarificadas de cada especie se tomaron al azar 100 semillas y se pusieron en remojo (escarificación) en una solución de agua destilada con 500 ppm de AG_3 durante 24 h. Todos los grupos de semillas se sembraron en condiciones *In vitro*, en un frasco de vidrio de 115 mL, con 20 mL de medio de cultivo MS al 100%, estériles, se colocaron diez semillas por frasco, para incubarse a 25°C en promedio, con un régimen de luz de 16 h por 8 h de oscuridad. Se registró diariamente la germinación a partir de la primera semilla que germinó, durante 30 días.

Se utilizó un diseño en bloques completamente al azar generalizados, los bloques fueron las especies y los tratamientos dentro de cada bloque fueron la escarificación de semillas con H_2SO_4 , escarificación de semillas con $H_2SO_4+AG_3$ y el testigo. El modelo estadístico usado fue $Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + T\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, donde μ es la media general, T_i es el efecto del *i*-ésimo tratamiento, β_j es el efecto del *j*-ésimo bloque, $T\beta_{ij}$ es el efecto del *i*-ésimo tratamiento en el *j*-ésimo bloque y ε_{ijk} es el error experimenta en la unidad *j* del tratamiento

i. La unidad experimental fue el frasco con medio MS, con 10 semillas y cada tratamiento tuvo 10 repeticiones. Se realizó la aleatorización de las semillas con el paquete Agricolae del Programa R para asignarles la unidad experimental y el bloque correspondiente.

2.3.2. Registro de variables.

a) Germinación.

Se registraron diariamente las semillas germinadas por unidad experimental, a partir de la primer semilla germinada hasta transcurridos treinta días después para calcular el % de germinación y a su vez el índice de velocidad germinativa y determinar su relación con el vigor (Maguire, 1962), con la fórmula $IVG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right)$; n_i = número de semillas germinadas en el i-ésimo día y t_i = tiempo en días, para la germinación en el i-ésimo día; con el número acumulado de semillas germinadas por día se realizó la curva de la cinética de germinación para cada tratamiento.

b) Crecimiento.

Se eligieron al azar cuatro unidades experimentales por tratamiento y se tomaron cinco plántulas de cada unidad para cuantificar las variables de altura, diámetro, número de areolas y raíces; 15 días después del último registro de germinación; con los datos obtenidos se realizó un ANAVA con el paquete estadístico SAS y una prueba de comparación de medias para determinar el mejor tratamiento para cada variable.

Se registró el % de plántulas con brotación apical, con los datos obtenidos se realizó un ANAVA con el paquete estadístico SAS y una prueba de comparación de medias para determinar el mejor tratamiento.

c) Pruebas de viabilidad.

Se realizaron dos pruebas de viabilidad con semillas de *F. pilosus* y *F. wislizeni*, provenientes del mismo lote del experimento de Cultivo de tejidos, se usó un diseño estadístico completamente al azar, los tratamientos fueron el remojo de los embriones en cloruro de tetrazolio al 1% durante 12 h, y el método de remojo en índigo carmín al 0.15% durante 3 h; la unidad experimental constó de 25 semillas por cada especie, con dos repeticiones; previo a la prueba de viabilidad, las semillas se pusieron a remojo en agua destilada durante 60 h para facilitar su corte, pasado el tiempo de remojo y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se cortaron longitudinalmente las semillas, se colocaron en una caja de Petri para aplicarles el tratamiento correspondiente y se observaron las semillas en el transcurso del tiempo de cada tratamiento; transcurrido el periodo de tinción en ambas pruebas, se obtuvo el % de semillas viables y se comparó con el % de germinación que se obtuvo en el experimento de Cultivo de tejidos.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Germinación.

Las primeras semillas germinadas se registraron a los diez días de sembradas, se consideró el momento de la germinación cuando la radícula emergió de la testa de la semilla, de ahí se registró la germinación hasta 30 días después, el periodo total desde que se sembraron las semillas hasta el último registro, constó de 40 días. (Figura 2.1).

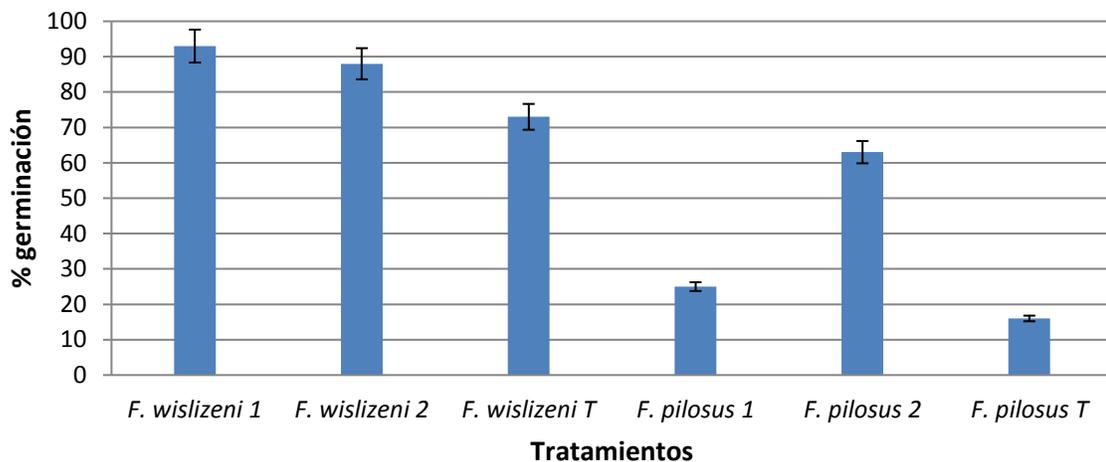


Figura 2.1. Porcentaje de germinación de los tratamientos.

Referencia: 1= H₂SO₄, 2= H₂SO₄+AG₃, T= Testigo. Las líneas en las barras indican una probabilidad de error del 5%.

Para el caso de *F. wislizeni*, con un valor de $p= 0.05$ no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2, el testigo tuvo una diferencia de 19% con el tratamiento 1 y de 14% con el tratamiento 2, por lo que la germinación se favoreció con la escarificación de las semillas con H₂SO₄ y H₂SO₄+AG₃; en el tratamiento 1 de *F. wislizeni* se observó una diferencia de 30% comparado con *F. pilosus* con H₂SO₄+AG₃ y 68% más

que en *F. pilosus* con H₂SO₄; el tratamiento 2 en *F. pilosus* tuvo una diferencia de 38% con respecto al tratamiento 1 y del 47% con respecto al testigo; este resultado es similar al que obtuvieron Flores y Manzanero (2003), quienes encontraron en *Mammillaria kreahebuehlii* que en condiciones de oscuridad, al usar H₂SO₄ a 90% por 5 min.+AG₃ 10 ppm, aumentó la germinación en un 43% con respecto al testigo; por lo que el efecto de H₂SO₄+AG₃ es favorable también para romper el fotoblastismo positivo en la germinación de cactáceas. El menor porcentaje de germinación se observó en el testigo de *F. pilosus* con 16%.

Rodríguez-Ruiz *et al.* (2018) trabajaron con H₂SO₄ al 97.3% como escarificante (inmersión en 5,10 y 15 min) y AG₃ (inmersión por 30 min en concentraciones de 125, 250 y 500 ppm) como promotor de la germinación, en semillas de *F pilosus* de 2015 y 2016; para las semillas del 2015, observaron que las escarificadas con H₂SO₄ tuvieron el mayor porcentaje (82%) de la germinación estándar, pero con semillas del 2016 tuvieron un % cercano al 20%; para las semillas con AG₃ en el 2016 se obtuvo el 48% de germinación y entre las semillas del 2015 y 2016 no hubo diferencias estadísticas significativas; los autores concluyeron que de acuerdo a sus resultados, el AG₃ tiene un efecto en *F. pilosus* a través de la hidrólisis de almidón en el endospermo y la división celular de tejido meristemático, además de que incrementa la respuesta germinativa en semillas con latencia.

En la germinación acumulada (Figura 2.2) se observó que en ambas especies, con el tratamiento de H₂SO₄+AG₃, se tuvo la germinación más alta de las semillas en los primeros 10 días, para *F. wislizeni* se obtuvo en el día seis en ambos tratamientos: con 26 semillas para H₂SO₄ + AG₃; y 20 para H₂SO₄, en el día 21 se tuvo la germinación más baja para el tratamiento 1, seguido de la germinación de 14 semillas entre el día 24 y el 30; para *F.*

pilosus, el número mayor de semillas germinadas se obtuvo en el día tres con 16 semillas para el tratamiento de H₂SO₄+AG₃; para el tratamiento con H₂SO₄ se tuvieron 6 semillas como máximo pero en el día 12.; el testigo de *F. wislizeni* a los 15 días tuvo la germinación más alta y el testigo de *F. pilosus* a los 27 días; esto puede responder a condiciones como el tamaño de la semilla (Flores y Jurado, 2011), aunque también puede responder a las condiciones de humedad que se tuvieron en el cultivo *In vitro*.

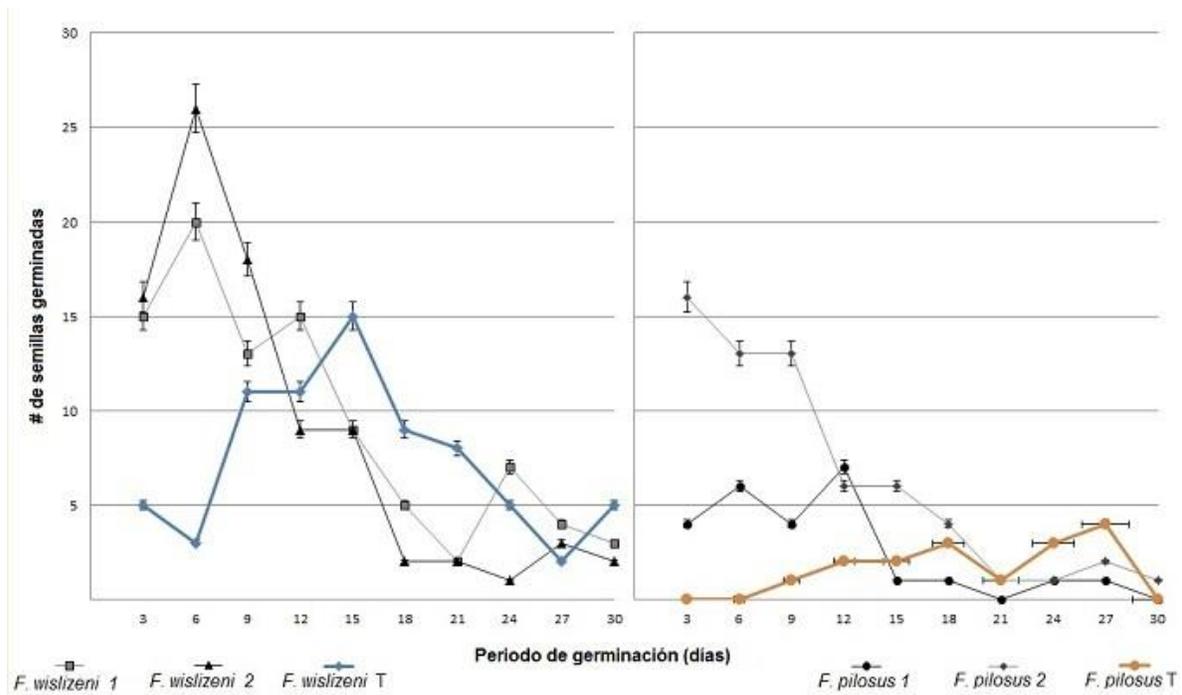


Figura 2.2. Germinación de semillas por especie y tratamiento.

Referencia: 1= H₂SO₄, 2= H₂SO₄+AG₃, T= Testigo. Las líneas en los puntos indican una probabilidad de error del 5% para cada observación.

Para *F. pilosus*, el tratamiento 2 tuvo una germinación acumulada del 38% más que el tratamiento 1 (Figura 2.3), se observa para estos tratamientos y de acuerdo al valor de R², que existe una correlación más estrecha en las semillas que germinaron con el tratamiento de AG₃ en comparación con las que no, y dado que existe una diferencia significativa en el

% acumulado, el tratamiento con AG₃ tiene efectos significativos en la germinación de *F. pilosus*; para el caso de *F. wislizeni* se tiene una germinación acumulada que en la línea de tendencia muestra diferencias significativas en el valor de R² a favor del tratamiento 1, por lo que en la germinación de *F. wislizeni*, el AG₃ no resulta mejor que la escarificación; aunque por otro lado, el efecto del AG₃ se puede manifestar en algunos casos en el crecimiento de la plántula y no en la germinación (Loustalot-Laclette *et al.*, 2014), ya que hasta el día 24 la dinámica de germinación para los tratamientos con AG₃ fue mayor que sin ácido giberélico.

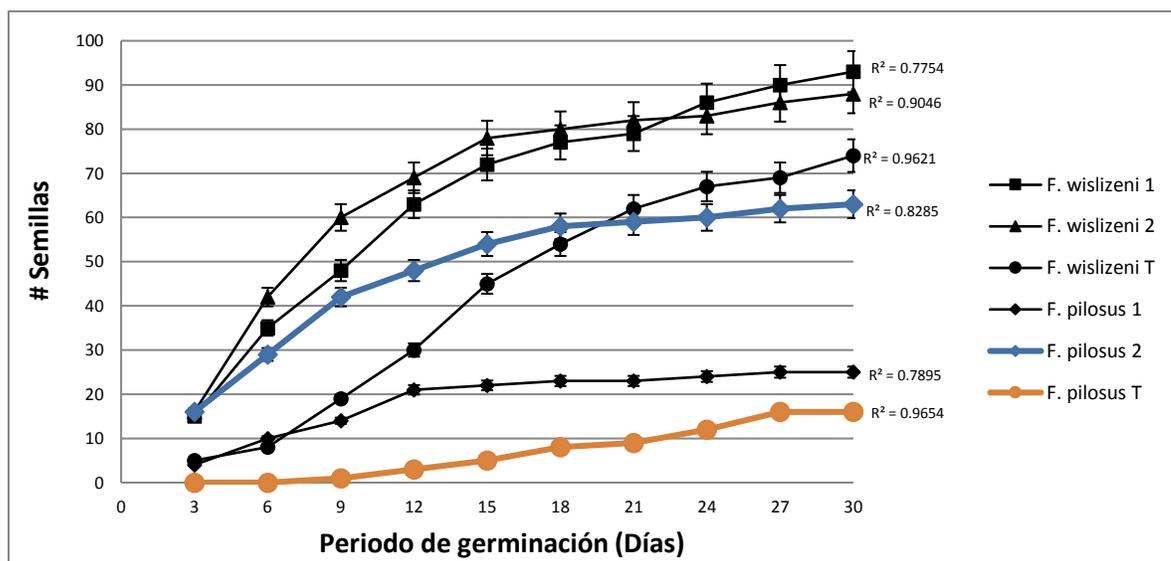


Figura 2.3. Germinación acumulada para los tratamientos.

Referencia: 1=H₂SO₄, 2=H₂SO₄+AG₃.

Rodríguez-Ruiz *et al.* (2018) mencionan la relación que tiene la escarificación con la germinación, ya que en su hábitat, los frutos de cactáceas son consumidos por la fauna local y pasan por su tracto digestivo, lo que facilita la germinación de las semillas al reblandecer la testa de la semilla; el uso de H₂SO₄ simula la función de los jugos gástricos de los

consumidores; pero también menciona la importancia del AG₃ en la semilla, pues puede reemplazar el efecto de la luz y temperatura, además de que mejora la hidrólisis del almidón, elemento presente en las reservas de las semillas de las cactáceas, por lo que los tratamientos con éste regulador en general pueden tener un efecto positivo al ser usados en tratamientos pre germinativos en semillas, aunque su efecto puede variar debido a la edad de la semilla y la especie.

2.4.2. Índice de Velocidad Germinativa.

Con el cálculo del I.V.G. se observó que las semillas más vigorosas se manifestaron en *F. wislizeni* y H₂SO₄+AG₃, aunque no fue ese tratamiento el de mayor % de germinación, *F. wislizeni* con H₂SO₄ tuvo un mayor índice con respecto al testigo pero menor con respecto al tratamiento con AG₃, lo que se puede relacionar con la mayor germinación en los primeros 10 días del tratamiento con AG₃; en *F. pilosus* el mayor IVG se presentó en el tratamiento de H₂SO₄+AG₃, que coincidió con el mayor % de germinación de la especie, el menor I.V.G. se observó en el testigo de *F. pilosus*; los tratamientos con H₂SO₄ y H₂SO₄+AG₃ resultaron favorables para ambas especies (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Germinación e Índice de Velocidad Germinativa por tratamiento.

Especie	H ₂ SO ₄		H ₂ SO ₄ +AG ₃		Testigo	
	% g.	I.V.G.	% g.	I.V.G.	% g.	I.V.G.
<i>F. wislizeni</i>	93	14.94	88	15.79	74	6
<i>F. pilosus</i>	25	1.45	63	10.17	16	0.16

% g. (Porcentaje de germinación promedio); I.V.G. (Índice de velocidad germinativa). El IVG se ajustó multiplicándolo por el valor centesimal del % de germinación.

En la Figura 2.4 se observan dos plántulas encerradas en un círculo, de 5 días de germinación, las plántulas de *F. wislizeni* tuvieron un tamaño mayor en comparación con *F.*

pilosus, lo cual tiene relación con los resultados obtenidos del I.V.G. y con la morfología de cada especie.

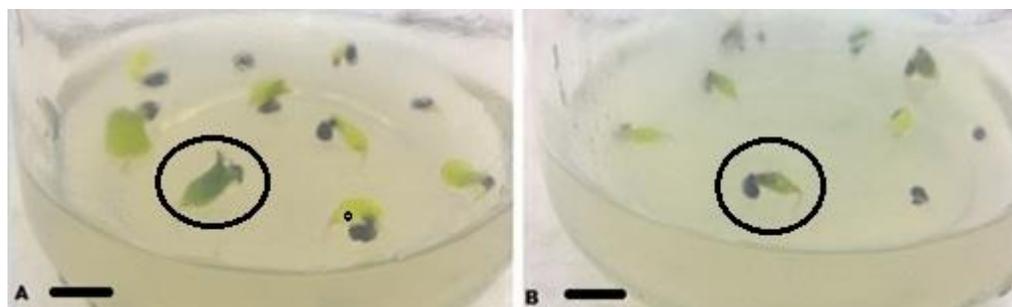


Figura 2.4. Semillas germinadas con remojo en AG₃: A= *F. wislizeni*, B= *F. pilosus*. Tamaño de la referencia= 10 mm

2.4.3. Toma de datos de variables cuantitativas.

Debido a que no había suficientes plántulas germinadas en el tratamiento de *F. pilosus* con H₂SO₄, y tampoco en el testigo de la misma especie, no se tomaron datos de diámetro, altura, areolas y raíces; en los tratamientos de *O. robusta* var. CP-Tepemor y el testigo, no hubo germinación en el momento del muestreo, por lo que no se realizó la toma de datos en esas unidades experimentales (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Comparación de variables por tratamiento.

Especie	Tratamiento	Diámetro	Altura	# areolas	# raíces
<i>F. wislizeni</i>	H ₂ SO ₄	.35 a	.60 b	6 b	5 a
	H ₂ SO ₄ + AG ₃	.43 a	.90 a	9 a	5 a
	Testigo	.33 a	.51 b	5 b	5 a
<i>F. pilosus</i>	H ₂ SO ₄ + AG ₃	.20 b	.55 b	9 a	2 b

Las medidas de diámetro y altura se expresaron en mm. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas (Test Duncan). Valores en Anava de P<0.05.

Las plántulas de *F. wislizeni* con AG₃ en promedio tuvieron un diámetro 18% mayor comparado con el tratamiento con H₂SO₄, 23% con el testigo y 53% con *F. pilosus* con AG₃; en la variable altura, entre *F. wislizeni* con AG₃ y con H₂SO₄ fue del 33% a favor de AG₃, 39% con *F. pilosus* con AG₃ y 43% con el testigo; el número de areolas aumentó para *F. wislizeni* en un 34% con AG₃ comparado con H₂SO₄ y 44% comparado con el testigo, *F. wislizeni* con AG₃ y *F. pilosus* con AG₃ no tuvieron diferencias; en la generación de raíz, *F. wislizeni* no tuvo diferencias entre sus tratamientos y el testigo, *F. pilosus* con AG₃ tuvo el menor número de raíces.

En el trabajo de Navarro y González (2007) con *F. robustus* se obtuvieron valores promedio mayores de diámetro y altura al exponer las semillas a 4°C por una semana y escarificación con H₂SO₄ sin ser éste tratamiento el que mayor germinación obtuvo; para este experimento las semillas escarificadas con H₂SO₄ y remojadas en AG₃ no fueron las de mayor % de germinación pero si presentaron un mayor IVG, además de un valor promedio mayor de diámetro, altura, areolas y raíces (Figura 2.5).

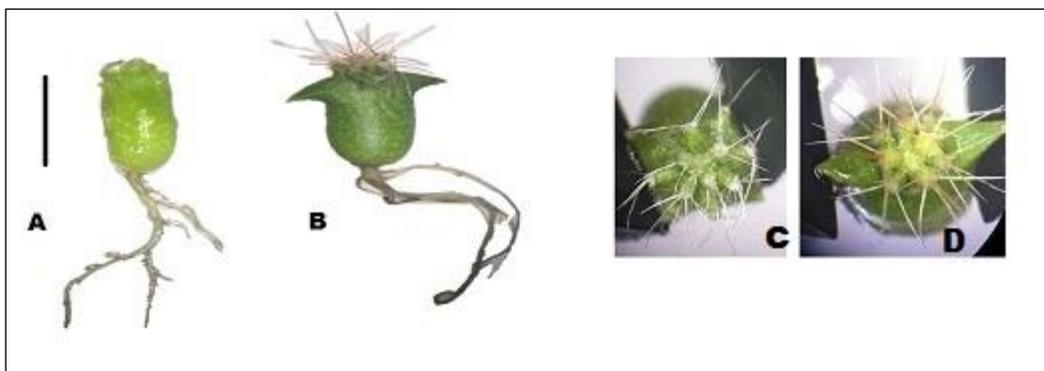


Figura 2.5. Detalles de plántulas. A= *F. pilosus*, B= *F. wislizeni*, C y D= Detalles de las areolas en *F. pilosus* y *F. wislizeni*, respectivamente. Tamaño de la referencia= 10 mm

Ghaffari *et al.* (2013) y Khalafalla *et al.* (2007), trabajaron en cultivo de tejidos con *Opuntia ficus-indica*, pero los explantes fueron obtenidos de semillas germinadas previamente en invernadero, por lo que posiblemente en cultivo de tejidos, la semillas de *Opuntia*, requieran un tiempo de germinación mayor o se deba germinar las semillas en invernadero y después llevarlas a cultivo de tejidos.

2.4.4. Brotación apical.

Las observaciones de la brotación apical de en las plántulas de cada tratamiento se tomaron 15 días después del último registro de las semillas germinadas, para *O. robusta* var. CP-Tepemor, no se realizaron las observaciones debido a que en el momento de la toma de datos no se contaba con plántulas. La referencia para contar brotación apical en las plántulas fue la presencia de areolas. (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Brotación apical por tratamiento.

Tratamiento	Plántulas/Trat.	Prom.B.A. (%)
<i>F. wislizeni</i> H ₂ SO ₄ +AG ₃	88	64 a
<i>F. wislizeni</i> H ₂ SO ₄	93	60 a
<i>F. pilosus</i> H ₂ SO ₄ +AG ₃	74	42 a
<i>F. wislizeni</i> T	63	46 a
<i>F. pilosus</i> H ₂ SO ₄	25	16 b
<i>F. pilosus</i> T	16	5 b

Prom.B.A.=Promedio Brotación apical, en el ANAVA se transformaron los datos de B.A. con la variable Arcoseno. Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas (Test Tukey). Valor en Anava de P<0.05.

Los datos de la brotación apical se ajustaron antes de promediarlos, multiplicando los valores observados por el % de germinación en unidades centesimales, ya que no se registraron con el mismo número de plántulas.

En la brotación apical, de acuerdo al ANAVA, en *F. wislizeni* no hay diferencias significativas en el tratamiento con AG₃, en comparación con el tratamiento con H₂SO₄ y el testigo; con *F. pilosus*, se observó una diferencia a favor del uso de AG₃ en comparación con el tratamiento con H₂SO₄ y el testigo. Entre *F. pilosus* y *F. wislizeni* con el tratamiento de AG₃, no existen diferencias significativas; el uso de AG₃ en ambos *Ferocactus* favoreció la brotación apical en las plántulas sometidas a este tratamiento en las plántulas en cultivo *In vitro*.

2.4.5. Pruebas de viabilidad.

Las pruebas de viabilidad se realizaron en las semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus* debido a que fueron las que germinaron en el cultivo de tejidos.

Cuadro 2.4. Tinción en pruebas de viabilidad y germinación.

Especie	Tratamiento	No de semillas con reacción		% R.	% G.
		M1	M2		
<i>F. wislizeni</i>	Cloruro de tetrazolio	22	21	86	93
	Índigo carmín	22	24	92	
<i>F. pilosus</i>	Cloruro de tetrazolio	17	13	60	63
	Índigo carmín	19	17	72	

%R= Promedio del % de reacción ante la tinción. % G= % de germinación, del mejor tratamiento del experimento. M1= Muestra 1, M2= Muestra 2.

Para *F. wislizeni*, la prueba con Tz tuvo una respuesta del 7% por debajo del promedio de la germinación, el caso de IC, su valor estuvo 1% por debajo del % G. En *F. pilosus*, se observó con Tz una respuesta del 3% por debajo del promedio, para IC, se observó un % de respuesta de 9% por arriba del % de germinación, esto puede sugerir que las semillas de esta especie, requieren de un periodo mayor a los 40 días en el que se muestrearon las semillas, ya que la viabilidad fue mayor que su % de germinación, este tipo de retraso en la germinación también puede responder a la respuesta que pueden tener las semillas de cactáceas a condiciones ambientales como la luz, humedad, temperatura o al letargo (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yañez, 2000).

La prueba con Cloruro de Tetrazolio (Tz) en cuanto a tinción respondió de forma gradual hasta llegar a una tinción total de las semillas después de seis horas, lo que aportó pruebas suficientes para determinar la viabilidad en éstas; sin embargo, hubo semillas que se tiñeron con el cloruro y al observarlas a detalle se apreció que tenían deformaciones que pudieran afectar su germinación (Figura 2.6).



Figura 2.6. Tinción progresiva de *F. pilosus* con Tz y corte de la semilla.

(A= 30 min, B=60 min...F=180 min). Semilla sin tinción (1), Semilla teñida con defectos (2), Tamaño de la referencia=1mm

La prueba con IC facilitó diferenciar los tejidos vivos (sin tinción) de los muertos (teñidos), para los tejidos muertos la tinción se observó de forma homogénea en todas las

estructuras de la semilla, la primer semilla con tinción se presentó a los 30 min después de que se colocaron las semillas en la solución.

En la Figura 2.7 se observa cómo el IC tiñó de un color azul intenso y de forma homogénea las semillas con tejido muerto o con deformaciones (B), las semillas viables permanecieron con su coloración (blanca) a pesar del corte que se realizó para su observación, no se presentó oxidación en los tejidos del corte, lo que permitió determinar la viabilidad con mayor facilidad en comparación con Tz, además de que se requirió menos tiempo para las observaciones.

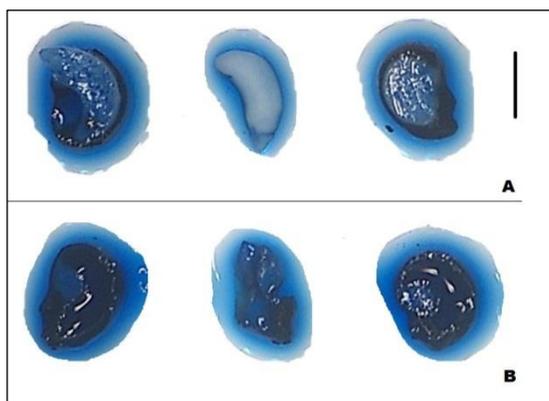


Figura 2.7. Tinción de semillas de *F. wislizeni* con IC.

A= Semillas viables. B=Semillas no viables. Tamaño de la referencia (1 mm).

La imbibición de las semillas de cactáceas por periodos prolongados no afecta la viabilidad de algunas especies, por ejemplo, Monroy-Vázquez *et al.* (2017) trabajaron con semillas de cinco variedades de *Opuntia sp.*, con periodos de imbibición de hasta 68 h para después realizar pruebas de viabilidad con Cloruro de tetrazolio (Tz) y observaron porcentajes de viabilidad de hasta el 97%. La imbibición de las semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus* durante 60 h facilitó el corte de las mismas para las dos pruebas de viabilidad.

Se tienen pocos reportes del uso del IC para viabilidad de semillas; Benito-Matías *et al.* (2004) usaron la técnica de tinción con IC y Tz en *Pinus*, al comparar el valor de R^2 del % de germinación contra cada test, observaron que se obtuvo un valor de $R^2=0.3883$, mientras que en I.C. su $R^2=0.5352$, por lo que fue mejor indicador en viabilidad el IC, Barone *et al.* (2016) trabajaron con semillas de *Cedrella fissilis* y *Myrocarpus frondosus* y observaron que de las tres pruebas que realizaron (Tz, IC y $FeCl_3$), en el caso de *C. fissilis* no hubo diferencias significativas en el % de viabilidad (71.6% promedio), para *M. frondosus* se presentó una mayor dificultad en el registro de la viabilidad con Tz ya que no se tiñeron de forma homogénea, lo que generó un registro de viabilidad del 8%, contra 20% de IC y 25% de $FeCl_3$.

Las pruebas con Tz pueden variar por factores relacionados con la humedad de la semilla, Vadillo *et al.* (2004) trabajaron con *Puya raymondii*, cuyos lotes de semillas almacenados a $11^{\circ}C$ y a temperatura ambiente, presentaban una viabilidad variable sin que la condición de almacenamiento fuera un factor que hiciera diferencia, al evaluar el contenido de humedad encontraron diferencias significativas a favor de las semillas almacenadas a $11^{\circ}C$, que tenían menos humedad, esto puede significar que si se hubiera reducido el contenido de humedad de las semillas almacenadas a temperatura ambiente, el resultado de la prueba con Tz pudo ser diferente. Salazar-Mercado y Gélvez-Manrique (2015), realizaron pruebas de viabilidad con Tz e IC en semillas de diferentes orquídeas y concluyeron que por el tamaño de las semillas y debido a que se pueden encontrar lo que le nombraron falsos positivos con IC (semillas no viables identificadas como viables por exceso de colorante), las pruebas con Tz son mejores; sin embargo, su explicación del falso

positivo se contradice, ya que mencionan que el exceso de colorante puede dar por viable una semilla, cuando el principio de la prueba es la tinción del tejido muerto no la del tejido vivo, además de que los % de correlación para ambas pruebas fueron similares.

En cactáceas no se tiene reportado el uso de IC para determinar la viabilidad; en este trabajo se apreció que las semillas expuestas a IC que no eran viables, se tiñeron en su totalidad, lo que facilitó su diferenciación, además de que el tiempo de tinción fue más rápido que con Tz. Las semillas de *F. wislizeni* y *F. pilosus*, tienen debajo de la testa una membrana de tegumento de color naranja que rodea la semilla, lo que dificultó en algunas semillas la observación de la tinción con Tz, pues la tinción y la membrana son de colores parecidos. En cuanto al % de viabilidad, Manzo-Rodríguez (2015) reportó en *F. pilosus* un % de viabilidad del 70% con 0.1% de Tz y un % de germinación del 98% con tierra de monte y tezontle y del 70% con MS al 100%, la diferencia entre el % de viabilidad y el de germinación fue del 28% para tierra y tezontle y no hubo diferencia con el % de viabilidad y la germinación en MS, en este trabajo se tuvo un % de viabilidad del 60% con Tz y del 72% con IC, con un % de germinación del 63% en MS al 100%, el % de viabilidad mayor que el de germinación puede explicarse con los resultados de Manzo-Rodríguez, ya que la germinación que obtuvo mayor % en su trabajo no fue en el medio MS; el valor de la prueba de viabilidad en *F. pilosus* con IC para este trabajo al ser mayor que el valor del % de germinación, pudiera significar un error en los resultados de la tinción, pero de acuerdo al trabajo de Manzo-Rodríguez, el % de germinación de *F. pilosus* puede ser mayor que el valor de la prueba de viabilidad.

2.5. CONCLUSIONES

- La escarificación de semillas con H_2SO_4 en *F. wislizeni* no presenta diferencias significativas en el % de germinación, con la adición de un tratamiento pre germinativo con AG_3 , pero si presenta diferencias significativas en el crecimiento y características morfológicas de las plántulas, en cultivo *In vitro*.
- El tratamiento pre germinativo de AG_3 en *F. pilosus* presenta diferencias significativas en % de germinación, crecimiento y características morfológicas de las plántulas, en comparación con sólo la escarificación con H_2SO_4 , en cultivo *In vitro*.
- El tratamiento pre germinativo de AG_3 en semillas de *O. robusta* var. CP-Tepemor, adicional a la escarificación con H_2SO_4 , no presenta efecto en la germinación de las semillas en el modo en que se aplicó el tratamiento, en cultivo *In vitro*.
- La tinción con IC para *F. wislizeni* y *F. pilosus* aportó más elementos visuales que la tinción con Tz, para determinar la viabilidad de las semillas muestreadas.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E. F. 2001.** The cactus family. Timber Press, Inc. Oregon, USA. 776 p.
- Alaníz-Rodríguez, E., A. Mora-Olivo, J. Jiménez-Pérez, M. A. González-Tagle, J. I. Yerena-Yamallel, J. G. Martínez-Ávalos, L. E. González-Rodríguez. 2015.** Composición y diversidad del matorral desértico rosetófilo en dos tipos de suelo en el Noreste de México. *Acta Botánica Mexicana*. 110: 105-117.
- Amador-Alfárez, K.A., J. Díaz-González, S. Loza-Cornejo, E. Y. Bivián-Castro. 2013.** Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*. 35: 109-131.
- Barone, J., E. Duarte, C. Luna. 2016.** Determinación de la eficacia de métodos de evaluación de calidad de semillas de especies forestales nativas de la selva del Atlántico. *Quebracho*. 24: 70-80.
- Benito-Matías, L.F., N. Herrero-Sierra, I. Jiménez, J.L. Peña-Rubira. 2004.** Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: Test de Tetrazolio e Índigo carmín. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 17: 23-28.
- Bowers, J. E. 2000.** Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank? *Journal of Arid Environments*. 45: 197-205.
- Castillo-Campohermoso, A. D., A. López-Espinosa, I. Ocampo-Fletes. 2010.** Conocimiento y uso de cactáceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Ra Ximbo*. 6: 347-353.

- Cortés, L., Domínguez, I., T. Lebgue, O. Viramontes, A. Melgoza, C. Pineda, J. Camarillo. 2014.** Variation and Distribution of Four Cacti Species Due to Climate Change in Chihuahua, México. *International Journal of Resources Public Health*. 11: 390-402.
- Fencl, R., R. Kalas. 2013.** *Ferocactus wislizeni* susp. *Ajoensis* (Cactaceae), a new subspecies from south-western Arizona. *Bradleya*. 31: 5-14.
- Ferro, M. L., N. H. Nguyen, A. Tishechkin, J.-S. Park, V. Bayless. 2013.** Coleoptera Collected from Rotting Fishhook Barrel Cacti (*Ferocactus wislizeni* (Engelm.) Britton and Rose), with a Review of Nearctic Coleoptera Associated with Succulents Necrosis. *The Coleopterists Bulletin*. 67: 419-443.
- Flores, J., Jurado, E. 2011.** Germinación de especies de cactáceas en categoría de riesgo del desierto chihuahuense. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2: 59-70.
- Flores-Martínez, A., G. I. Manzanero-Medina. 2003.** Germinación comparativa de especies del género *Mammillaria* endémicas de Oaxaca, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 48: 36-51.
- Ghaffari, A., T. Hasanloo, M. K. Nekouei. 2013.** Micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and effect of medium composition on proliferation and rooting. *International Journal of Biosciences*. 3: 129-139.
- Guerrero-Muñoz, P., H. A. Zavaleta-Mancera, A. F. Barrientos-Priego, C. Gallegos-Vázquez, E. Valdéz-Moctezuma, J. A. Cuevas-Sánchez. 2006.** Técnica para el estudio de la micro morfología interna de semillas duras en *Opuntia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29: 37-43.

- Guillén-Trujillo, A., A. Palacios-Espinosa, J. L. Espinoza-Villavicencio. 2011.**
Ecuaciones de predicción para estimar el potencial productivo de *Ferocactus* spp.
Interciencia. 36: 785-788.
- Guillén-Trujillo, A., J. L. Espinoza-Villavicencio, R. Ortega-Pérez, N. Y. Ávila-Serrano, A. Palacios-Espinosa. 2014.** Efecto del tiempo de almacenamiento de semillas en la germinación y sobrevivencia de *Ferocactus townsedianus* Britt & Rose. Interciencia. 39: 732-735.
- Khalafalla, M. M., E. Abdellatef, M. M. Mohameed-Ahmed, M. G. Osman. 2007.**
Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. International Journal of Sustainable Crop Production. 2: 1-8.
- Loustalot-Laclette, E., G. X. Malda-Barrera, H. Suzan-Azpiri, H., L. G. Hernández-Sandoval, A. Guevara-Escobar. 2014.** Estudio de germinación y crecimiento en semillas de *Ferocactus hixtrix* (De Candolle). Cactáceas y succulentas Mexicanas. 59: 79-95.
- Maguire, J. D. 1962.** Speed of gemination-aid selection and evaluation and vigor. Crop Science. 2: 176-177.
- Manzo-Rodríguez, S. M. 2015.** Morfología, germinación, micro propagación y análisis cromosómico de cuatro especies de cactáceas para su conservación. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 1-100.
- Martínez-Adriano, C. A., U, Romero-Méndez, J. Flores, E. Jurado, E. Estrada-Castillón. 2015.** Floral visitors of *Astrophytum myriostigma* in la Sierra el Sarnoso, Durango, México. The Southwestern Naturalist. 60: 158-165.

- Meza-Rangel, E., F. Tafoya, R. Linding-Cisneros, J. J. Sigala-Rodríguez, E. Pérez-Molphe-Balch. 2014.** Distribución actual y potencial de las cactáceas *Ferocactus hixtrix*, *Mammillaria bombycina* y *M. perezdelarosae* en el estado de Aguascalientes, México. *Acta botánica mexicana*. 108: 67-80.
- Monroy-Vázquez, M.E., C. B. Peña-Valdivia, J. R. García-Nava, E. Solano-Camacho, H. Campos E. García-Villanueva. 2017.** Imbibición, viabilidad y vigor de semillas de cuatro especies de *Opuntia* con grados distintos de domesticación. *Agrociencia*. 51: 27-42.
- Navarro, M. del C., A. P. Deméneghi. 2007.** Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. *Zonas Áridas*. 11: 233-239.
- Navarro, M. del C., E. M. González. 2007.** Efecto de la escarificación de semillas en la germinación y crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). *Zonas Áridas*, 11: 195-205.
- Navarro, M. del C., R. Tzompa, E. M. González. 2013.** Propagación de *Echinocactus platyacanthus*: efectos del sustrato, viabilidad y escarificación de semillas. *Zonas áridas* 15: 31-47.
- Pérez-García, F., J. M. Pita-Villamil. 2001.** Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. 1-16.
- Pérez-Molpe Bach, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. del R. Morones-Ruiz, H. J. Lizalde-Viramontes. 1998.** Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 34: 131-135.

- Rodríguez-Ruiz, E. M., W. A. Poot-Poot, J. A. Rangel-Lucio, H. Vaquera-Huerta, O. J. González-Gaona, J. Treviño-Carreón. 2018.** Germinación *In vitro* de biznaga cabuchera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9: 691-699.
- Rojas-Aréchiga, M., K. M. Aguilar, J. Golubov, M. C. Mandujano. 2011.** Effect of Gibberellic Acid on germination of seeds of five species of cacti from the Chihuahuan desert, Northern México. *The Southwestern Naturalist* 56: 395-435.
- Rojas-Aréchiga, M., C. Vázquez-Yañez. 2000.** Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*. 44: 85-104.
- Romero-Méndez, U., R. Figueroa-Viramontes, S. Berumen-Padilla. J. J. Martínez-Ríos, M. C. García-dela Peña. 2013.** Notas sobre la germinación de la semilla de *Astrophytum myriostigma* Lem. (1839): Una revisión bibliográfica. *Agrofaz*. 13: 81-85.
- Salazar-Mercado, S. A., J. D. Gélvez-Manrique. 2015.** Determinación de la viabilidad de semillas de orquídeas utilizando la prueba de Tetrazolio e Índigo Carmín. *Revista de Ciencias*. 19: 59-69.
- Sánchez-Soto, B., Á. Reyes-Olivas, García-Moya, E., T. Terrazas. 2010.** Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del Noreste de México. *Interciencia*. 35: 299-305.
- Solano-Picazo- C., J. Blancas. 2018.** Etnobotánica de Wirikuta: Uso de recursos vegetales silvestres en el desierto de San Luis Potosí, México. *Revista Etnobiología*. 16: 54-77.
- Tarango-Arámbula, L. A. 2005.** Problemática y alternativas de desarrollo de las zonas áridas y semi áridas de México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 4: 17-21.

Vadillo, G., M. Suni, A. Cano. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*. 11: 71-78.

CONCLUSIONES GENERALES

- Es posible realizar injertos de plántulas de diez días de germinadas, de *O. robusta* var. CP-Tepemor, con patrones de la misma variedad y con el hipocótilo como tejido de unión del injerto.
- Los injertos de plántulas de diez días de *O. robusta* var. CP-Tepemor, con la técnica de perforación, tienen un porcentaje de supervivencia del 73%.
- Las plántulas sin clorofila de *O. robusta* var. CP-Tepemor injertadas en púa, sobreviven en promedio 13 días más que las injertadas en caras planas.
- Es factible usar patrones de *O. robusta* var. CP-Tepemor para realizar injertos de plántulas de la misma variedad con la técnica de perforación.
- La escarificación de semillas con H_2SO_4 en *F. wislizeni* no presenta diferencias significativas en el % de germinación, con la adición de un tratamiento pre germinativo con AG_3 , pero si presenta diferencias significativas en el crecimiento y características morfológicas de las plántulas, en cultivo *In vitro*.
- El tratamiento pre germinativo de AG_3 en *F. pilosus* presenta diferencias significativas en % de germinación y características morfológicas de las plántulas, en comparación con sólo la escarificación con H_2SO_4 , en cultivo *In vitro*.
- La tinción con IC para *F. wislizeni* y *F. pilosus* aportó más elementos visuales que la tinción con Tz, para determinar la viabilidad de las semillas muestreadas.