

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae)

Informe de Tesis

Presentado por

María Amparo Ordóñez Medina

Para optar al Título de

Bióloga

Guatemala, noviembre 2003

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN _____	2
2. INTRODUCCIÓN _____	4
3. ANTECEDENTES _____	6
3.1 Características de las Cactáceas _____	6
3.2 Cultivo de Tejidos Vegetales <i>in vitro</i> _____	14
3.2.1 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> _____	15
3.2.2 El explante _____	16
3.2.3 Métodos asépticos _____	17
3.2.4 Medios de Cultivo _____	18
3.2.5 Condiciones ambientales para la incubación _____	20
3.3 Propagación <i>in vitro</i> de Cactáceas _____	22
3.4 Descripción de <i>Mammillaria voburnensis</i> Scheer. _____	27
4. JUSTIFICACIÓN _____	29
5. OBJETIVOS _____	31
6. HIPÓTESIS _____	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS _____	33
7.1 Universo de trabajo _____	33
7.2 Medios _____	33
7.2.1 Recursos Humanos _____	33
7.2.2 Recursos Materiales _____	33
7.3 Metodología _____	35
7.3.1 Fase I Obtención de plántulas <i>in vitro</i> _____	35
7.3.2 Fase II Inducción de brotes _____	38
7.4 Modelo estadístico _____	42
8. RESULTADOS _____	43
8.1 Fase I Obtención de plántulas <i>in vitro</i> _____	43
8.2 Fase II Inducción de brotes _____	44
9. DISCUSIÓN _____	49
10. CONCLUSIONES _____	57
11. RECOMENDACIONES _____	58
12. REFERENCIAS _____	59
13. ANEXOS _____	64

1. RESUMEN

El género *Mammillaria* posee varias especies que están en peligro de extinción, como es el caso de la *Mammillaria voburnensis* Scheer., una cactácea de tallo globoso que forma densas agrupaciones y posee flores amarillentas que al emerger en la parte apical de la planta asemejan una corona. Dicha especie se localiza al oriente de Guatemala, en una de las regiones semiáridas del país, en el departamento de El Progreso en la localidades de El Rancho y San Agustín Acasaguastlán.

Considerando esta condición y su potencial como planta ornamental, en el presente trabajo se desarrolló un procedimiento para la propagación *in vitro* de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. como una alternativa para su conservación. Dicha investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).

El estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en la elección de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. como especie a trabajar, para luego recolectar frutos de ésta en el campo y germinar las semillas en condiciones *in vitro*. Para esta fase se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS), con el cual se obtuvo un porcentaje de germinación del 80%. Después de seis meses las plántulas que medían aproximadamente un centímetro de altura estaban listas para ser usadas como material para obtener los explantes.

En la segunda fase, se indujo la formación de brotes axilares, para lo cual se evaluaron siete tratamientos, que consistieron en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes combinaciones y concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) y el testigo sin reguladores de crecimiento.

Los explantes se obtuvieron al eliminar la parte apical y basal de la plántula y cortar longitudinalmente el segmento restante, para sembrar cada explante lateral en un tubo de vidrio que contenía el medio de cultivo. Los explantes se mantuvieron bajo condiciones de incubación controladas por dos meses, luego de los cuales respondieron morfogénicamente con la formación de brotes.

Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al promedio de brotes por explante y con base en la prueba de Tukey se estableció que el tratamiento cuatro, que consistió en el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.1 mg/l de bencilaminopurina + 0.01mg/l de ácido naftalenacético fue el óptimo, ya que indujo el mayor promedio de brotes por explante. Los brotes obtenidos eran semiesféricos, de color verde, medían entre 0.3-0.4 cm de diámetro, al menos 0.4 cm de altura, con desarrollo externo de espinas radiales y centrales sobre las areolas y en la anatomía interna hubo diferenciación del sistema dérmico, fundamental y vascular.

Los resultados indican que para la propagación de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. se requiere de la combinación específica de la citocinina, bencilaminopurina en una concentración moderada y de la auxina, ácido naftalenacético en baja concentración para lograr la formación de brotes cualitativamente viables.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país de contrastes con una extraordinaria diversidad biológica, que se ve reflejada en su flora y fauna tan variada y característica. El chaparral espinoso o monte espinoso, es un ecosistema que debe su nombre a la presencia de especies morfológicamente espinosas con adaptaciones fisiológicas a la aridez, en conjunto representan el 70% de la composición vegetal de la zona (Castañeda, 1996).

La Familia Cactaceae, endémica del continente Americano está bien representada en la región semiárida del oriente del país. Dentro de esta Familia existe una gran diversidad de acuerdo a la forma, hábito y tamaño de sus tallos; los hay de gran porte arbóreo, como *Stenocereus eichlamii* Britt. & Rose, *Myrtillocactus eichlamii* Britt. & Rose, *Pereskia autumnalis* (Eichlam) Rose, Contr. y *Pilosocereus leucocephalus* Byles & Rowley, arbustivos como *Opuntia* Miller y *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummeliack y otros más pequeños que apenas se distinguen de estrato herbáceo, como, *Mammillaria voburnensis* Scheer., *Peniocereus hischtianus* (Schum.) Britt. & Rose. y *Melocactus curvispinus* Peiffer. Los trepadores como *Hylocereus undatus* (Haworth) Britt. & Rose. y los epífitos, que viven sobre árboles sin llegar a ser parásitos, como *Epiphyllum bififormis* Lindl. y *Rhipsalis baccifera* (Mill.) Stearn.

Los cactus, como comúnmente se les conoce, han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas asombrosas que les permiten enfrentar las condiciones climáticas de esta región, entre las cuales están tallos gruesos y carnosos, hojas que la evolución transformó en espinas, su estructura crasa, areolas, espinación diversa y un metabolismo de tipo ácido crasuláceo (CAM). Sin embargo, estas particulares plantas, de las cuales hay mucho por estudiar, se han visto seriamente amenazadas por la destrucción de su hábitat natural, la depredación y el comercio ilegal que se ha producido, debido a su belleza como plantas ornamentales, colocándolas en riesgo de extinción si no se hace un alto y se ejecutan acciones de conservación. El responsable de tal alteración y destrucción, el ser humano, también posee las herramientas para el rescate y preservación de estas especies en peligro de desaparecer.

La Biotecnología vegetal, con el cultivo *in vitro*, constituye una alternativa eficaz para este fin, ya que la micropropagación (Ordóñez, 1999) tiene como principio la totipotencialidad de las células vegetales, donde a partir de una porción de tejido (explante) mantenido bajo condiciones físicas y químicas controladas puede originarse una nueva planta. Sin embargo, es necesario la acción balanceada de reguladores del crecimiento para estimular o modificar la respuesta morfogénica del tejido.

La *Mammillaria voburnensis* Scheer., es una especie amenazada que se encuentra en el apéndice II del Convenio Sobre Comercio Internacional De Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES) y en la categoría 2 de la Lista Roja de Flora Silvestre para Guatemala publicada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) en el año 2002.

Considerando el gran potencial de la biotecnología y la situación ecológica de la *Mammillaria voburnensis* Scheer. este trabajo es una acción preliminar para la conservación de esta especie, a través del cultivo *in vitro*. Lograr su micropropagación evaluando la influencia de diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores del crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) para inducir la formación de brotes.

3. ANTECEDENTES

3.1 Características de las Cactáceas

Los miembros de la Familia Cactaceae, comúnmente se conocen como cactus; son nativos del continente Americano y se encuentran desde Canadá hasta el sur de Argentina., desde el litoral hasta los 4000 metros de altura (Ríha,1991).

Origen y Evolución

Los cactus evolucionaron en los últimos 80 millones de años, a partir de plantas no suculentas con hojas desarrolladas, con fotosíntesis C_3 que vivieron en territorios emergidos del Caribe. El origen filogenético de estas formas ancestrales se encuentra entre las antiguas dicotiledóneas del orden Caryophyllales. De dichos ancestros se originaron las primeras Pereskioideas, Opuntioideas y Cactoideas, que constituyen, en orden evolutivo, las subfamilias de las cactáceas, que migraron hacia el sur y hacia el norte a lo largo del continente; alcanzando regiones donde la mayoría se diferenció en géneros que alcanzaron un endemismo muy notable (Bravo,1978).

Distribución

Las cactáceas habitan en lugares áridos y semiárido del continente americano, sin embargo también se encuentran en zonas tropicales húmedas. En las regiones desérticas, semidesérticas, a veces cubiertas de bosques secos, chaparrales o matorrales espinosos de América del Norte y de Centroamérica se encuentran la mayor variedad de cactus, los cuales llegan a dominar las asociaciones vegetales y determinar el paisaje (Ríha,1991).

Hay numerosas especies y variedades de las cuales algunas están localizadas en pequeñas áreas, mientras otras se distribuyen en regiones más bastas. En las regiones intertropicales y templadas de América existen aproximadamente más de 1500 especies (Paniagua, 1980).

La zona semiárida de Guatemala está clasificada como bosque subtropical muy seco o espinoso. El chaparral espinoso constituye un bioma discontinuo representado por tres regiones de naturaleza semiárida. La primera en los alrededores de Nentón, al pie de la Sierra de los Cuchumatanes; la segunda en una estrecha faja que corre a lo largo del valle del río Negro o Chixoy, desde el sur del pueblo de Aguacatán hasta el trifinio de El Quiche,

Baja Verapaz y Alta Verapaz, penetrando los valles de Rabinal, Chicaj, Salamá y San Jerónimo; y la tercera y más amplia entre los departamentos de El Progreso y Zacapa. Esta última posee una superficie aproximada de 928 Km² en altitudes que van de los 140 a los 560 msnm., rodeada por la Sierra de la Minas al norte, la montaña de Jalapa al sur y la Sierra del Merendón al este. Incluye un valle de aprox. 75 Km de longitud, atravesado por el río Motagua en el cual desembocan numerosos ríos. En esta región existen 165 especies, correspondientes a no menos de 50 familias (Catañeda, 1996; Villar, 1998).

Morfología

Las cactáceas han sufrido varias modificaciones para poder adaptarse y sobrevivir al ambiente al que están expuestas. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten acumular agua durante los meses de sequía y al mismo tiempo evitar la evapotranspiración (Bravo, 1995). Poseen estructuras especializadas debido al medio desértico en el que crecen, adaptaciones para trepar en el caso de especies en las selvas tropicales húmedas y por el tipo de polinización también experimentan cambios. En la evolución de sus estructuras han actuado diferentes tendencias morfológicas como: fusión de partes de un órgano, reducción del tallo, modificaciones de las hojas y cambio de simetría de las flores, tendencias que en conjunto han llevado a establecer posibles líneas filogenéticas (Bravo, 1978).

Las raíces de los cactus son originalmente terminales y fuertes. Las raíces de la planta le sirven para extraer agua y nutrientes, así como para fijarse al suelo. La raíz principal de forma cónica se halla muy ramificada dando lugar a un sistema radicular esparcido. Las raíces principales penetran la tierra para fijación mientras las secundarias se extienden horizontalmente cerca de la superficie y tienen como principal función la absorción (Ballester, 1978; Paniagua, 1980; Bravo, 1995).

En cuanto a la diversidad de los tallos, éste varía mucho en tamaño y forma según la especie de que se trate. El tallo puede estar constituido por segmentos (cladodios), que son aplanados en *Opuntia*, o cilíndricos en otras especies, también se encuentran tallos globosos (*Mammillaria*) con costillas o cubiertos de protuberancias (Ballester, 1978; Rodríguez, 1985). Las cactáceas tienen tallos arbóreos grandes, bien definidos y hojas laminares como en el género *Pereskia*.

En el caso de los grandes *Cereus*, son tallos arbóreos más o menos ramificados, hasta columnares, con ramas gruesas y carnosas provistas de tubérculos que forman costillas longitudinales. En los matorrales xerófitos también se localizan cactus trepadores como los del género *Peniocereus* o *Selenicereus*. En las selvas tropicales perennifolias crecen cactáceas epífitas, la mayoría con tallos aplanados, muy delgados, casi sin espinas, llamados filocladios, estos se encuentran en las especies del género *Epiphyllum* y *Rhipsalis* (Bravo, 1995).

En la mayoría de los cactus las hojas están ausentes o son caedizas y muy rudimentarias, reduciéndose a pequeñas escamas. Solo en los géneros más primitivos como *Pereskia*, *Quiabentia* y *Pereskiohis* existen hojas integradas por limbo y pecíolo. En todas las demás las hojas han sufrido modificaciones, el pecíolo se ha hipertrofiado en un tubérculo en tanto que el limbo se ha reducido a vestigios microscópicos. Las espinas son en realidad porciones del limbo foliar modificado y los tubérculos sobre los cuales se sientan las areolas y espinas, corresponden a bases de la hoja (Ballester, 1978; Bravo, 1995).

La areola es un órgano característico de las cactáceas, homóloga a las yemas de las dicotiledóneas. Son las yemas de los cactus y dan lugar a hojas, brotes y flores, pero también son el origen de pelos, gloquidios y espinas. Su forma es de pequeñas almohadillas a menudo cubiertas de pubescencia y pueden estar situadas a lo largo de las costillas como en el caso de cactus de tipo columnar o algunos de forma globular o sobre los tubérculos de numerosas especies globosas (*Mammillaria* spp.). Al centro de las areolas se encuentra el meristemo de crecimiento integrado por dos regiones: una adaxial que da lugar a flores, que recibe el nombre de meristemo areolar florífero y una región abaxial que da lugar a espinas, denominado meristemo areolar espinífero o vegetativo. En *Mammillaria* el meristemo areolar florífero está completamente separado del vegetativo. Situándose en el ápice del tubérculo, el vegetativo, mientras el florífero, queda desplazado hacia la axila de éste (Bravo, 1978; Hecht, 1998).

Las espinas son órganos característicos de las cactáceas y están siempre presentes, brotan siempre de las areolas. Como ya se mencionó anteriormente, son hojas modificadas, reducidas por la acción del medio seco, en donde los tejidos se atrofian y parte de ellos se esclerifica, aunque persisten los vasos conductores de agua que se condensa en la superficie. Existe una gran diversidad de espinas, de diferentes formas, tamaños y colores. En una misma areola se pueden encontrar dos tipos de espinas: las radiales, exteriores, que son generalmente más delgadas y numerosas y las centrales son más gruesas y escasas. Se consideran también órganos de protección, ya que aíslan a la planta de acciones nocivas del medio del desierto (insolación, sequía, viento, etc.) aparte de preservarlas de los daños que muchos animales les pudieran causar (Bravo, 1995).

Sus flores son de atractivos y brillantes colores. La mayoría de las veces las flores son abocinadas o campanuladas y con menos frecuencia presentan forma de copa. Hay flores nocturnas y diurnas, algunas bastante efímeras, pero las hay que se mantienen por semanas. En algunas especies las flores son radiales en otras son de dos caras simétrica o zigomórficas. La mayoría de los cactus son hermafroditas. Las flores no tienen tallo, sino que están pegadas en la aréolas (Rodríguez, 1985). Poseen ovario ínfero y no existe una plena diferenciación entre las piezas del cáliz y de la corola, ya que ambas son coloreadas, por consiguiente poseen tépalos. Todas las estructuras de las flores están determinadas por la sequía y por las modalidades de polinización (Bravo, 1995).

Los frutos de las cactáceas son peculiares, generalmente se les describe como bayas carnosas, aunque en algunos casos sería más propio denominarlos cápsulas, ya que son dehiscentes. (Paniagua, 1980; Bravo, 1995). Los frutos de algunas especies son comestibles, como es el caso de la pitahaya o de las tunas.

Fisiología

De acuerdo al medio árido donde habitan la cactáceas, éstas han tenido que adaptarse para sobrevivir. Lo cual han logrado con ciertas modalidades es sus diversos procesos fisiológicos, como el intercambio gaseoso que es uno de los principales y la obtención de energía.

La respiración, transpiración y asimilación del carbono están determinadas por la estructura crasa de los tallos y por la apertura nocturna de los estomas, ya que evitan la pérdida de agua, porque la temperatura es más baja durante la noche que durante el día y es entonces cuando ocurre el intercambio gaseoso. Las cactáceas poseen un metabolismo fotosintético ácido crasuláceo (CAM). La entrada del CO₂ ocurre únicamente de noche, este gas como no se utiliza de inmediato por la falta de luz solar, se transforma en un ácido orgánico, en un malato, permaneciendo en este estado durante la noche y liberándose al principiar el día para continuar con el proceso de fotosíntesis (Bravo, 1995).

Durante la transpiración se acumula agua en los tejidos vegetales que es utilizada de diversas maneras, el resto se elimina durante la noche a través de los estomas. En las cactáceas la evapotranspiración se efectúa de manera activa en la época de lluvias, de modo que el suelo está húmedo y los pelos absorbentes de la raíz pueden tomar agua (Bravo, 1995).

Crecimiento

El crecimiento de los cactus, al igual que en otras plantas, se da por la actividad de los tejidos embrionarios, meristemos vegetativos que se localizan en la punta de las raíces y de los tallos, en el cambium y en las yemas, en el caso de cactus en las aréolas, que dan origen a brotes, flores, espinas, etc. Un aspecto importante es su lento crecimiento, que a veces dura cientos de años (Bravo, 1985).

Las condiciones climáticas son un factor determinante en el crecimiento de las cactáceas, así como lo son los factores genéticos, metabólicos y las hormonas vegetales que se forman en los tejidos y se movilizan a través del sistema vascular. Entre estas hormonas están las auxinas, giberelinas y citocininas. La auxina más estudiada y abundante en la planta es el ácido indolacético (AIA). Sus efectos de regular el crecimiento y desarrollo de la planta interactúan con otras fitohormonas y en muchos casos están relacionados con lo que ejerce a nivel celular. La auxina se sintetiza principalmente en los ápices de tallos y raíces de donde se transporta a la zona de elongación y otras zonas donde ejercerá su acción. Las giberelinas inducen la germinación, estimulan la síntesis de auxinas y también regularizan el crecimiento general de la planta. Las citocininas regulan la división celular y participan del control de desarrollo y senescencia de las plantas. Las concentraciones más elevadas de las citocininas son encontradas en regiones meristemáticas o en órganos en

crecimiento como hojas jóvenes, semillas en desarrollo, frutos y raíces; el meristemo apical de la raíz es el principal lugar de síntesis de citocininas en plantas (Bravo, 1995; Amador, 2001).

Reproducción

La reproducción puede ser asexual por multiplicación vegetativa, debido al desprendimiento de artículos que una vez en el suelo brotan por sus aréolas o bien pueden reproducirse sexualmente (Paniagua, 1980). La reproducción sexual ocurre en primavera. La flor se abre y entra en antesis. Por los brillantes colores, el olor agradable o desagradable, la forma y el néctar que producen, llegan a ellas numerosos insectos, murciélagos, aves y mariposas que llevan a cabo la polinización. Dicha polinización es cruzada (alogamia), pues generalmente ocurre Protandria, el polen madura antes que el estigma esté en aptitud de recibirlo. Entre los más eficientes polinizadores están las avispas y abejas, que son bastante especializados en cuanto a la especie que polinizan, existiendo en algunos casos una relación planta-polinizador (Paniagua, 1980; Bravo, 1995).

Germinación

La germinación de las semillas de las cactáceas es un proceso difícil, debido al medio en que se encuentran, aún cuando los frutos produzcan numerosas semillas sólo unas cuantas logran germinar. Las plántulas que logran desarrollarse son aquellas que sobreviven a una serie de adversidades, tanto climáticas como biológicas. Es de considerar también las condiciones ecológicas actuales a las que están expuestas, las cuales hacen aun más difícil su sobrevivencia y reproducción (Bravo, 1995; CONABIO, 1997).

Amenazas y Conservación

El área donde se encuentran los cactus sufre de varias amenazas, entre las cuales está la agricultura y el pastoreo. El ecosistema es destruido por la necesidad de tierras que fuerza a lo campesinos a deforestar para monocultivos estacionales de autoconsumo, especialmente frijol y maíz, la construcción de carreteras y el avance urbano. De tal manera que la diversidad biológica desaparece, perdiéndose flora y fauna probablemente no descrita o endémicas del lugar, que se acaban al desaparecer su hábitat natural (Bravo, 1995; Castañeda, 1996).

El cultivo del melón, ha incrementado en Guatemala en los últimos diez años, de tal manera que algunos hábitats específicos han desaparecido y con ellos especies endémicas (*Myrtillocactus eichlamii* Britt. & Rose) y se han visto reducidas las poblaciones de cactáceas existentes, siendo una consecuencia grave de esto la pérdida de la diversidad genética de la población, así como la posible utilidad de algunas especies.

La deforestación y la sobrecolecta de especies de cactus para su uso comercial, más que todo como ornamentales, contribuye no sólo a la pérdida de este recurso natural, sino también a la desertificación del suelo alterando las comunidades y su regeneración (Castañeda, 1996).

Al llevarse a las plantas maduras, éstas ya no dejan descendientes en la zona, no hay reproducción vegetativa ni reproducción sexual que permita la propagación de las especies, de tal manera que los individuos van siendo cada vez más escasos, y restringidos a áreas más pequeñas dentro de la zona (Castañeda, 1996).

La creciente demanda de los países extranjeros por los cactus (AGEXPRONT, 2001), ha propiciado el establecimiento de actividades dedicadas a la colecta y al comercio ilegal de éstos. Por lo que todas las cactáceas guatemaltecas se incluyen en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional De Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y están en la categoría dos de la Lista Roja para Flora silvestre de Guatemala publicada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), en el año 2002, categoría que incluye especies de distribución restringida aun sólo tipo de hábitat (endémicas) y especies en bajas densidades poblacionales.

El aprovechamiento de las cactáceas es variado y en Guatemala falta poner en práctica muchas de sus utilidades. Razón por la cual es necesario su estudio sin olvidar su importancia ecológica, como especies endémicas de la región, que mantienen relación con otras especies de flora y fauna de las zonas semiáridas del país. Realizar investigaciones de las especies nativas de Guatemala, así como estudios ecológicos de las poblaciones y su distribución. Estudios en torno al impacto ecológico que provocan las extracciones ilegales de material biológico de las poblaciones silvestres. Para su conservación es vital mantener el hábitat donde crecen y se desarrollan, todos sus procesos biológicos e interrelaciones a los cuales están adaptados.

Sin embargo, para algunas especies que se encuentran distribuidas únicamente en pequeñas localidades un desastre natural podría eliminar toda la población existente, por tanto sólo la preservación del hábitat sería insuficiente para asegurar la sobrevivencia de la especie (Hubstenberger et al., 1992).

Dentro de las estrategias para la conservación de cactus *in situ* está establecer áreas protegidas, en lugares aún no muy perturbados por el humano, donde se conserven las cactáceas con flora y fauna asociada. Revalorizar este ecosistema que muchos creen no útil, enfatizando el endemismo de las especies así como su importancia económica. Como indica Castañeda (1996) para conservar esta zona semiárida, sería necesario fomentar el uso de especies nativas para mejorar los sistemas naturales controlados o sistemas agrícolas y proponer métodos para almacenamiento de agua; lo que también ayudaría a mantener la biodiversidad de área.

Existen varias alternativas para la conservación de cactus fuera de su hábitat, *ex situ*, como jardines botánicos, que mantengan colecciones de plantas vivas para estudios y conservación. Otra estrategia es la propagación y cultivo de los cactus usando diferentes métodos, con lo cual se reduciría las presiones de las poblaciones silvestres, con fines ornamentales, alimenticios, etc. (CONABIO, 1997). El cultivo *in vitro* en cactáceas ha surgido como una herramienta para su propagación efectiva, vislumbrándose aplicaciones de impacto para el rescate de la extinción así como un uso racional de esta riqueza. El conservacionismo, el valor potencial y el valor comercial deben ser factores que muevan a la realización de una operación de rescate *in vitro* (Rubluo, 1990).

3.2 Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*

Dentro de la Biotecnología Vegetal existen diferentes técnicas que están a disposición del hombre; avances tecnológicos que está obligado a utilizar no solo en un beneficio directo sino también indirecto, a forma de preservar y mejorar su medio ambiente natural. La Biotecnología es, sin duda, una de las áreas del conocimiento con mayor impacto sobre la sociedad del siglo XXI. Es así que la propagación por cultivo de tejidos vegetales o también llamada cultivo *in vitro*, es una herramienta biotecnológica para lograr el rescate de especies amenazadas de extinción, utilizando el principio de la totipotencialidad celular para obtener grandes cantidades de individuos en un tiempo menor que el que se requeriría naturalmente (Rubluo, 1990).

El cultivo de tejidos vegetales abarca un grupo de técnicas que consisten en aislar y cultivar ciertas partes de la planta (explante) como células, tejidos y órganos y proporcionarles condiciones físicas y químicas artificiales para que expresen su capacidad morfogenética. Es necesario también considerar el cultivo y manipulación del explante bajo condiciones de asepsia que eviten la contaminación microbiana (Rossell, 1990; Roca, 1991).

En la naturaleza las plantas poseen la capacidad de reproducirse vegetativamente, estos mismos factores que dan inicio al crecimiento y a la multiplicación naturalmente están involucrados en el cultivo de tejidos, aunque de manera más eficiente, ya que se le proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de la planta.

El proceso del cultivo de tejidos vegetales incluye cuatro etapas desde el estado de explante hasta el estado final de transferencia de una planta a condiciones de campo. Los cuatro estados del crecimiento del cultivo son:

Estado I etapa de establecimiento o iniciación, en la cual se establece el explante o el cultivo inicial.

Estado II etapa de multiplicación de brotes

Estado III etapa de enraizamiento, producir una planta autótrofa capaz de sobrevivir al trasplantarse al suelo bajo condiciones externas.

Estado IV etapa de aclimatación o endurecimiento (Roca, 1991; Amador, 2001).

Dentro de los objetivos de este conjunto de técnicas según Usui, (1996) están: la micropropagación masiva, el mejoramiento genético y la producción de metabolitos secundarios. La mayoría de veces enfocados a especies de interés económico.

En general existen tres formas diferentes de regeneración vegetal *in vitro*, principalmente organogénesis, embriogénesis y proliferación de brotes axilares. Aunque la tasa de regeneración vegetal es generalmente mayor mediante organogénesis o embriogénesis, el cultivo de meristemas y ápices de brote que permite la proliferación de brotes mediante yemas axilares está todavía considerado como un método seleccionado para la propagación masiva *in vitro*. La rapidez, el tiempo y el espacio de almacenamiento y el mayor potencial de producción vegetal son algunas de sus ventajas sobre los métodos convencionales.

Las principales Técnicas del Cultivo de tejidos vegetales son:

Cultivo de tejidos no organizados

- a. Cultivo de callos
- b. Cultivos en suspensión (o células)
- c. Cultivo de protoplastos
- d. Cultivo de anteras

Cultivo de estructuras organizadas

- a. Cultivo de meristemas
- b. Cultivo de brotes o ápices de brotes
- c. Cultivo de nudos
- d. Cultivo de embriones
- e. Cultivo de raíces aisladas

3.2.1 Establecimiento de cultivos *in vitro*

El cultivo de tejidos comprende una serie de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de la planta) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (luminosidad, humedad y temperatura) (Rosell, 1990; Roca, 1991).

Sin embargo, para lograr el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, es necesario considerar en gran medida el tipo de explante a utilizar así como el sistema de cultivo que se emplee (Roca, 1991).

Para establecer el cultivo de células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos. Inicialmente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último se debe proporcionar al explante un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas (Rosell, 1990; Roca, 1991).

Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se lleva a cabo en un ambiente estéril. Tomando en cuenta estos principios básicos para el establecimiento de los cultivos se consideran los siguientes aspectos: a) el explante; b) las normas de asepsia; c) los medios de cultivo; y d) las condiciones ambientales de incubación; ya que la interacción de estos factores determinará las respuestas que se obtengan del cultivo *in vitro* (Rosell, 1990; Roca, 1991).

3.2.2 El explante

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente de cualquier parte de la planta. Sin embargo la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, dicha elección dependerá del objetivo, de la especie vegetal y del sistema de cultivo a utilizar.

Es aconsejable utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente del explante. Se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito del cultivo de tejidos disminuye con el aumento de la edad de la planta que da el explante (planta madre), Villalobos et al. (1982) han observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, ya que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas de diferentes edades fisiológicas. Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*.

A este respecto los meristemos apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies. (Rosell, 1990; Roca, 1991).

El tamaño del explante es otro factor a considerar en el establecimiento del cultivo *in vitro*. A mayor tamaño se facilita la proliferación callosa, pero también aumentan las posibilidades de heterogeneidad y de contaminación por microorganismos. Sin embargo existe un tamaño mínimo del explante que varía según la especie vegetal, por debajo del cual no se obtiene respuesta.

La variabilidad asociada al genotipo de la especie vegetal a utilizar influye en la respuesta *in vitro* que se obtiene. Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en cuanto a los reguladores de crecimiento pueden ser de utilidad para obviar ese efecto del genotipo del material vegetal (Roca, 1991).

En el caso específico de las cactáceas, la selección del explante a cultivar resulta uno de los puntos de mayor importancia en la técnica de micropropagación. Las areolas, característica esencial de esta familia, constituyen centros meristemáticos capaces de generar yemas axilares, espinas y yemas florales, de allí que se empleen éstas como explantes comúnmente (Rubluo, 1990). Como explante se ha trabajado con el ápice de brotes de plántulas de semillero, ya sea germinadas *in vitro* o en invernaderos; secciones verticales o laterales del tallo o cladodio (el tallo aplanado típico de *Opuntia*) y tubérculos (llamados a veces mamilas) que son proyecciones suculentas del tallo que en algunas especies ocurren en una forma espiral. La punta del tallo de plántulas de invernadero o de plantas maduras de campo se pueden esterilizar y funcionan exitosamente como explantes o bien epicotilos de plántulas *in vitro* (Hubstenberger, et al 1992; George, 1996).

3.2.3 Métodos asépticos

Las plantas generalmente se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones naturales. Sin embargo cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro* el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células. Esto debido a que la asociación explante-medio y las condiciones ambientales en las que se incuban los cultivos proporcionan un ambiente propicio para la proliferación de patógenos (hongos y bacterias). De tal forma que éstos pueden destruir el explante, competir por los nutrientes del medio de cultivo o modificarlo con toxinas. Es así que evitar la

contaminación por microorganismos resulta un aspecto básico para el establecimiento del cultivo *in vitro* (Rosell, 1990; Roca, 1991).

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. En el cultivo de tejidos vegetales se emplea la palabra asepsia como sinónimo de estéril, ausente de microorganismos (Roca 1991).

Para la desinfección del material vegetativo se utiliza una serie de productos químicos, pero comúnmente es generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. La efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada al adicionarles pequeñas cantidades de detergente, como Tween-20, del 0.01% al 0.1%, ya que éste rompe la tensión superficial y permite que el agente penetre y elimine los microorganismos (Rosell, 1990; Roca, 1991).

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril trabajando en la cámara de transferencia. Al llevar a cabo la desinfección superficial de los explantes se deben de eliminar los microorganismos con el menor daño posible a los tejidos (Rosell, 1990; Roca, 1991).

3.2.4 Medios de Cultivo

El éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros factores ambientales. Las plantas para que puedan crecer y desarrollarse deben de absorber del suelo cantidades importantes de macronutrientes como las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. El medio de cultivo contiene estos elementos además de carbohidratos, usualmente la sacarosa, para reemplazar el carbono que la planta fija normalmente de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. También contiene compuestos orgánicos en pequeñas cantidades como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento (Rosell, 1990).

Existen diversos medios que se emplean en el cultivo de tejidos vegetales. Un medio básico es generalmente referido como aquel que no contiene reguladores de crecimiento y se le denomina con frecuencia con el apellido de la persona o personas que lo elaboraron por primera vez; uno de los medio más utilizados en la actualidad es el de Murashige y Skoog (1962) (MS).

Los medios son modificados cuando se les agrega reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones, determinadas principalmente por los requerimientos de los explantes en forma específica (Amador, 1999).

Los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

Sales Inorgánicas: Macro y micronutrientes.

Vitaminas: Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en cantidades traza (Rosell, 1990).

Reguladores de crecimiento:

Un regulador del crecimiento es un compuesto orgánico que en pequeñas cantidades promueve, inhibe o modifica de algún modo cualquier proceso fisiológico de crecimiento en las plantas.

Se conocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal divididos en tres grupos principales: a) promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas. Las auxinas frecuentemente empleadas en el cultivo de tejidos son: Ácido Indolacético (AIA), Ácido naftalenacético (ANA), Ácido Indolbutírico (AIB) y el Ácido 2,4-dihidroxiacético (2,4-D). Las citocininas empleadas con mayor frecuencia son: bencilaminopurina (BAP), benciladenina (BA), 6-dimetilalylaminopurina (2ip), zeatina (Z) y cinetina (KIN).

b) inhibidores del crecimiento: ácido absícico y c) etileno (Pérez, 2002).

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y el balance entre reguladores suplementados en el medio de cultivo y las sustancias del crecimiento (hormonas) producidas en forma endógena. En el cultivo *in vitro* las auxinas promueven el crecimiento de callo, suspensiones celulares y la rizogénesis. Las citocininas inducen la división celular y la formación de órganos (morfogénesis) junto con las auxinas (Amador, 2001).

En cactáceas se ha utilizado comúnmente el medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con hormonas preferentemente citocininas: 6-bencilaminopurina, cinetina y 2ip en un rango de concentración entre 1 – 10 mg/l. De las auxinas se prefieren los ácidos naftalenacético, indoacético e indolbutírico, en rangos de concentración mucho más bajos que las citocininas, entre 0.02 – 2 mg/l (Rubluo, 1990).

Aminoácidos:

Con la excepción de la glicina (ácido animoacético) que es un componente de varios medios de cultivo, los aminoácidos no son constituyentes esenciales de los medios de cultivo. Inclusive en concentraciones elevadas pueden causar efectos inhibitorios sobre los cultivos. (Rosell, 1990; Roca, 1991; Amador, 2001).

Carbohidratos:

Muy pocos cultivo *in vitro* son autótrofos, por lo que requieren una fuente de carbono y energía. La sacarosa es el azúcar empleado comúnmente en concentraciones de 2% a 5%. Se puede reemplazar por glucosa, fructosa y con menor efectividad la maltosa y galactosa (Roca, 1991).

Agua:

El agua que se utiliza en los medio de cultivo debe ser bidestilada o desmineralizada-destilada (Amador, 2001).

Agentes solidificantes:

Como agente gelificante para los medios de cultivo sólidos y semisólidos se utiliza comúnmente el agar (0.6% a 1.0%). El agar no es alterado por las enzimas vegetales. Tampoco interfiere con la movilización ni reacciona con los constituyentes del medio. Otro compuesto empleado como agente solidificante es el Phytigel. (Roca, 1991; Usui,1996).

3.2.5 Condiciones ambientales para la incubación

Las condiciones del medio ambiente influyen sobre varios aspectos del desarrollo de las vitroplantas, por lo que resulta importante considerar las relaciones entre medio ambiente y desarrollo. En el cultivo de tejidos vegetales el explante se incuba en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. La respuesta morfogenéticas pueden ser alteradas por la temperatura, así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Roca, 1991).

Según Usui (1996) la temperatura de incubación varía según el clima, para plantas de clima templado entre 20-30°C, plantas tropicales entre 25-30°C y plantas glaciales entre 15-20°C. Con iluminación suficiente las plantas crecen fuertes, con poca altura pero con hojas bien desarrolladas, mientras que con poca iluminación crecen débiles con hojas pequeñas y anormales. Sin embargo, no se recomienda una iluminación excesiva puesto que emite mucho calor, lo que es negativo para el crecimiento de las plantas (Usui, 1996). Normalmente lo mejor es una iluminación entre 1000 a 3000 lux, según la especie, para lo cual se utilizan lámparas fluorescentes (tipo luz de día) y lámparas incandescentes.

Las plantas requieren un fotoperíodo constante según sus necesidades fisiológicas, por lo tanto se debe de mantener un tiempo apropiado para cada especie de planta. Comúnmente en cactáceas los explantes se incuban a una temperatura de entre 25-27°C constantes con una intensidad luminosa de entre 1500-3000 lux y un ciclo de fotoperíodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad. La incubación a una temperatura de 29°C con luz en exceso de 10000 lx fluorescente e incandescente ininterrumpida elimina los problemas de brotes vítreos (Rubluo, 1990; Hubstenberger, et al., 1992).

3.3 Propagación *in vitro* de Cactáceas

Entre las familias más amenazadas están la Cactaceae y la Orchidaceae. Condición que se debe a las alteraciones ecológicas que el hombre ha propiciado en el medio ambiente.

Las cactáceas se reproducen por semillas o por multiplicación vegetativa, pero aún cuando los frutos producen gran cantidad de semillas, muy pocas son las que llegan a germinar y alcanzar la madurez. Muchas sirven de alimento a animales o al ser diseminadas las semillas no quedan en un lugar apto para su desarrollo. Por otro lado algunas especies presentan mecanismos de aislamiento y son autoestériles, mientras otras son de crecimiento extremadamente lento (Rubluo, 1990). Su índice de crecimiento es mucho más rápido en cultivo de tejidos donde las azúcares están libremente disponibles (George, 1996).

Considerando las alteraciones antropogénicas y las características fisiológicas y reproductivas de los cactus, la propagación artificial es una solución considerable a estos problemas. El cultivo de tejidos en condiciones *in vitro* acelera su multiplicación, logrando que de esta manera crezcan pronto individuos jóvenes. Para las especies comercialmente importantes, muchas especies silvestres serían beneficiadas por el cultivo de tejidos, ya que se reduciría la presión sobre las poblaciones naturales (Nava, et al., 1984; Rubluo, et al., 1993).

La propagación *in vitro* de las cactáceas ha surgido como una herramienta útil por el interés de éstas, como plantas ornamentales, industriales, alimenticias, forrajeras y por su importancia ecológica en los ecosistemas áridos y semiáridos del continente americano. Su propagación mediante el cultivo de tejidos bajo condiciones *in vitro* se ha desarrollado a través de dos vías principalmente: Morfogénesis y Embriogénesis somática. En la primera el objetivo es la inducción de la brotación múltiple en el explante. La embriogénesis somática se basa en la producción de un callo, tejido desorganizado, donde transcurrido un tiempo, si todo da resultado, pueden diferenciarse en la estructura, las formas características de un embrión que dará origen a una nueva planta (Watts, 2000).

Sin embargo, se ha desarrollado la micropropagación de muchos tipos de cactus a través de la multiplicación de brotes axilares (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Vyskot y Jára, 1984 y Pérez-Molphe, et al., 1996). utilizando diferentes tipos de explantes, dependiendo del género de cactácea. Con este tipo de micropropagación se obtiene un alto grado de uniformidad fenotípica y posiblemente una estabilidad genética entre los propágulos que se obtienen. Mediante la inducción de desarrollo axilar un inóculo que posee una sola yema puede desarrollar un sólo brote o producir brotes múltiples. Por este sistema de regeneración la dominancia apical es suprimida en los brotes o yemas vegetativas y el medio de cultivo y las condiciones ambientales son manipuladas a inducir brotación axilar (Pérez, 2002).

Para la micropropagación de cactus se han utilizado diferentes medios de cultivo, pero el medio basal de Murashige y Skoog (1962) ha sido recomendado como el más adecuado, pero es conveniente suplementarlo con reguladores de crecimiento, en general se requieren bajos niveles o nada de auxina en combinación con niveles moderados a elevados de citocinina para la proliferación axilar de cactus (Hubstenberger, et al., 1992). Entre las citocininas se prefiere el uso de la bencilaminopurina o 6-bencilaminopurina (BAP), la cinetina y 2ip en un rango de concentración entre 1-10 mg/l. De las auxinas se prefieren los ácidos naftalenacético, indolbutírico e indolacético pero en rangos mucho más bajos que las citocininas (entre 0.02-2 mg/l) (Rubluo, 1990). Muchos cactus tiene la capacidad de sintetizar endógenamente auxinas, lo que causa una inhibición del proceso morfogenético en presencia de altas concentraciones de auxinas, también el exceso de éstas estimula la formación de callo (Hubstenberger, et al., 1992).

El desarrollo de cultivo de tejidos vegetales en cactus ha sido consecuencia de estudios en diferentes áreas, tales como fisiología, morfología, morfogenética, genética, extracción de compuestos y la propagación de especies en peligro de extinción.

Los primeros estudios sobre el cultivo *in vitro* de cactus se iniciaron en los años 50 enfocados a la formación de callo y a la proliferación de brotes. Es así que en 1957 King publica la exitosa inducción de callo en varias especies. Sachar e Iver en 1959 investigan los efectos de auxinas, citocininas y giberelinas en la formación de callo de tejidos placentales de *Opuntia dilenii* (Pérez., 2002).

Kolar et al. en 1976 fue el primero en obtener brotes de *Mammillaria woodsi* a partir de callo cultivado *in vitro*, logrando su propagación masiva. Los brotes regeneraron en el medio Murashige y Skoog con 2.0 mg/l de cinetina y fueron enraizados *ex vitro* en perlita tratada con un estimulador de enraizamiento comercial. Este método disminuye un año el tiempo de propagación, en contraste con el método convencional usando semillas (Pérez., 2002).

Continuando con los trabajos, se hizo posible obtener brotes axilares en plántulas intactas estudiando el control hormonal en la diferenciación de los cactus. Basado en sus resultados Mauseth (1977), propone que el cultivo de tejidos puede emplearse para la propagación de brotes axilares en cactus. Es así que en 1979 Mauseth, logra exitosamente la micropropagación de cactáceas a través de brotes axilares. Posteriormente se han desarrollado sistemas de micropropagación para diferentes especies de cactus; los brotes se han enraizado y las plántulas se han restablecido con el 80-100% de eficiencia (Hubstenberger, et al., 1992).

En las diferentes investigaciones realizadas sobre el cultivo de tejidos *in vitro* de diferentes especies de cactáceas, (Nava, 1984, Ortiz, 1997, Pérez, et al., 1999) los explantes se han obtenido, ya sea de segmentos de: plantas producidas *in vitro* a partir de semillas esterilizadas, de plantas de invernadero o plantas colectadas en el campo.

Johnson y Emimo realizaron en 1979 la propagación *in vitro* de *Mammillaria elongata* DC, por organogénesis indirecta. Usando como inóculo tubérculos o mamilas cultivados en el medio MS suplementado con varias auxinas y citocininas. La proliferación de callo ocurrió en respuesta del 2,4-D (2-10 mg/l) con cinetina o 2-ip (1-2 mg/l). La iniciación de brotes fue optimizada con la adición de 2-ip (10 mg/l) e IAA (1 mg/l). Estos brotes enraizados y con 1 cm de largo se transfirieron al invernadero con 100% de sobrevivencia luego de dos semanas de aclimatación.

Vyskot y Jará, en 1984 lograron la propagación clonal *in vitro* de diferentes especies de cactáceas a través de yemas axilares. Los explantes se obtuvieron de plantas de invernadero y cada explante poseía areolas o mamilas con meristemo axilar adyacente. El medio de cultivo que utilizaron fue el Murashige y Skoog (1962) solidificado con agar y fue enriquecido con auxinas (Ácido Indolacético-AIA- y Ácido naftalenacético-ANA-) y citocininas (Kinetina y 6-bencilaminopurina-BAP-) en varias concentraciones y

combinaciones. Para la *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria prolifera* la producción de pequeños brotes fue estimulada en las regiones donde está parte del meristemo axilar. En el caso de la primera se obtuvo la mayor estimulación de brotes axilares con el medio suplementado con 1 mg/l de ANA y 2 mg/l de BAP y para la segunda los mejores medios fueron los que contenían 0.5 mg/l de ANA y 0.5-1 mg/l de BAP.

Martínez-Vázquez y Rubluo en 1989 partiendo de plántulas germinadas *in vitro* llevaron a cabo la propagación masiva *in vitro* de la casi extinta *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. Los dos factores influyentes en los resultados fueron la presencia de la citocinina bencilaminopurina (BAP) y el origen del explante. La formación de brotes simples y brotación múltiple la obtuvieron utilizando como explante la parte apical de la plántula, mientras que al cultivar explantes laterales únicamente obtuvieron brotación múltiple. El medio de cultivo empleado fue el Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de bencilaminopurina, BAP y del Ácido naftalenacético, ANA. Dando mejores resultados para la propagación masiva, el explante lateral en los medios enriquecidos con: 0.1 mg/l de BAP, 0.1 mg/l de BAP con 0.01 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP con 0.01 mg/l de ANA.

En 1995 Silos-Espinos, H. et al. lograron establecer un método para la propagación *in vitro* de la *Mammillaria bocasana*, una especie mexicana que se encuentra en el status de amenazada en su hábitat natural, utilizando aréolas espiníferas como explantes. Para la obtención de brotes a partir de callo el mejor tratamiento fue el medio Murashige & Skoog suplementado con 2 mg/l de Ácido 2,4 diclorofenoxyacético (2,4-D) y 1 mg/l de cinetina. Subcultivos posteriores en el mismo medio dieron origen a brotes y raíces. El promedio general de brotación fue de 7.5 por cada aréola espínifera.

Con el propósito de contribuir de manera importante a la conservación de los cactus, Pérez-Molphe, et al. en 1996 desarrollaron sistemas de cultivo de tejidos para la propagación masiva y conservación *in vitro* de 22 especies mexicanas de cactáceas, dentro de las cuales se incluyeron 6 especies de *Mammillaria*. Como explante se utilizó el segmento restante al cortarle la parte apical y basal a las plántulas o brotes obtenidos *in vitro*. Este segmento dividido longitudinalmente se inoculó en el medio basal de Murashige y Skoog suplementado con varias combinaciones y concentraciones de ANA y BAP.

Los resultados no fueron iguales para las 6 especies de *Mammillaria* evaluadas, es así que los mejores medios fueron: 1.0 mg/l de BAP, 1.0 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de ANA. Logrando establecer la micropropagación *in vitro* mediante la producción de brotes a partir de yemas axilares para todas las especies evaluadas y generar un banco de germoplasma *in vitro* de las mismas.

Otro trabajo sobre la propagación *in vitro* evaluando los reguladores del crecimiento ANA y BAP, fue el elaborado por Freeman, et al. en 1999 con *Mammillaria pectinifera* (Weber). Obteniendo la micropropagación tanto por organogénesis directa como indirecta.

En el 2002 Escobedo, et al. llevaron a cabo la propagación *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G.S. HINTON, obteniendo formación de brotes por organogénesis indirecta en los medios suplementados con 1mg/l y 3 mg/l de BAP y 1 mg/l de cinetina, aunque también se obtuvo regeneración de brotes por organogénesis directa en algunos casos a partir del apéndice del tubérculo.

Continuando con los estudios en cultivo de tejidos vegetales, dentro del trabajo realizado por Ramírez, et al. (2002) se evaluó la propagación *in vitro* de 6 especies de cactáceas, incluyendo una especie de *Mammillaria*. Se utilizaron los medios de Murashige & Skoog y Robert con la adición de ANA y BAP. Para *Mammillaria oscura* se obtuvieron en promedio 9.6 y 8.0 brotes por explante en los medios de Murashige y Skoog y Robert respectivamente, enriquecidos con 0.1 mg/l de ANA y 6 mg/l de BAP.

Los trabajos realizados ofrecen amplias perspectivas para el cultivo *in vitro* de cactáceas y los resultados obtenidos permiten vislumbrar aplicaciones de impacto para la propagación masiva de estas plantas y su rescate de la extinción, así como el uso racional de este recurso fitogenético (Rubluo, 1990).

3.4 Descripción de *Mammillaria woburnensis* Scheer, Lond. Journ. Bot. 4: 136. 1845.

Bas. *Cactus woburnensis* Kuntze, Rev. Gen. Pl. 1: 261, 1891.

Syn. *Mammillaria chapinensis* Eichlam et Quehl, Monats. Kakt. 19: 1, 1909.

Neomammillaria woburnensis (Scheer) Britt. et Rose, Cactaceae 4: 100, 1923.

Mammillaria chapinensis rubescens Hort. ex Schelle, Kakteen 336, 1926.

Planta terrestre o rupícola, al principio simple, formando pequeñas agrupaciones y posteriormente cespitosa; con ramificaciones basales o apicales. *Tallo* cilíndrico o globoso, de color verde oscuro, de 5 a 20 cm. de altura y de 3 a 8 cm de diámetro. Ápice redondeado y ligeramente hundido en el centro. Abundante látex blanquecino al arrancar un retoño. *Tubérculos* o mamilas triangulares, apretadamente dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, aprox. de 10 mm de altura y 8 mm de espesor en la base, de color verde oscuro con tinte rojizo hacia el ápice. *Axilas* con lana blanca persistente, casi cubriendo los tubérculos y con 4 a 10 cerdas algo tortuosas, blancas, de 4 a 10 mm de longitud. *Aréolas* ovaladas con lana blanca cuando jóvenes, después desnudas. Espinas diferenciadas en radiales y centrales: *espinas radiales* 5 a 9, de 4 a 7 mm de longitud, las 3 inferiores más largas que las superiores, rectas, hasta irregularmente recurvadas, aciculares, crema, con la punta castaño rojiza, horizontales. *Espinas centrales* 1 a 3, de 7 a 35 mm de longitud, rectas, aciculares, tiesas, cuando jóvenes de color café oscuro, después de color marfil con la punta castaño rojiza, erectas. *Flores* infundibuliformes, de 20 cm de longitud; segmentos exteriores del perianto linear-lanceolados, con el margen desde irregular hasta finamente ciliado, de color amarillo pálido hacia la base, arriba amarillo más oscuro, frecuentemente con tintes verdosos; segmentos interiores del perianto de 10 mm de longitud, con el ápice acuminado y el margen entero o ciliado, amarillentos ventralmente con una franja media rojiza o pardusca; filamentos blancos; anteras amarillo intenso; estilo blanco de 2 mm de espesor; lóbulos del estigma 5, amarillo verdosos, sobresaliendo de las anteras unos 2 mm. *Fruto* claviforme, de 25 mm de longitud, rojo hasta rojo carmín, conservando los restos secos del perianto. *Semillas* de 0.5 mm de longitud, castaño amarillentas (Standley y Williams, 1962; Britton and Rose, 1963; Bravo, 1991).

Standley y Williams (1962) localizan la especie entre los 200-1250 msnm. En los departamentos de El Progreso, Zacapa, Chiquimula, Jutiapa y Quiché. Paniagua (1980) la reporta en el departamento de El Progreso, municipio de San Agustín Acasaguastlán, abundante, entre los 700-800 msnm. En vegetación de matorrales xerofíticos, suelo pedregoso, sedimentario de textura franco-arcilloso. (ver figura 1)

Ejemplares de herbario examinados:

- *Mammillaria voburnensis* Kuntze. Colectada en la localidad de San Agustín Acasaguastlán, Departamento de El Progreso el 4 de mayo de 1991, a una altura entre 400 a 800 msnm en suelo pedregoso formando densas poblaciones, con número de campo 5, colectada por Mario R. Jolón y determinada por Mario Véliz. Herbario BIGUA, de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- *Mammillaria voburnensis* (Britt. Et Rose.) Reppenhagen var. *collinisi*. Colectada en el Municipio de San Miguel del Puerto, distrito Pochutla, Oxaca, México. 230 msnm. Colectores Silvia Salas y J. Castrejón R. Determinó Salvador Arias. MEXU. BIGUA.



Figura 1. Población de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
Agrupación cespitosa localizada en El Rancho, departamento de El Progreso.
(Foto: A. Ordóñez)

4. JUSTIFICACIÓN

Las cactáceas comúnmente conocidas como cactus, son componentes importantes de la comunidad vegetal de las zonas semiáridas, cumpliendo funciones de retención de agua y suelo, evitando de tal forma la desertificación de su hábitat natural. Gracias a su sistema radicular extendido superficialmente, a su adaptabilidad a los suelos más inhóspitos y a su resistencia a factores climáticos, las cactáceas resultan excelente medio para detener la erosión eólica y pluvial.

Las poblaciones de cactáceas que se encuentran en Guatemala han disminuido por el incremento en las diferentes condiciones de presión que ejerce el hombre sobre su hábitat natural, sin contar su lento crecimiento y dificultad de germinación en condiciones naturales.

Las cactáceas han adquirido popularidad a nivel mundial debido a su atractivo como plantas ornamentales, llamando la atención por su forma, variedad de sus espinas y la belleza de sus flores, aumentando así, su demanda en los últimos 15 años. Como consecuencia de este creciente interés, las poblaciones de las diferentes especies se han visto mermadas por la sobrecolecta en su hábitat y por el comercio ilegal que se ha producido; colocando a las cactáceas dentro de tratados y listados que establecen su preservación como especies raras, amenazadas y en peligro de extinción. Es así que se incluyen dentro de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y se declaran como especies endémicas en la Lista Roja de Flora Silvestre para Guatemala publicada por el CONAP.

Dentro de los diferentes géneros de la Familia Cactaceae que presentan mayor potencial en el ámbito productivo y comercial según la AGEXPRONT (2001) se encuentran *Opuntia* spp., *Zygocactus* spp., *Cephalocereus* spp. y *Mammillaria* spp. entre otros, lo que conduce también a que estos géneros se encuentran en peligro de extinción. Por lo cual, si se desea comercializar con ellos, se deben desarrollar tecnologías para su cultivo y propagación que no continúen destruyendo este recurso fitogenético y a la vez contribuyan a la preservación de las poblaciones silvestres del país.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* resulta una alternativa para la propagación de cactáceas, ya que es uno de los principales mecanismos que contribuyen a su conservación y promueve el interés ornamental por esta familia y su uso racional como actividad económica.

Debido a que en Guatemala se han desarrollado muy pocos trabajos de propagación *in vitro* de cactáceas, la presente investigación es un inicio y punto de partida para desarrollar y aplicar esta técnica en especies de cactus de nuestro país. Es por ello que se llevó a cabo la propagación *in vitro* de la *Mammillaria voburnensis* Scheer., una especie amenazada y con potencial ornamental, a través del cultivo de tejidos vegetales, como una herramienta para su conservación y una posibilidad para la recuperación de las plantas en su hábitat natural.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Establecer un procedimiento para la propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer., como una alternativa para su conservación.

5.2 Específicos

5.2.1 Determinar la respuesta morfogénica de los explantes de *Mammillaria voburnensis* Scheer. inoculados en el medio Murashige y Skoog suplementado con bencilaminopurina y ácido naftalenacético

5.2.2 Evaluar y establecer las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina y ácido naftalenacético para la formación de brotes *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer.

6. HIPÓTESIS

Al menos uno de los tratamientos utilizando bencilaminopurina y ácido naftalenacético, como reguladores del crecimiento, inducirá la formación de brotes en los explantes de *Mammillaria voburnensis* Scheer.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo

Las plántulas germinadas *in vitro* en el medio basal de Murashige y Skoog de *Mammillaria voburnensis* Scheer. que se mantuvieron en el cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del ICTA bajo condiciones ambientales controladas (intensidad lumínica de 1000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a una temperatura entre 23 ± 25 °C).

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos

Tesista: María Amparo Ordóñez Medina

Asesores: Licda. Haydée Paniagua y MSc. Domingo Amador

Colaboradores: Dr. Med. Vet. Hiram Ordóñez Chocano, MSc. Juan Vega Pérez, Fernando Paíz Leonardo y personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del ICTA.

7.2.2 Recursos Materiales

7.2.2.1 De campo

- tijeras de podar
- tenazas
- machete
- bolsas de plástico
- marcador permanente
- pala de jardinería
- bolsas de papel kraft
- libreta de campo
- lápiz

7.2.2.2 De laboratorio

- Reactivos para preparar el medio de cultivo Murashige y Skoog
- bencilaminopurina, BAP
- ácido naftalenacético, ANA
- Jabón líquido
- Etanol al 70%
- Tween 20
- Agua destilada estéril
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio al 2%
- Phytigel
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Estufa con agitador magnético
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Pinzas y bisturí
- Mechero
- Tubos de ensayo y tapones
- Beakers
- Pipetas
- Probetas
- Erlenmeyer
- Dispensador
- Cepillo

7.2.2.3 De oficina

- Hojas bond tamaño carta
- Computadora e impresora
- Lapicero y lápiz

7.3 Metodología

7.3.1 Fase I Obtención de plántulas *in vitro*

7.3.1.1 Reconocimiento del área y selección del material a estudiar

Se realizaron visitas de reconocimiento a una de las regiones semiáridas del país, al departamento de El Progreso (localidades de San Agustín Acasaguastlán y El Rancho), para ubicar la presencia de cactus del género *Mammillaria*. Se hicieron recorridos en territorios de propiedad privada y se colectó material vegetal de la especie más frecuente en el lugar para su posterior determinación.

7.3.1.2 Determinación de la especie y revisión de material de herbario

Se determinó que la especie colectada fue la *Mammillaria voburnensis* Scheer. con la cual se llevó a cabo la investigación. La determinación se hizo en el Herbario BIGUA de la Escuela de Biología con la ayuda del Ing. Mario Véliz y la Licda. Haydée Paniagua. Una vez determinada la especie se revisaron los ejemplares del Herbario BIGUA de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y se agregó a la descripción de la especie.

7.3.1.3 Colecta de frutos

Se hicieron recorridos en el área donde se ubicaron las poblaciones de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (El Rancho, departamento de El Progreso) y se colectaron frutos de diferentes plantas, para la germinación de semillas *in vitro*.

7.3.1.4 Obtención, desinfección y siembra de las semillas

Los frutos colectados se dejaron secar por algunas semanas en un lugar fresco, luego con ayuda de una pinza y de bisturí se cortaron longitudinalmente y se sacaron las semillas, aproximadamente 30 semillas por fruto. Las semillas se colocaron en un beacker, para realizar su desinfección superficial.

Desinfección de las semillas:

- Inmersión en etanol al 70% por 15 minutos
- Enjuague con agua destilada estéril
- Inmersión en hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos
- Enjuague con agua destilada estéril

En la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia se procedió a sembrar las semillas en los frascos de vidrio tipo Gerber que contenían 25 ml de medio Murashige y Skoog. (ver figura 2.) Con ayuda de una pinza se tomaron las semillas y se colocaron sobre el medio de cultivo, aproximadamente se sembraron de 20-25 semillas por frasco. Cada frasco se selló con Parafilm y se identificó con la fecha de siembra, nombre de la especie y medio de cultivo.

7.3.1.5 Condiciones de incubación

Los frascos con las semillas se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 23 ± 25 °C con una intensidad lumínica de 1000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 2. Siembra de semillas de *Mammillaria voburnensis* Scheer. *in vitro*. Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

7.3.1.6 Crecimiento del material vegetal

Luego de la germinación de las semillas, (ver figura 3.) las plántulas se dejaron en los frascos hasta que alcanzaron aproximadamente una altura de 0.5 cm y un diámetro de 0.2 cm con formación de raíz. Esto se logró a los dos meses luego de la siembra, tiempo en que se realizó la primera transferencia a otro medio Murashige y Skoog fresco contenido en tubos de ensayo de 25 por 150 mm, cada tubo con 10 ml de medio. La segunda transferencia se realizó a los siguientes 2 meses, de nuevo a un medio Murashige y Skoog fresco contenido en tubos de vidrio. Se colocaron de una a tres plántulas por tubo.



Figura 3. Germinación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
Aproximadamente a los 23 días luego de la siembra.
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

7.3.2 Fase II Inducción de brotes

7.3.2.1 Preparación de soluciones concentradas

Para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS), se prepararon primero cuatro soluciones concentradas (stock), que son las siguientes:

1. Solución de sales
2. Solución de $MgSO_4$
3. Solución de hierro
4. Solución de vitaminas

La forma de preparación así como las cantidades necesarias de cada reactivo se detallan en el Anexo No.1 (pág. 65).

7.3.2.2 Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog

Se prepararon 800 ml de medio Murashige y Skoog (MS). La preparación del medio de Murashige y Skoog se describe en el Anexo No. 2. (pág. 68). Este volumen se dividió en ocho porciones de 100 ml cada una. De esta forma se obtuvieron 100 ml de cada tratamiento con su respectiva concentración de bencilaminopurina y ácido naftalenacético. Se preparó también una solución de bencilaminopurina (BAP) y una de ácido naftalenacético (ANA) de concentración 1mg/1ml, las cuales se diluyeron para alcanzar las concentraciones deseadas.

7.3.2.3 Disección y siembra de los explantes

En la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia se procedió a obtener los explantes que se sembraron en los diferentes tratamientos. A las plántulas germinadas *in vitro* de seis meses de edad se les cortó la parte apical y basal junto con la raíz y al segmento restante se le hizo un corte longitudinal, obteniendo dos segmentos laterales de aproximadamente 0.5 cm de longitud, con areolas. (ver figura 4. pág. 39)

Los explantes se sembraron en los tubos de ensayo de 25 por 150 mm que contenían el medio de cultivo Murashige y Skoog con las diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA. La superficie cortada se colocó sobre el medio un poco sumergida, de tal manera que la areola no quedara hundida en éste. Los tubos tapados y sellados con Parafilm, se identificaron con nombre de la especie, el número de tratamiento, repetición y la fecha de siembra.



Figura 4. Explante lateral de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

7.3.2.4 Condiciones de Incubación

Los tubos se colocaron en las gradillas y se llevaron al cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas. Con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a una intensidad lumínica de 1000 lux a una temperatura 23 ± 25 °C. Una humedad relativa de 100%.

7.3.2.5 Crecimiento del material vegetal

Los explantes inoculados se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas durante dos meses para apreciar su respuesta morfogénica: formación de brotes, callo o raíz.

7.3.2.6 Descripción de la unidad experimental

La unidad experimental consistió un tubo de ensayo de 25 por 150 mm., en donde con el dispensador manual de medios se sirvió la cantidad de 10 ml de medio de cultivo y se inoculó el explante, segmento lateral de la plántula germinada *in vitro*.

7.3.2.7 Descripción de los tratamientos

Se evaluaron ocho medios de cultivo. El testigo, tratamiento ocho, sólo contenía el medio basal de Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento y los otros siete contenían diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA).

Cada tratamiento tenía 10 repeticiones.

La distribución de los tratamientos se hizo mediante un diseño completamente al azar.

Se prepararon los 8 tratamientos, como se indican en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Concentraciones y combinaciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) en los tratamientos

Tratamiento	BAP mg/l	ANA mg/l
1	0.1	---
2	1.0	---
3	2.0	1.0
4	0.1	0.01
5	1.0	0.01
6	1.0	1.0
7	6	0.1
8	---	---

Datos tomados:

- Respuesta morfogénica de los explantes, aparición de brotes, callo o raíz.
- Se anotó el tiempo en que iniciaron a aparecer los brotes en los explantes.
- Se contó el número de explantes con formación de brotes por tratamiento así como los explantes sin respuesta. Los tubos contaminados se eliminaron.
- Se anotó el número de brotes por explante de cada tratamiento.
- Se midió la longitud y diámetro en centímetros de los brotes por explante. Los explantes se sacaron del tubo para realizar el conteo y las mediciones, los brotes individuales se sembraron en medio fresco.

7.4 Modelo estadístico

Diseño Completamente al azar

Se evaluaron ocho tratamientos, cada uno con 10 repeticiones (por la disponibilidad de material vegetal *in vitro*).

Para obtener 80 unidades experimentales.

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde, Y_{ij} = porcentaje de explantes con brotes

μ = media general

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza.

Variable a medir: número de brotes por explante

Para determinar estadísticamente que tratamiento indujo la mayor formación de brotes se realizó un prueba post-ANDEVA de Prueba múltiple de medias de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 Fase I Obtención de plántulas *in vitro*

Las semillas de *Mammillaria voburnensis* Scheer. provenían de frutos colectados en el campo, éstos se desinfectaron superficialmente y luego se sembraron en el medio basal de cultivo Murashige y Skoog (MS) para su germinación y crecimiento. La desinfección llevada a cabo fue eficiente, ya que ningún frasco se contaminó. La germinación inició entre 20-25 días luego de la siembra y se obtuvo un 80% de germinación. Las plántulas a los seis meses de edad median aproximadamente 1 cm de altura y 0.5 cm de diámetro. (ver figura 5.) Éstas mostraron una variación normal en cuanto al tamaño, coloración y formación de raíz, debido seguramente al genotipo de las semillas, ya que estas provenían de diferentes plantas de campo.



Figura 5. Plántula de *Mammillaria voburnensis* Scheer. de seis meses de edad germinada *in vitro*. Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

8.2 Fase II Inducción de brotes

Para realizar el experimento se utilizaron plántulas de *Mammillaria voburnensis* Scheer. germinadas *in vitro* de seis meses de edad. Los explantes consistieron en segmentos laterales que poseían areolas, órganos característicos de las cactáceas que asemejan las yemas axilares de otras dicotiledóneas.

En el siguiente cuadro se muestra la respuesta morfogénica de los explantes obtenida a los 60 días luego de la inoculación de los explantes en el medio de Murashige y Skoog con las diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento, bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA). En ningún tratamiento se observó la formación de callo ni de raíz. El único tratamiento que no indujo la formación de brotes fue el testigo, que no poseía reguladores de crecimiento.

Cuadro 2. Respuesta morfogénica de los explantes a los 60 días de la inoculación

Tratamiento			Respuesta morfogénica		
No.	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)	Callo	Brote	Raíz
1	0.1	-	-	+	-
2	1	-	-	+	-
3	2	1	-	+	-
4	0.1	0.01	-	+	-
5	1	0.01	-	+	-
6	1	1	-	+	-
7	6	0.1	-	+	-
8	-	-	-	-	-

Para evaluar y establecer las concentraciones y combinaciones de bencilaminopurina y ácido naftalenacético, a fin de desarrollar un procedimiento para la propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. se realizó el conteo de brotes viables por tratamiento. Bajo condiciones de asepsia y con ayuda de pinzas, los brotes se sacaron del tubo de ensayo donde se habían mantenido *in vitro*, se separaron y se realizaron las observaciones y mediciones necesarias. Los brotes considerados como viables eran de forma semiesférica, de color verde con presencia de areolas y espinas, poseían de 0.3 a 0.4 cm de diámetro y al menos 0.4 cm de altura (ver figuras 6 y 7, pág. 46). Los brotes individuales se transfirieron a un medio fresco y se colocaron en el cuarto de crecimiento.

En el cuadro 3 se muestra el número de brotes viables por explante obtenidos en cada repetición a los 60 días de la inoculación.

Cuadro 3. Brotes viables por explante de *Mammillaria voburnensis* Scheer.

Tratamientos		Repeticiones									
No.	concentraciones y combinaciones	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	0.1 mg/l BAP	2		0	2	1	2	0	1	2	2
2	1 mg/l BAP	2	4	1	3	2	3	3	4	3	
3	2 mg/l BAP + 1mg/l ANA		0	2	3	3	1	0	0		
4	0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	13	13	11	9	12	10	12	11	9	10
5	1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	5	4	4	6	5	4	4	6	8	5
6	1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA	5		6	8	2	7	9	0	2	
7	6 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
8	Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Las casillas en blanco son las unidades experimentales contaminadas con hongos o bacterias que proliferaron en el medio de cultivo. Obteniéndose un 8% de contaminación.



Figura 6. Brotación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
En el medio suplementado con 0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)



Figura 7. Brote *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
En el medio suplementado con 1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos, se hizo un análisis de varianza para un diseño completamente al azar utilizando los datos del número de brotes por explante de *Mammillaria voburnensis* Scheer.

Cuadro 4. Análisis de Varianza para el número de brotes por explante

Fuentes de Variación	G L	S C	C M	F cal.	F tab.
Tratamientos	7	915	131	63.2	2.15
Error	65	134	2.07		
Total	72	1049			

El análisis de varianza determinó estadísticamente que sí existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados ($p < 0.05$). Con lo cual se concluye, que al menos uno de los medios utilizando bencilaminopurina y ácido naftalenacético, como reguladores del crecimiento, inducirá la formación de brotes en los explantes de *Mammillaria voburnensis* Scheer.

Establecido que sí hay variación entre tratamientos se procedió a realizar una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey, (Cuadro 5, pág. 48) para determinar qué tratamiento o tratamientos están causando esa variación, en cuanto a la inducción de brotes en el explante.

Cuadro 5. Prueba de Tukey

	Tratamientos	Promedio de brotes	Grupo	Grupo	Grupo
4	0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	11.00	A		
5	1 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	5.10		B	
6	1 mg/l BAP + 1 mg/l ANA	4.88		B	C
2	1 mg/l BAP	2.78		B	C
1	0.1 mg/l BAP	1.33		B	C
3	2 mg/l BAP + 1mg/l ANA	1.29		B	C
7	6 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA	0.20		B	C
8	Testigo	0.00			C

Con la Prueba de Tukey se estableció estadísticamente ($p < 0.05$) que el tratamiento cuatro que contenía 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA constituye el grupo A. Luego los seis tratamientos siguientes en orden descendente en cuanto a promedio de brotes son estadísticamente iguales y constituyen el grupo B. El grupo A es el que posee el promedio de brotes por explante más alto del total de medios evaluados.

9. DISCUSIÓN

Los explantes de *Mammillaria voburnensis* Scheer. consistieron en segmentos laterales de plántulas *in vitro*, los cuales se sembraron en los diferentes tratamientos incluyendo el testigo. A los siete días de la siembra los explantes inoculados en los medios que contenían reguladores de crecimiento se tornaron de un color rojizo-purpúreo. Tal pigmentación también fue reportada por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en explantes de *Mammillaria haageana*. Posiblemente esta coloración se debió a la producción de algunos pigmentos carotenoides y xantofilicos en respuesta a las heridas ocasionadas al tejido al realizar los cortes para obtener el explante, como mecanismo de cicatrización o en defensa al medio en que se inocularon. Muchas especies de cactus se tornan de este color en respuesta a un cambio de temperatura (Bravo, 1978); posiblemente la temperatura del cuarto de crecimiento no fue la adecuada para esta cactácea.

La aparición de brotes fue visible a los 22 días luego de la siembra, los brotes surgían en el ápice de la mamila, en el meristemo areolar vegetativo. Se diferenciaron brotes simples y múltiples, ya que varios explantes poseían de uno a cinco brotes por areola. Las cactáceas tienen una potente dominancia apical, debido a la auxina endógena producida en el meristemo apical; por lo que al eliminar el ápice de la plántula, ésta se ve disminuida o debilitada, lo que conduce a la activación de las yemas axilares, la activación de las areolas. Este efecto como lo menciona Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), se debe probablemente a un cambio en el balance hormonal interno de la planta que permite que las yemas latentes crezcan. En el tratamiento testigo no se observó inducción de brotes, debido seguramente a la ausencia de reguladores de crecimiento, demostrando que éstos juegan un papel importante en el desarrollo y morfogénesis de las plantas cultivadas *in vitro*.

Al mes de la inoculación de los explantes, se lograban diferenciar brotes en algunos de los tratamientos, éstos median aproximadamente 0.2 cm de diámetro y 0.2 cm de largo y se distinguían las areolas y espinas.

Estos brotes de color verde y de forma semiesférica definida se observaron únicamente en los medios suplementados con 0.1 mg/l de BAP y con 0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l de ANA, tratamiento uno y cuatro, respectivamente. (ver figura 8.) En el resto de tratamientos sólo se logró identificar una proliferación desordenada de brotes muy juntos, un conglomerado sin forma, de color verde a verde claro y con pigmentación rojo-purpúreo en la parte basal en contacto con el medio. En la anatomía interna se observó diferenciación celular; la epidermis con presencia de estomas, las células del parénquima con cloroplastos y células de tejido vascular que constituían el protoxilema.



Figura 8. Formación de brotes *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. a los 30 días en el medio suplementado con 0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l de ANA
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

Los explantes se mantuvieron por un mes más bajo las mismas condiciones ambientales, para determinar su respuesta morfogénica y tomar el número de brotes por tratamiento y establecer diferencias entre éstos.

Sin embargo, cuando se realizó en conteo de los brotes axilares también se notó la presencia de brotes con ciertas malformaciones, éstos eran amorfos y se rompían con suma facilidad. Su apariencia externa era normal, de color verde y presentaban areolas y espinas, pero su interior era bastante esponjoso, observándose espacios sin tejido. El desarrollo anómalo de estos brotes no se apreció en todos los tratamientos, lo que pudo deberse a la influencia de los reguladores de crecimiento, o bien ser consecuencia de hiperhidricidad de los tejidos; un desorden fisiológico que causa un cambio en el metabolismo que conduce a la alteración de la estructura y apariencia normal de los tejidos, que se observan como vítreos o acuosos (George, 1996). La hiperhidricidad ha sido reportada por Leonhardt y Kandeler (1987) y Pérez-Molphe (1996) en especies de cactáceas. Es probable que el rompimiento y deformación de los brotes se debiera a la hiperhidricidad de los tejidos y que esta condición permitiera la contaminación posterior, ya que se observó el desarrollo de un hongo en el tejido interno y no sobre el medio de cultivo como ocurre comúnmente en los brotes luego de ser transferidos.

El único tratamiento en donde no se observó la malformación de brotes sino únicamente brotes bien formados, fue en el número cuatro, que contenía 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA, las concentraciones más bajas de citocinina y de auxina evaluadas, por lo que puede existir cierta relación entre los reguladores de crecimiento y el desarrollo del hongo. En el medio suplementado con 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de ANA la formación de brotes viables fue casi nulo y en éste se mantuvo la formación de brotes muy juntos sin definir, observada desde el primer mes de la siembra, debido probablemente a la alta concentración de bencilaminopurina y a inicios de un proceso de hiperhidricidad de los tejidos.

A los dos meses, en todos los medios suplementados con los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) se observó la inducción de brotes axilares (ver cuadro No. 2, pág. 44.) aunque variaron en número según el tratamiento.

Los brotes medían entre 0.3-0.4 cm de diámetro y al menos 0.4 cm de altura, eran de color verde y de forma semiesférica. (ver figura 9.) Las espinas aún no se diferenciaban en centrales y radiales, eran traslúcidas y flexibles, ya que aún no estaban lignificadas. Éstas emergen de la punta de la mamila y se contaron entre 12-15 por areola, un número mayor al que se encuentran en una planta adulta. Lo que confirma que la espinación se transforma con la edad de la areola, ya sea por el desprendimiento de algunas espinas o por un cambio en su arreglo debido a la presión ejercida por el engrosamiento y endurecimiento de los tejidos adyacentes (Bravo, 1978).



Figura 9. Brotación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. a los 60 días en el medio suplementado con 0.1 mg/l BAP + 0.01 mg/l de ANA
Aumento: 6.6 x (Foto: A. Ordóñez)

Los brotes eran consistentes y bien desarrollados, ya que al hacer cortes histológicos se distinguió el sistema dérmico formado por células epidérmicas sin pigmentación, de paredes delgadas y con núcleo diferenciado; el aparato estomático formado por dos células oclusivas de forma arriñonada con cloroplastos bien definidos y rodeadas por las células subsidiarias. Como parte del sistema fundamental se diferenciaron células parenquimatosas con cloroplastos y gránulos de almidón, ya que la prueba fue positiva para el almidón al agregar el reactivo histoquímico del lugol. Como sistema vascular sólo se diferenciaron vasos de pared secundaria poco desarrollada con deposiciones de lignina en forma anular y helicoidal, que constituyen el protoxilema. En un corte de areola se pudo identificar la región meristemática, con pocas células pequeñas de forma rectangular, con pared delgada y sin espacios intercelulares.

Los resultados de brotes viables por explante sugirieron que los requerimientos de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes axilares en *Mammillaria voburnensis* Scheer. sean la combinación de una citocinina (bencilaminopurina) y una auxina (ácido naftalenacético), como lo menciona Rubluo (1990); pero en bajas concentraciones, ya que al utilizar concentraciones elevadas, como en los tratamiento tres y siete la respuesta no fue satisfactoria tanto cuantitativa como cualitativamente. En ambos tratamientos el promedio de brotes por explante fue bajo o nulo y se observó una proliferación desordenada y con pigmentación rojo-purpúreo notoria. El análisis estadístico demostró que sí existe diferencia significativa en cuanto al número de brotes por explante entre los medios evaluados ($p < 0.05$), y que el tratamiento cuatro (0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA) constituye el mejor, ya que fue el que indujo el mayor número de brotes por explante; brotes cualitativamente viables.

Como indica Hubstenberger et al. (1992) investigaciones recientes en cactáceas confirman que la fuente de auxinas y citocininas necesaria para la producción óptima de brotes axilares interactúa fuertemente con especies, sin embargo en el presente trabajo se utilizaron combinaciones de bencilaminopurina y ácido naftalenacético que habían inducido brotación en otras especies de *Mammillaria*, pero que al evaluarse en *Mammillaria voburnensis* Scheer. no dieron los mismos resultados.

Esto coincide con Johnson y Emino (1979) y otros autores que al realizar varios estudios con diferentes especies de *Mammillaria* han sugerido que cada especie requiere de una concentración específica y crítica de citocinina-auxina para resultados definidos.

El medio de Murashige y Skoog suplementado con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, evaluado por Vyskot y Jára (1984), fue con el cual alcanzaron la mejor estimulación de brotes axilares en explantes de *Mammillaria carmenae*, mientras que en *Mammillaria voburnensis* Scheer. con las mismas concentraciones, el promedio de brotación fue uno de los más bajos.

Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) lograron la propagación masiva de la casi extinta *Mammillaria san-angelensis*, para lo cual realizaron experimentos previos con la especie relacionada *Mammillaria haageana*, obteniendo resultados similares. La regeneración masiva de *Mammillaria san-angelensis* fue más exitosa utilizando explantes laterales inoculados en un medio Murashige y Skoog suplementado con BAP y ANA en diferentes concentraciones, razón por la cual también se utilizaron segmentos laterales de plántulas *in vitro* para la propagación de *Mammillaria voburnensis* Scheer. A los cuatro meses lograron la formación de 21-35 brotes por explante en los medios suplementados con 0.1 mg/l de BAP, 1 mg/l de BAP y 1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA, en este último con formación de raíz. En los medios que contenían 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA y 1mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA los brotes se produjeron en menor número, de 13-20 por explante. En el presente estudio utilizando estas mismas concentraciones en *Mammillaria voburnensis* Scheer.; a los dos meses los resultados variaron, ya el mejor tratamiento que indujo un promedio de 11 brotes por explante fue el que contenían 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA, luego el que contenía 1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA, con cinco brotes por explante, pero sin formación de raíz y el que contenía 1mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA indujo un promedio de 4 brotes por explante. En los tratamientos que sólo contenían bencilaminopurina la formación de brotes viables fue muy poca comparado a lo alcanzado en *Mammillaria san-angelensis*. A pesar que algunos tratamientos contenían la auxina, ANA, en ninguno se observó formación de callo ni de raíces.

Vyskot y Jára (1989) junto con otros autores han destacado que tanto el efecto de la bencilaminopurina (BAP) como su acción combinada con el ácido naftalenacético (ANA) ha sido exitosa en la regeneración de plantas en miembros de la familia Cactaceae. Otros trabajos que sustentan lo anterior son la propagación *in vitro* de *Mammillaria pectinifera* por Freeman et al. en el 2002 y Martínez-Mondragón et al. (2002) con la reproducción *in vitro* de 15 miembros de la familia de Cactaceae entre ellas cinco especies de *Mammillaria* empleando el medio de Murashige y Skoog suplementado BAP y ANA.

Para el caso específico de *Mammillaria voburnensis*, la combinación de ambos reguladores de crecimiento dio mejores resultados, que la acción sólo de BAP. De igual forma para *Mammillaria formosa* y *Mammillaria oscura* la combinación de 1 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de ANA fue satisfactoria. Sin embargo, para otras especies de *Mammillaria* como *Mammillaria candida*, *Mammillaria craigii* y *Mammillaria uncinata* el medio de Murashige y Skoog suplementado sólo con 1 mg/l de BAP resultó eficiente en la inducción de brotes. Mientras que en *Mammillaria sphaelata* la producción de brotes se alcanzó ya sea, únicamente con 1 mg/l de BAP o en combinación de 0.01 mg/l de ANA (Pérez-Molphe et al., 1996).

El tratamiento siete, suplementado con 6 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de ANA, resultó prometedor al producir 9.6 brotes promedio por explante en *Mammillaria oscura* (Ramírez et al., 2002), pero en explantes de *Mammillaria voburnensis* Scheer. la respuesta fue totalmente diferente. En este tratamiento fue donde se obtuvo el menor número de brotes por explante, lo que indica que a pesar de la combinación de bencilaminopurina y ácido naftalenacético, la concentración de éstos juega un papel importante en la inducción de brotes.

Para la inducción de brotes axilares de *Mammillaria voburnensis* Scheer. los mejores tratamientos según el número promedio de brotes por explante fueron los que combinaban los dos reguladores de crecimiento, la citocinina, bencilaminopurina, en mayor proporción que la auxina, ácido naftalenacético, ya que al carecer de auxina la formación de brotes fue baja.

Estos resultados pueden indicar que la *Mammillaria voburnensis* Scheer. requiere una combinación y concentración específica de bencilaminopurina y ácido naftalenacético para la formación de brotes axilares; siendo en este trabajo el mejor medio el Murashige y Skoog suplementado con 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA. Una concentración moderada de la citocinina y una concentración baja de la auxina, lo que permitió el desarrollo de una buena cantidad de brotes axilares viables por explante a los dos meses de la siembra, utilizando como explantes segmentos laterales de plántulas germinadas *in vitro*.

La formación de brotes *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. sirve como fundamento preliminar en la propagación *in vitro* de este especie amenazada y de base para posteriores investigaciones de otras cactáceas, ya que es primera vez que se lleva a cabo el cultivo de tejidos vegetales como parte de la biotecnología, para la conservación de miembros de la Familia Cactaceae en Guatemala.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Las semillas de frutos maduros de *Mammillaria voburnensis* Scheer. colectados en el campo se mantienen viables para el cultivo de tejidos, ya que en la presente investigación se obtuvo un porcentaje de germinación del 80% de las semillas.
- 10.2 La inducción de los brotes simples y múltiples se apreció a los 22 días luego de la siembra de los explantes.
- 10.3 Al mes de la inoculación se observó la formación de brotes semiesféricos de color verde únicamente en los tratamientos suplementados con 0.1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA. En el resto de tratamientos se observó una proliferación desordenada, a pesar de la diferenciación celular existente.
- 10.4 La respuesta morfogénica de los explantes a los 60 días de la siembra en los medios que contenían reguladores de crecimiento, fue la formación de brotes axilares, que variaron cuantitativamente entre los tratamientos.
- 10.5 La formación de brotes amorfos y poco consistentes a los 60 días de la inoculación del explante, pudo deberse a la influencia de los reguladores de crecimiento en combinación con la hiperhidricidad de los tejidos; condición que aprovechara el hongo para su desarrollo.
- 10.6 Para lograr la inducción de brotes en *Mammillaria voburnensis* Scheer. se requiere de una combinación específica de bencilaminopurina y ácido naftalenacético en concentraciones bajas.
- 10.7 Se estableció que el medio Murashige y Skoog suplementado con 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA es el adecuado para la propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer., induciendo un promedio de 11 brotes viables por explante a los 60 días.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Utilizar el medio de Murashige y Skoog suplementado con 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA para la propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer.
- 11.2 Profundizar acerca de la causa de la malformación de los brotes, ya sea debido a la hiperhidricidad o como consecuencia de los reguladores del crecimiento utilizados.
- 11.3 Continuar con la etapa de crecimiento *in vitro* de los brotes, trasplantándolos al medio de Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento y probar diferentes diluciones ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{3}$ MS y $\frac{1}{4}$ MS) para aumentar el tamaño de los brotes y lograr la formación de raíz antes de la aclimatación.
- 11.4 Realizar otros estudios con diferentes reguladores de crecimiento, cinetina o 2-ip como citocininas y ácido indolbutírico como auxina para evaluar la formación de brotes cualitativa y cuantitativamente.
- 11.5 Implementar en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, para fomentar la investigación de especies en peligro de extinción así como de importancia ecológica.

12. REFERENCIAS

1. AMADOR, D. 1999. Curso de Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. (Programa de Estudios de Maestría en Biotecnología de plantas).
2. _____. 2001. Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. 32 p. (Manejo y mejoramiento de plantas).
3. AGEXPRONT. 2001. Primer Encuentro Nacional de la Diversificación Agrícola. Asociación de Exportadores de Productos No Tradicionales-AGEXPRONT Capítulos Nuevos, productos agrícolas con potencial hacia los mercados. Categoría B: Cactáceas. Guatemala. pp. 258-272.
4. BALLESTER OLMOS, J.F. 1978. Los cactus y otras suculentas. España Floraprint. 142 p.
5. BRAVO-HOLLIS, Helia. 1978. Las Cactáceas de México. Segunda Edición. México. Universidad Autónoma de México, UNAM. Dirección General de Publicaciones. Vol. 1. 743 p.
6. _____ y SÁNCHEZ-MEJORADA, H. 1991. Las Cactáceas de México. México. Universidad Autónoma de México, UNAM. Dirección General de Publicaciones. Vol. 3.
7. _____ y SCHEINVAR, Léia. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. México. Fondo de Cultura Económica. 233 p.

8. BRITTON, N.L. and ROSE, J.N.1963. The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the Cactus Family. E.E.U.U. Dover Publications. Vo. I. pp. 100.
9. CASTAÑEDA, C. y VARGAS, H.A. 1996. Vida en la zona semiárida de Guatemala. Guatemala. Cuadernos Chac. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. 36 p.
10. CONABIO. 1997. Suculentas Mexicanas. Cactáceas. México. CVS Publicaciones S.A. 143 p.
11. CONSEJO NACIONAL DE ÁREAS PROTEGIDAS. 2002. Lista Roja de Especies De Flora. Guatemala. Diario De Centro América, No. 27. pp. 5-12.
12. ESCOBEDO, L. et al. 2002. Propagación in vitro de *Mammillaria luethy* G.S.HINTON. Memorias del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y otras plantas suculentas. México. pp. 69-70.
13. FREEMAN, R. et al. 1999. Propagación in vitro de *Mammillaria pectinifera* (Weber). Memorias del II Congreso Mexicano y I Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y otras plantas suculentas. México. pp. 42.
14. GEORGE, E.F. 1993-1996. Planta Propagation by Tissue Culture. Part 2. In Practice. Second Edition. England. Exegetics Limited. pp. 903-908.
15. HECHT, H. 1998. Kakteen und andere Sukkulenten. Germany. BLV Verlagsgessellschaft. pp. 5-7.
16. HUBSTENBERGER, J.F. et al. 1992. Micropropagation of Cacti. (Cactaceae) In: Bajaj, Y.P.S. Biotechnology in Agryculture and Forestry. Germany. Springer Verlag. pp. 49-68.

17. JOHNSON, J.L. & EMINO, E.R. 1979. *In-vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. HortScience. E.E.U.U. 14 (5): 605-606.
18. MARTINEZ-VAZQUEZ, O. & RUBLUO, A. 1989. *In-vitro* mass propagation of the near-extint *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. Journal of Horticultural Science. E.E.U.U. 64 (1): 99-105.
19. MARTÍNEZ, N. et al. 2002. La multiplicación *in vitro* como herramienta viable en la reproducción de cactáceas. Memorias del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y otras plantas suculentas. México. pp. 114-115.
20. NAVA-ESPARZA, L. y YÁNEZ, L. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante Cultivo de Tejidos. Órgano de la Sociedad Mexicana de Cactología, AC. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XXIX. México. no. 1: 3-7.
21. ORDÓÑEZ CHOCANO, H. y FRANCO, E. 1999. Áreas y Líneas de Investigación en Biotecnología. Guatemala. CONCYT-FONACYT. 19 p.
22. ORTIZ-MONTIEL, J.G. y ALCÁNTARA, G.R. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). Órgano de la Sociedad Mexicana de Cactología, AC. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XLII. México. no. 1: 3-6.
23. PANIAGUA, G. H. 1980. Contribución al estudio de las cactáceas del departamento de El Progreso, Guatemala. Guatemala. 146 p. Tesis de Licenciada en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología.

24. PÉREZ, J.C. et al. 1999. Reproducción *in vitro* del “Cactus de Navidad” *Schlumberga truncata* (Haworth) Moran. Órgano de la Sociedad Mexicana de Cactología, AC. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XLIV. México. 44(3): 79-83.
25. PÉREZ, J.J. y VEGA, J.P. 2002. Taller de propagación de Cactáceas y Suculentas. Memorias del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y otras plantas suculentas. México. pp. 3-12.
26. PÉREZ-MOLPHE, E. et al. 1996. Propagación y Conservación *in vitro* de 22 especies mexicanas de cactáceas. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología. ANAF. México. pp. 55.
27. RAMÍREZ, R. et al. 2002. Propagación *in vitro* de seis especies de cactáceas con diversas concentraciones de dos reguladores del crecimiento. Memorias del III Congreso Mexicano y II Latinoamericano y del Caribe sobre Cactáceas y otras plantas suculentas. México. pp. 78.
28. RÍHA, J. y SUBIK, R. 1991. Enciclopedia de los Cactus. Checoslovaquia. SUSAETA. Spektrum, Brno. 350 p.
29. ROCA, W.M. y MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Colombia. Centro internacional de Agricultura. Tropical. CIAT. 969 p.
30. RODRÍGUEZ, L. y APEZTEGUÍA, R. 1985. Cactus y otras suculentas de Cuba. La Habana, Cuba. Editorial Científico-Técnica. 213 p.
31. ROSELL, C.H. y VILLALOBOS, V.M. 1990. Fundamento teórico-prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 113 p.

32. RUBLUO, A. 1990. Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de cactáceas en peligro de extinción. BIOTAM. México. 1(3): 13-19.
33. _____. et al. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in-vitro* culture. Biological Conservation. Great Britain. 63:163-169.
34. SILOS-ESPINOS, H. et al. 1995. Obtención de brotes *in vitro* de *Mammillaria bocasana* con 2,4-D y Kinetina. Memorias del II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. ANAF. Asociación Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal, A.C. México. pp. 56.
35. STANDLEY, P.C. y WILLIAMS, J. 1962. Flora of Guatemala. Fieldana Botany Chicago Natural History Museum. Vol. 24, parte VII, No. 2. pp. 187-233.
36. USUI, K. et al. 1996. Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala. ICTA- JOVC. 116 p.
37. VILLAR, L. 1998. La Flora Silvestre de Guatemala. Guatemala. Edit. Universitaria. Vol. No. 6. (Colección Manuales). 59 p.
38. VILLAVICENCIO, E. et al. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. Órgano de la Sociedad Mexicana de Cactología, AC. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XLIV. México. 44(2): 49-57.
39. VISKOT, B. & JÁRA, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in-vitro*. Journal of Horticultural Science. E.E.U.U. 59 (3): 449-452.

INTERNET

1. WATTS, G. M. 2000. Proyecto de Propagación de Plantas. Aspectos Importantes sobre la Propagación de Plantas de la familia CACTACEAE (Incluyendo Aplicación de Biotecnología). Disponible en www.geocites.com/nakariweb/cursos.hyml

13. ANEXOS

Anexo No.1

Preparación de las cuatro soluciones stock del medio de cultivo de Murashige y Skoog

1. Solución de sales [10 x]

- Colocar un balón aforado de 2 litros, lavado con agua destilada sobre una estufa con agitación magnética y agregar 300 ml de agua destilada.
- Disolver independientemente cada uno de los pesos de las siguientes sales:

NH ₄ NO ₃	35	g
KNO ₃	40	g
CaCl ₂ . H ₂ O	9	g
KH ₂ PO ₄	3.5	g
H ₃ BO ₃	0.1	g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.5	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2	g
KI	0.02	g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.005	g
CuSO ₄ .5H ₂ O + CoCl ₂ .6H ₂ O	1 ml.	

Para preparar la solución de Cu SO₄.5H₂O + CoCl₂ .6H₂O disolver las siguientes cantidades en 50 ml de agua destilada.

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 g

Guardar esta solución en un recipiente plástico (tubo falcon) y refrigerarlo a 4 °C.

- Luego de agregar cada reactivo lavar el recipiente con agua destilada y agregar esta al balón aforado donde se están disolviendo dichos reactivos para evitar que queden químicos remanentes en los recipientes.
- Aforar la solución de sales a 2 litros.
- Etiquetar la solución colocando su nombre, fecha de preparación, medio de cultivo en que será utilizado y concentración.
- Guardar la solución en un recipiente plástico y refrigerarlo a 4 °C.

- Guardar la solución en un recipiente plástico y coloque en el refrigerador a 4 °C.
- Envolver el recipiente con papel aluminio o poner en recipiente oscuro para que no le de la luz, ya que esta lo descompone.

4. Solución de vitaminas [100 x]

- Colocar un balón aforado de 500 ml, lavado con agua destilada, sobre la estufa con agitación magnética y agregar 100 ml de agua destilada.

- Pesar los siguientes reactivos y disolver separadamente:

Tiamina.HCl	0.020 g
Glycina	0.100 g
Ácido nicotínico	0.025 g
Piridoxina.HCl	0.025 g

- Luego de agregar cada reactivo lavar el recipiente con agua destilada y agregar ésta al balón aforado donde se están disolviendo dichos reactivos para evitar que queden químicos remanentes en los recipientes.
- Aforar la solución a 500 ml.
- Servir la solución en viales previamente lavados con agua destilada, agregando 10 ml a cada uno.
- Etiquetar cada uno de los viales colocando su nombre, fecha de preparación, medio de cultivo en que será utilizado y concentración.
- Guardar los recipientes en el congelador a 0 °C.

Anexo No. 2

Preparación de un litro del medio basal de Murashige y Skoog (1962)

- Colocar un matraz de erlenmeyer de 1 litro, lavado con agua destilada, sobre la estufa con agitación magnética y agregar 400 ml de agua destilada.
- Medir y pesar las siguientes soluciones Stock y reactivos, para preparar un litro de medio:

Sales	100 ml
MgSO ₄	10 ml
Hierro	10 ml
Vitaminas	10 ml
Inositol	0.1 g

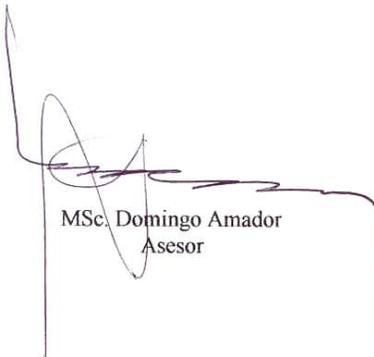
- Agregar 30 g de sacarosa
- Ajustar el pH entre 5.7 y 5.8, con el potenciómetro, agregando solución de HCl 1 N, o NaOH 1 N, según sea necesario reducir o aumentar la acidez, con cada gota de las soluciones reguladoras, se agitará mediante una estufa con agitador magnético.
- Agregar 2 g de Phytigel y dejar hervir la solución hasta que disuelva completamente.
- Servir en tubos de cultivo de 25 por 150 mm., con el dispensador manual de medios la cantidad de 10 ml a cada tubo.
- Tapar los tubos y colocarlos en canastas de metal en el autoclave durante 20 minutos 121°C para su esterilización.
- Colocar los tubos en la cámara de flujo laminar donde se utilizarán para la siembra de los explantes



María Amparo Ordóñez Medina
Autora



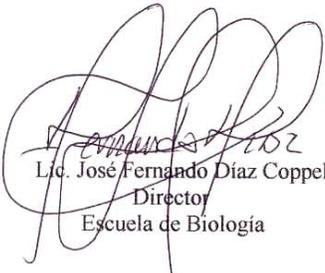
Licda. Haydée Paniagua de Díaz
Asesora



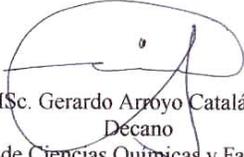
MSc. Domingo Amador
Asesor



Lic. Carlos Salazar
Revisor



Lic. José Fernando Díaz Coppel
Director
Escuela de Biología



MSc. Gerardo Arroyo Catalán
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia