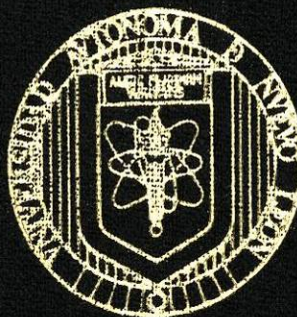


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



TECNICAS DE DESINFESTACION Y
MICROPROPAGACION DE Astrophytum capricorne.
(Dietrich).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

MARIN, N. L.

ENERO 1993.

T

SB31

.C2

O3

C.1



1080062244

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



TECNICAS DE DESINFESTACION Y
MICROPROPAGACION DE Astrophytum capricorne.
PARA OBTENER (Dietrich).

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

Ph. D. ENRIQUE OLIVARES SAENZ
ASESOR

M. G. RAFAEL P. SALAZAR S.
ASESOR

MARIN, N. L.

ENERO 1993,

011392E

T
SB317
• C 2
03

040.583
FA1
993
C.5



Biblioteca Central
Magna Solidaridad

F. tesis



BU Raúl Rangel Fries
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA

" TESIS "

TECNICAS DE DESINFESTACION Y MICROPROPAGACION DE
Astrophytum capricorne. (Dietrich).

ELABORADA POR:

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS


ACEPTADA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA


COMITE SUPERVISOR DE TESIS



Dra. ELIZABETH CARDENAS CERDA
DIRECTOR



Ph. D. EMILIO OLIVARES SAENZ
ASESOR



M. C. RAUL P. SALAZAR S.
ASESOR

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sr. Juan Isaías Ojeda Lázaro. †
Sra. Margarita Zacarías de Ojeda.

Gracias por darme la vida y gracias por todo el apoyo, amor y comprensión que me han dado, mil gracias padre, en donde quiera que te encuentres.

A mis hermanos:

Lety
Manuel
Isaías
Lupita
Margarita
Mary
Juanito

Gracias por todo el apoyo que siempre me han brindado principalmente Lety. Gracias por todos los momentos que hemos compartido y que siempre sigamos unidos como hasta ahora.

Al Ing. Julián Robles Hernández por su apoyo y ayuda en el desarrollo de mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda por su asesoría y colaboración en la realización de éste experimento.

Al Ph.D. Emilio Olivares Sáenz por la ayuda brindada en la interpretación de los resultados.

Al M.C. Raúl Salazar Sáenz por su colaboración en el desarrollo del trabajo experimental.

A todas mis amigas por los momentos que compartimos y a Leobardo por su ayuda en la realización del trabajo.

A la Srita. Verónica Belmares por su ayuda en la impresión de este trabajo.

INDICE

	Pág.
Indice de Cuadros, Ilustraciones y Figuras.	I, II
RESUMEN.	III, IV
I.- INTRODUCCION.	1
II.- REVISION DE LITERATURA.	2
2.1 Generalidades de las cactáceas.	2
2.2 Clasificación de la especie.	4
2.3 Descripción de la especie.	4
2.4 Importancia del cultivo de tejidos vegeta- les.	5
2.5 Importancia del cultivo de tejidos vegeta- les en cactáceas.....	7
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> en cactáceas.....	10
III.- MATERIALES Y METODOS.	16
3.1 Localización.	16
3.2 Técnicas de desinfestación.	19
3.3 Etapa de inducción.	22
3.3.1 Medio de cultivo.	22
3.3.1.1 Preparación de Soluciones concentradas.	23
3.3.1.2 Elaboración del medio de cul- tivo.	25
3.3.2 Medio de inducción.	25
3.4 Etapa de proliferación de brotes.	26

3.4.1 Medios de cultivo para la <u>prolifera</u> ción de brotes.	26
3.5 Etapa de enraizamiento.	29
3.5.1 Medios de enraizamiento.	29
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.	30
4.1 Técnicas de desinfestación.	30
4.2 Etapa de inducción.	33
4.3 Etapa de proliferación de brotes.	35
4.4 Etapa de enraizamiento.	42
V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	44
5.1 Conclusiones.	44
5.2 Recomendaciones.	44
VI.-BIBLIOGRAFIA.	46

Indice de Cuadros, Ilustraciones y Figuras

Cuadros.	Pág.
1.- Materiales, equipo e instrumental utilizado en el experimento. Técnicas de desinfestación y micropropagación de <i>Astrophytum capricorne</i>	18,19
2.- Porcentaje de contaminación de semillas de <i>Astrophytum capricorne</i> sometidos a diversos agentes desinfestantes.	30
3.- Análisis de varianza para la variable porcentaje de contaminación en el experimento. Técnicas de desinfestación y micropropagación de <i>Astrophytum capricorne</i>	31
4.- Comparación de medias para el factor A (Agentes desinfestantes) en la variable porcentaje de contaminación.	31
5.- Número de brotes obtenidos a partir de los medios de proliferación a las 12 semanas de la siembra.	35
6.- Análisis de varianza para la variable número de brotes de <i>Astrophytum capricorne</i> a las 12 semanas a partir de la siembra.	36
7.- Comparación de medias para la variable número de brotes de <i>Astrophytum capricorne</i>	36

8.- Número de brotes de <i>Astrophytum capricorne</i> obtenidos a las 12 semanas de la siembra del medio con 2 citocininas utilizando brotes provenientes de la primera evaluación.	40
9.- Análisis de varianza para la variable número de brotes de la segunda evaluación en el experimento Técnicas de desinfestación y micropropagación de <i>Astrophytum capricorne</i>	41

Ilustraciones.

1.- Crecimiento de callo de <i>Astrophytum capricorne</i>	34
2.- Proliferación de brotes de <i>Astrophytum capricorne</i> en el medio con dos citocininas.	39

Figura.

1.- Numero de brotes de <i>Astrophytum capricorne</i> obtenidos apartir de los medios de proliferación a las doce semanas de la siembra.	37
---	----

RESUMEN

Los cactus requieren métodos alternativos de propagación puesto que en condiciones naturales son de crecimiento lento. En los últimos años el cultivo *in vitro* se ha reconocido como una herramienta muy útil para la propagación de cactáceas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la técnica de desinfestación más adecuada para el establecimiento aséptico de semillas de *Astrophytum capricorne*, así como la determinación del medio de cultivo más adecuado para la proliferación de brotes *in vitro* de esta especie.

Los tratamientos de desinfestación a los que fueron sometidas las semillas fueron: NaOCl al 20% v/v, por 10 minutos, HgCl₂ al 0.1% por 5 minutos, H₂O₂ al 20% v/v por 5 minutos y H₂O (bidestilada) por 10 minutos. Estos agentes desinfestantes fueron comparados con y sin vacío.

El análisis de varianza mostró que el mejor tratamiento de desinfestación para las semillas de *Astrophytum capricorne* fue el NaOCl (0.2%) con y sin vacío.

Con respecto a la micropropagación, se utilizaron varios medios de cultivo para las diversas fases de esta técnica, para

la etapa de inducción se utilizó el medio MS adicionado con NaH_2PO_4 170 mg l^{-1} , BAP 3.0 mg l^{-1} , NAA 1.0 mg l^{-1} , 30 g l^{-1} sacarosa y agar-gel al 5% 5 g l^{-1} . Este medio se consideró efectivo para esta etapa ya que se presentaron brotes apicales en éste medio a las dos semanas de la siembra del inóculo.

En la etapa de proliferación de brotes se procedió a utilizar dos medios de cultivo : con 1 citocinina (BAP) y con 2 citocininas (BAP y cinetina). Obteniéndose diferencia significativa para la variable número de brotes. El medio con las dos citocininas después de 12 semanas de sembrado el inóculo resultó con un mayor número de brotes.

Los brotes obtenidos a partir del medio de proliferación 2 citocininas fueron sometidos a diversos tratamientos para la etapa de enraizamiento; los tratamientos consistieron en utilizar el medio básico MS sin reguladores de crecimiento en su concentración original así como al 50% de su concentración y por último el medio MS adicionado con 1.0 mg l^{-1} IBA, 30 g l^{-1} sacarosa y 5.0 g l^{-1} de agar-gel.

Los tratamientos no mostraron ser efectivos para la etapa de enraizamiento a las 12 semanas de la siembra.

INTRODUCCION

La familia cactáceae es una de las más saqueadas y destruidas en México, debido a las colectas exhaustivas de que han sido objeto.

Los cactus tradicionalmente son propagados a partir de semillas o cortes, en estos casos las plántulas tienden a ser de lento crecimiento y susceptibles a pudriciones. En contraste, el desarrollo de brotes, *in vitro* puede ser muy rápido, comparados con las plántulas obtenidas por métodos tradicionales.

Aunque la conservación del habitat será siempre lo más crítico en el mantenimiento del máximo nivel de diversidad vegetal, las técnicas *in vitro* pueden proveer métodos alternativos para propagar y conservar tejidos de plantas amenazadas o en peligro de extinción (Pence 1991). A esta categoría pertenece *Astrophytum capricorne* la cual es una especie que se encuentra incluida en la lista de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción (Vovides, 1981).

Por lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron determinar la técnica de desinfestación más adecuada para el establecimiento aséptico de *Astrophytum capricorne*. Así como el medio de cultivo más adecuado para la micropropagación de *Astrophytum capricorne*.

REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las Cactáceas

Las cactáceas, son autóctonas del continente Americano en donde se encuentran distribuidas la mayor cantidad de especies. Para conocerlas es necesario recorrer los escenarios en que crecen; así se podrán apreciar, por ejemplo, las fantásticas asociaciones de los gigantescos órganos, candelabros, tataches y saguaros, la gran variedad de nopales y pitayos, las grandes biznagas de magníficas flores y los legendarios peyotes que, por sus extrañas formas más parecen piedras que vegetales.

Si estas plantas sorprenden por las formas extraordinarias de sus tallos y hermosura de sus flores, interesan también por la anatomía de sus estructuras y las modalidades de su fisiología, indicadora ambas de su admirable adaptación a la sequía.

Estas han jugado un papel muy importante en la formación y culturización de grupos étnicos. En la actualidad siguen estando presentes en las actividades de comunidades aisladas, rurales y suburbanas; se encuentran en parte de su alimentación (nopales, tunas, biznagas, etc.), además de utilizarse como forraje, remedios caseros, combustibles y elementos de construcción, por ejemplo el cercado de sus viviendas. Por otra

parte, se han caracterizado diversos compuestos químicos entre los cuales están algunos muy importantes como los carbohidratos, almidón, celulosa, ceras, aceites, resinas, látex, vitaminas y alcaloides . Siendo estos últimos de gran beneficio en los tratamientos de ciertas dolencias cardíacas.

México, por sus condiciones de latitud, topografía y clima, es el país que alberga posiblemente, la mayor cantidad de especies de cactáceas (Bravo - Hollis 1989).

Indudablemente, México es un punto de máximo interés para la adquisición de ejemplares silvestres. Nuestro país contiene una flora cactológica muy rica: 66 géneros y alrededor de 734 especies; de éstas, 687 son endémicas, es decir únicas del territorio nacional.

La anterior condición ha provocado el continuo saqueo y contrabando de este recurso natural, a pesar del decreto presidencial de 1940, que prohíbe la colecta de especies silvestres con fines comerciales.

Este saqueo, aunado a la drástica destrucción del habitat, son las dos principales razones por los cuales 30 especies de cactáceas mexicanas se encuentran en inminente peligro de extinción; y muchas otras están amenazadas. Por lo tanto es

necesario encontrar métodos alternativos para su propagación y mantenimiento (Sánchez 1990).

2.2 Clasificación de la Especie.

Familia: Cactácea

Tribu: Cereeae

Subtribu: Echinocactanae

Genero: *Astrophytum*

Especie: *capricorne*

2.3 Descripción de la Especie.

Astrophytum capricorne (Dietrich). Plantas simples subglobosas o algo cilíndricas hasta más de 25 cm de altura; provistas de escamas, filosas, blancas; costillas de 7 a 8, altas y agudas; aréolas separadas entre sí de 2 a 3 cm; circulares y lanosas. Espinas de 5 a 10 cm aplanadas, flexibles, papiráceas, pungentes, de 3 a 7 cm de longitud de color café, las cercanas al ápice se doblan sobre el cubriéndolo, las viejas caen. Las flores son de 1 a 7 cm de longitud ampliamente dispersas cuando están en floración; los segmentos del pigmento exterior son rojizos, pasando gradualmente hacia un color amarillo limón, los segmentos del perianto interior de color naranja en la base espatulados,

agudos en el ápice, enteros o más o menos dentados numerosos estambres unidos en toda la superficie interna del tubo floral estilo delgado de color crema; los lóculos del estigma lineales, algo espaciados de 5 a 9 de color crema. Fruto indehiscente semillas que miden de 2 a 5 mm de longitud y son brillantes (Britton y Rose 1963; Saucedo, 1985).

2.4 Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales.

Desde hace aproximadamente 120 años en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios de hoja, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, citado por Navarro y Vera, 1988).

Actualmente el cultivo *In vitro* es reconocido como una herramienta en las prácticas hortícolas y es un método importante para la propagación de un amplio rango de plantas ornamentales de las cuales las orquídeas, plantas de interior y rododendros son ejemplos notables. (Evans 1989; Fay y Gratton 1991). Aunque la propagación vegetativa de plantas ha sido practicada por siglos, han sido introducidas muchas mejoras a los métodos convencionales, la aplicación de las técnicas de

cultivo de tejidos se ha expandido considerablemente tanto por su utilidad y potencialidad.

El uso ventajoso de la micropropagación radica en la rápida producción de grandes cantidades de plantas con un mínimo de material vegetal (Hussey 1986).

Las principales etapas de la micropagación son la desinfestación superficial del explante, la iniciación del cultivo, la proliferación, enraizamiento y aclimatación.

La desinfestación normalmente se logra sumergiendo el explante en soluciones de hipoclorito de sodio con un agente humectante o detergente para mejorar el contacto entre el explante y el desinfestante. El peróxido de hidrógeno y el cloruro mercurico son otros agentes desinfestantes que han sido usados.

Después de la desinfestación, el tejido vegetal es colocado sobre un medio nutritivo, normalmente solidificado con agar; por lo general todos los medios contienen sales minerales (Macronutrientes y Micronutrientes) y algunos compuestos orgánicos incluyendo vitaminas y azúcares.

La respuesta del tejido a un medio depende predominantemente de los reguladores de crecimiento vegetales incluidos en el medio. Por lo regular son utilizadas las citocininas y auxinas. Las citocininas se utilizan para romper el reposo de las yemas laterales. Las más utilizadas son BAP, Zeatina, Cinetina y 2iP en la micropropagación.

Las auxinas son utilizadas para la inducción ya sea de callo o raíz.

Con el rompimiento del reposo las citocininas dan lugar a que los cultivos puedan producir potencialmente muchos brotes de un solo explante original.

Cuando el número de brotes requerido se ha alcanzado a través de la proliferación, los brotes individuales son cortados y transferidos a un medio que contenga ya sea una auxina o bien sin reguladores de crecimiento (Fay y Gratton 1991).

2.5 Importancia del Cultivo de Tejidos vegetales en Cactáceas.

Las cactáceas requieren de métodos de propagación alternativos ya que su desarrollo es extremadamente lento en condiciones naturales (Harrington, citado por Corona y Yañez, 1983).

El mantenimiento de colecciones de plantas suculentas puede ser problemático, puesto que muchas de estas especies son muy susceptibles a pudriciones causadas por bacterias y hongos. Puesto que los cactus normalmente son propagados por semillas o cortes, la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a los miembros de las cactáceas podría eliminar el mantenimiento de grandes números de plantas madre. Así como el lento crecimiento de este tipo de plantas (Johnson y Emino, 1979; Ault y Blackmon 1987).

Los métodos de propagación *In vitro* para cactáceas han sido desarrollados en los jardines reales de Kew en los últimos 10 años y se ha demostrado la utilidad de estas técnicas en contrarrestar esos problemas (Gratton y Fay, 1990; Fay y Gratton 1992).

El desarrollo de tales métodos de propagación además podría ayudar grandemente en la conservación y diseminación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Puesto que miles de plantas pueden ser producidas a partir de pequeños fragmentos de tejidos obtenidos de plantas donadoras. (Mauseth 1977).

A pesar del valor ecológico y ornamental de las cactáceas (Narayanaswamy 1977) comenta que esos grupos han recibido poca

atención con respecto al cultivo de tejidos vegetales.

Aunque las técnicas de cultivo de tejidos en cactáceas se han utilizado para fines más teóricos como por ejemplo procesos de diferenciación y morfogénesis; también han sido utilizados en la práctica de la micropropagación a pesar que es una técnica no utilizada ampliamente debido a la dificultad que representa el aislamiento y esterilización superficial del material vegetal. Esto es debido probablemente a la estructura de la planta, el área meristemática está incluida en el tejido de las areólas y la remoción de las espinas puede dañar este tejido o dejarlo expuesto y dañarlo con el desinfectante.

La esterilización del explante es un prerequisite para el éxito en cultivo de tejidos pero la estructura de la mayoría de las especie. hace difícil lograr explantes asépticos ya que las infecciones endógenas pueden estar presentes en algunos cactus, lo cual podría explicar la pérdida completa de los explantes. Sin embargo, una vez resueltos estos problemas es indudable que el cultivo *in vitro* puede tener gran aplicación en la micropropagación así como la biosíntesis de productos secundarios de cactáceas (Gratton y Fay 1990, Havel y Kolar 1983).

Con lo anterior se podría lograr producir clones de plantas y distraer la atención del colector encaminado a no

hacer viajes a las zonas afectadas y de esta forma ayudar a evitar la sobrecolecta indiscriminada de éstas plantas en su lugar de origen. Los cuales podrán seguir cumpliendo de esta manera con sus funciones de retención de suelo y agua y evitar la desertificación. (Harrington; citado por Corona y Yanez, 1983).

2.6 Cultivo *In vitro* en Cactáceas.

Entre las familias de plantas suculentas las cactáceas se han estudiado para la inducción de callo, micropropagación o para el estudio de biosíntesis de alcaloides. (Fay y Gratton 1991).

Uno de los primeros estudios sobre cultivo de tejidos de cactus es el consignado por (King 1957), quien evaluó la formación de callo a partir de raíz, tallo, hojas, estambres, pistilos y óvulos. Así mismo (Mauseth y Halperin 1976) llevaron a cabo investigaciones que consistieron en el estudio de la morfogénesis de cactus a partir de callos; por otra parte Steinhart citado por (Clayton 1987) evaluó biosíntesis de alcaloides en cultivos de callo de *Trichocereus spachianus*.

Sin embargo el primer investigador en sugerir la utilidad del cultivo de tejidos como una herramienta de micropropagación para cactus fue (Mauseth 1977) quien menciona que tales métodos

de propagación podrían ser de gran ayuda en la conservación y diseminación de especies raras y amenazadas. A las cuales pertenecen las cactáceas las cuales han sido saqueadas y destruidas en México debido a las colectas exhaustivas que han sido objeto (Sanchez y Galindo 1989).

Los requerimientos para el establecimiento y micropropagación varían entre las cactáceas desde la iniciación del cultivo hasta el mantenimiento (Havel y Kolar 1983).

Lo anterior se hizo evidente en las investigaciones de (Johnson y Emino 1979) quienes trabajando con diversas especies de cactáceas, obtuvieron resultados variables, en general mencionan que se obtuvo buena proliferación de callo e iniciación de raíces en la mayoría de los cultivos. Sin embargo algunas especies solamente respondieron formando callos pequeños e incluso otras no respondieron. Esos resultados sugieren que cada especie puede requerir una relación específica y única de auxinas y citocininas para ciertas respuestas; de igual manera, (Mauseth 1977) observó que con varias combinaciones de BAP y NAA se estimulaba el crecimiento de callo en cactáceas, produciéndose ocasionalmente raíces pero sin diferenciación de brotes o embrioides.

La diferencia en la respuesta puede ser debida también al tipo de explante utilizado.

Johnson y Emino 1979 mencionan que a pesar que brotaron muchos explantes, los que respondieron más al cultivo fueron los tubérculos los cuales son análogos a la base de las hojas de la mayoría de las angiospermas. Por lo tanto para la micropropagación los explantes más comunes son los brotes y yemas laterales según (Fay y Gratton 1991).

Desde el punto de vista de la estabilidad genética, un método relevante es la propagación de plantas por medio de la estimulación del desarrollo *in vitro* de las yemas laterales. Esta posibilidad ha sido señalado por Mauseth y Halperin 1976 quienes obtuvieron crecimiento de *Opuntia polyacantha* a partir de las yemas axilares (areolas) en un medio con BAP.

Así mismo Vyskot y Jara 1984 utilizando brotes desinfectados que contenían areolas o mamilas obtuvieron después de 1 ó 2 semanas la proliferación de callo el cual se inició sobre las superficies cortadas; observaron que la intensidad de la inducción de callo fue proporcional a la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Además en el caso de las porciones que presentaban areolas, observaron la producción de brotes en *Mammillaria carmenae* y *M. prolifera* después de 5 semanas en cultivo. Lo cual consideran que ocurrió a partir de los meristemas en reposo; observaron también resultados positivos a partir de

fragmentos de costillas con areolas de *Trichocereus spachianus* y *Astrophytum myriostigma*. Después de 4 semanas (sin subcultivar) nuevos brotes empezaron a crecer directamente a partir de las areolas. Estos resultados muestran la posibilidad de la multiplicación clonal de cactus en gran escala por medio de las yemas axilares *in vitro*.

Así mismo Starling 1985, consignó la micropropagación de *Leuchtenbergia principis* en donde encontró que la producción de brotes axilares se favoreció más que la producción de brotes adventicios a partir de callo. El explante que utilizó fueron epicotilos de plántulas de 6 semanas de edad germinadas asépticamente y la mejor proliferación de brotes se observó en un medio con 10 mg l^{-1} de BAP y 0.1 mg l^{-1} NAA. En este estudio se obtuvo un promedio de 25 brotes que fueron producidos de un brote apical en 6 meses; Así que teóricamente es posible producir 300,000 brotes a partir de una plántula en 2 años.

Por otra parte Ault y Blackmon 1985 trabajando con 5 especies de cactus y utilizando brotes obtenidos a partir de plántulas desarrolladas *in vitro*, encontraron que la adición de 1 mg l^{-1} de NAA y 10 mg l^{-1} de citocinina al medio MS resultó una proliferación axilar de brotes en *Echinocereus pectinatus* var. *neamexicanus*, *Ferocactus covillei*, y *F. wislizenii*. sin embargo no obtuvieron proliferación de brotes en *Echinocactus uncinatus*

y *mammillaria gummifera*.

Estos mismos investigadores 1987 consignan un sistema para la inducción, proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Ferocactus acanthides* en donde obtuvieron los explantes primarios , cortando la porción de cada plántula por arriba de los lóbulos cotiledonares después de 2 a 5 semanas de crecimiento . Sembraron los explantes en el medio MS adicionado con 46.5 MM de cinetina y 5.4 MM de NAA en donde se exhibió primeramente crecimiento de callo en la superficie del corte y crecimiento de las yemas axilares en la mayoría de las areolas después de 4 a 6 semanas.

Posteriormente los explantes con brotes axilares mayores a 5 mm de altura fueron subcultivados después de 6 a 15 semanas y comprobaron la habilidad para la proliferación de brotes puesto que no hubo disminución de los mismos a lo largo de los subcultivos.

Los resultados anteriores muestran claramente la gran capacidad de proliferación de brotes *in vitro*, sin embargo la concentración óptima para su crecimiento debe ser determinado puesto que en trabajos realizados por Lazarte y colaboradores 1982. se observó que diversas combinaciones de NAA y BAP tienen efecto sobre el rompimiento y crecimiento de las yemas; esto es

los brotes que se desarrollaron en el medio de cultivo conteniendo 10 mg l^{-1} de BAP y 1 mg l^{-1} NAA presentaron menos yemas y entrenudos más cortos; sin embargo, el desarrollo máximo de brotes se obtuvo con 1 mg l^{-1} BAP y 0.1 mg l^{-1} NAA.

Lo anterior es importante ya que los cultivos obtenidos de brotes axilares es uno de los mejores sistemas in vitro para propósitos de conservación debido a la disminución de riesgos de variación somaclonal (Larkin y Scowcroft 1981; y Krogstrup y Norgaard 1991).

MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y el laboratorio de Anatomía y Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) durante el período comprendido de junio de 1991 a abril de 1992. Este trabajo fue financiado por la Facultad de Agronomía (Centro de Investigación Agropecuaria) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Los objetivos del trabajo consistieron en determinar el tratamiento de desinfestación más adecuado para el establecimiento aséptico de *Astrophytum capricorne*, así como la combinación de reguladores de crecimiento óptima para la proliferación de brotes.

El material y equipo utilizado en el presente estudio se enlistan en el cuadro 1.

Cuadro 1: Materiales, equipo e instrumental utilizado en el experimento. Técnicas de desinfestación y micropropagación de *Astrophytum capricorne*.

Equipo e instrumental	Cristalería
Balanza analítica	Cajas petri
Balanza granataria	Probetas de 50, 100, 500, y 1000 ml.
Refrigerador	Matraces Erlenmeyer de: 250, 500 y 1000 ml.
Horno-microondas	Vasos de precipitado de: 50, 200, 300, 400, 600 y 1000 ml.
Estufa	Agitador manual
Cámara de flujo laminar	Recipientes de vidrio de alimento infantil de 130 ml.
Cámara bioclimática	Matraces de aforación de 500 y 1000 ml.
Autoclave u olla de presión	
Potenciómetro	
Termómetro	
Regulador del fotoperiodo (reloj)	
Agitador magnético	
Mecheros de Bunsen	
Pinzas de disección	
Bisturries	
Espátulas	
Pizetas	
Gasas	
Algodón	
Etiquetas	
Charolas	
Papel secante, filtro y aluminio	
Bolsas de polietileno	
Tapas de poliestireno	
Regla métrica	

Continuación del cuadro 1.

Compuestos químicos

- a) Agentes desinfectantes
Alcohol etílico (Absoluto)
Alcohol etílico al 70%
Detergente
Cloralex (Hipoclorito de Sodio)
Bicloruro de mercurio (HgCl₂)
Agua oxigenada (H₂O₂)
Tween-20
- e) Reguladores de crecimiento
Bencil Amino Purina (BAP)
Acido Naftalanacetico (NAA)
Acido 2,4-Diclorofenoxiacético
Cinetina
Sulfato de adenina
- b) Macronutrientes
NH₄NO₃
KNO₃
KH₂PO₄
CaCl₂ · 2H₂O
FeSO₄ · 7H₂O
- c) Micronutrientes
MgSO₄ · 7H₂O
MnSO₄ · 4H₂O
ZnSO₄ · 7H₂O
CuSO₄ · 5H₂O
CoCl₂ · 6H₂O
Na₂MoO₄ · 2H₂O
H₃BO₃
- d) Vitaminas
Tiamina
Ac. nicotínico

3.2 Técnicas de Desinfestación.

Se procedió a seleccionar únicamente semillas que presentaban membrana, una vez seleccionadas se colocaron en gasas separando 40 semillas para cada tratamiento.

Con el propósito de obtener explantes en condiciones asépticas, las semillas se sometieron primeramente a un tratamiento de predesinfestación, el cual consistió en eliminar el exceso de contaminantes con detergente y agua de la llave por un tiempo de 5 minutos; además de 6 enjuagues consecutivos con agua bidestilada. Así mismo, se utilizó alcohol etílico como agente predesinfestante en todos los tratamientos, permaneciendo las semillas en éste por un minuto.

Posteriormente las semillas se colocaron en diversos agentes desinfestantes: para el NaOCl se utilizó (blanqueador comercial) cuya presentación es del 6% de ingrediente activo y se preparó una solución del 20% v/v; HgCl₂ al 0.1% procediéndose a pesar 100 mg del reactivo y aforando a 100 ml con agua bidestilada; H₂O₂ utilizando peróxido de hidrógeno de 11 volúmenes, con el cual se preparó una solución al 20% v/v; se utilizó agua bidestilada como testigo.

Los tratamientos a los que fueron sometidas las semillas se enlistan a continuación.

Agente desinfectante	Concentración	Tiempo de exposición
1.- Agua sin vacío		10 min
2.- NaOCl sin vacío	20.0%	10 min
3.- HgCl ₂ sin vacío	0.1%	5 min
4.- H ₂ O ₂ sin vacío	20.0%	5 min
5.- Agua con vacío		10 min
6.- NaOCl con vacío	20.0%	10 min
7.- HgCl ₂ con vacío	0.1%	5 min
8.- H ₂ O ₂ con vacío	20.0%	5 min

A cada tratamiento se le agregaron 2 gotas de tween 20 por cada 100 ml de solución con el propósito de obtener una mejor penetración del agente desinfectante.

La diferencia de los tratamientos sin y con vacío radicó en someter las semillas en el segundo de los casos a los diversos agentes desinfectantes a una bomba de vacío, estos se colocaron en matraces kitasato conectados a una bomba de agua por 5 min.

Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento de la semilla con cada agente desinfectante, en la campana de flujo laminar se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada esterilizada con el objeto de eliminar el exceso de desinfectante. Por último, se procedió a la siembra de las semillas en recipientes de alimentos infantiles de 130 ml que contenían como sustrato 25 ml de agar-gel al 0.5% ($5g.l^{-1}$).

Se consideró cada recipiente con 5 semillas como unidad experimental. Los tratamientos constaron de 8 repeticiones los cuales fueron distribuidos en un arreglo completamente al azar en una cámara bioclimática a una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

El modelo estadístico utilizado fue el del diseño completamente al azar con arreglo factorial:

$$Y_{ijk} = M + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

en donde: Y_{ijk} = $_{ijk}$. ésimas observación de la variable dependiente

A_i = efecto del i -ésimo Agente desinfectante

B_j = con y sin vacío

$(AB)_{ij}$ = interacción entre tratamiento i y nivel de vacío j

E_{ijk} = error experimental de la ijk - ésima observación.

En cada unidad experimental se obtuvo el % de semillas contaminadas. Para hacer el análisis de varianza el % se transformó utilizando la transformación angular: arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje (Snedecor y Cochran, 1971).

3.3 Etapa de Inducción.

3.3.1 Medio de Cultivo.

Con las plántulas asépticas obtenidas se procedió a efectuar la etapa de inducción, para lo cual se utilizó el medio de Murashige - Skoog (1962) el cual consta de los siguientes macro y micronutrientes.

MACRONUTRIMENTOS	(mg l^{-1})
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	

MICRONUTRIMENTOS

KL	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.625
Na ₂ .EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8

3.3.1.1 Preparación de Soluciones Concentradas.

Con el objeto de obtener mayor precisión en los nutrimentos enlistados se procedió a la elaboración de las siguientes soluciones concentradas.

SOLUCION A.- CaCl ₂ ·H ₂ O, 22.0g	1000x aforado a 50 ml
B.- KNO ₃ , 1.9g l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ , 1.65g l ⁻¹	se pesan y se agregan directo al medio
SOLUCION C.- KL, .0415g CoCl ₂ ·6H ₂ O, .00125g	1000x aforado a 50 ml
SOLUCION D.- KH ₂ PO ₄ , 3.4g H ₃ BO ₃ , 0.124g Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 0.005g	400x aforado a 50 ml
SOLUCION E.- MgSO ₄ ·7H ₂ O, 7.4g MnSO ₄ ·4H ₂ O, 0.44g ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.172g CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.050g	400x aforado a 50 ml

SOLUCION F.- $F_2SO_4 \cdot 7H_2O$, 0.557g 200x aforado a 100 ml
Na₂ EDTA, 0.745g

Lo anteriormente señalado constituye el medio básico puesto que se enumeran los macro y micronutrientes, sin embargo en un medio de cultivo deben incluirse componentes orgánicos, para lo cual se elaboraron soluciones concentradas de vitaminas y reguladores de crecimiento.

A la solución de "vitaminas" se le asignó la letra G y se preparó añadiendo 3 vitaminas y un aminoácido en las siguientes proporciones aforando a 250 ml.

Ac. nicotínico	0.0025g
Piridoxina - HCl	0.0025g
Tiamina - HCl	0.025g
Glicina	0.01g

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron la citocinina, BAP (Bencil Amino Purina) y la auxina NAA (Acido Naftalenacético).

Para la preparación del BAP se utilizó como solvente HCl 1N y para la auxina se utilizó NaOH 1N.

3.3.1.2 Elaboración del Medio de Cultivo.

La micropropagación involucra una serie de fases, para las cuales es necesaria la elaboración de diversos medios de cultivo, a continuación se menciona la metodología para la preparación del medio de inducción.

3.3.2 Medio de Inducción.

Con las soluciones concentradas se procedió a la preparación de 1 litro de medio.

Los constituyentes se agregaron en el siguiente orden:

1.- Solución A		1 ml
2.- Pesar B	KNO ₃	1.9g
	NH ₄ NO ₃	1.65g
3.- Solución C		1 ml
4.- Solución D		2.5 ml
5.- Solución E		2.5 ml
6.- Solución F		5.0 ml
7.- Solución G		10.00 ml
8.- Pesar BAP		3.0 mg
	NAA	1.0 mg
9.- Pesar Mioinositol		0.1 g
	NaH ₂ PO ₄	170 mg
10.- Sacarosa		30 g

Una vez efectuado lo anterior se aforo a un volumen de 950 ml, ajustando posteriormente el pH con un potenciómetro utilizándose NaOH al 0.1N ó HCl al 0.1N según el caso para estandarizar el pH deseado a 5.5. Una vez calibrado el pH, el medio se aforo a 1000 ml y posteriormente se le agregó $5g.l^{-1}$ de agar-gel colocándose en un microondas a fundir por un tiempo de 5 a 7 minutos. El medio de cultivo fue dosificado en 25 ml x unidad en recipientes de vidrio de 130 ml de capacidad. Se cubrieron con tapas de polipropileno. Los recipientes con el medio de cultivo se esterilizaron en una autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos. En este medio se colocaron las plántulas que germinaron en el substrato de agar-gel.

Las plántulas fueron seccionadas utilizándose únicamente el brote para la etapa de inducción. En este medio permanecieron 6 semanas.

3.4 Etapa de Proliferación de Brotes

3.4.1 Medios de Cultivo para la Proliferación de Brotes.

Para la etapa de proliferación de brotes se evaluaron dos medios de cultivo en los que varió principalmente el contenido y proporción de los reguladores de crecimiento y vitaminas

puesto que el medio básico utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962).

En esta fase no se consideró la utilización de un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento ya que estudios previos (Cárdenas y col, 1991,a,b) han demostrado la ausencia de respuesta bajo estas condiciones.

Los tratamientos consistieron en agregar al medio de cultivo una citocinina (BAP) o dos citocininas (BAP y cinetina) a los cuales se les denominó medio 1CK y medio 2CK respectivamente.

Los medios 1CK, y 2CK incluyen además del medio básico. en mg.l^{-1} .

	1CK	2CK
Cinetina		0.1
BAP	5.0	0.2
NAA	0.1	
NaH_2PO_4	170.0	
Tiamina.HCl	0.4	1.0
Piridoxina.HCl		0.5
Ac. Nicotínico		0.5
Sacarosa	30000.0	30000.0
Agar-gel	5000.0	5000.0

El procedimiento para la elaboración de los medios de cultivo fue siguiendo la metodología ya descrita para el medio de inducción hasta la esterilización.

Una vez preparados los medios de cultivo, se procedió a realizar el subcultivo del material obtenido en el medio de inducción; esto es, inóculos de 1.5 cm de longitud fueron seccionados en la campana de flujo laminar y colocados en ambos medios.

Cada tratamiento constó de 8 repeticiones las cuales fueron distribuidas en un arreglo completamente al azar en una cámara bioclimática a 25 °C y 16 h de fotoperíodo; en éstas condiciones los cultivos permanecieron 12 semanas, transcurridas éstas se evaluó el número de brotes.

Con el propósito de corroborar la capacidad del medio de cultivo con dos citocininas para la proliferación de brotes, se efectuó un segundo subcultivo a partir del crecimiento obtenido en ambos medios.

En esta fase los cultivos permanecieron en las mismas condiciones durante 12 semanas en el medio con 2CK, donde una vez transcurrido el período se realizó la segunda evaluación del número de brotes.

3.5 Etapa de Enraizamiento.

3.5.1 Medios de Enraizamiento

Para esta etapa se procedió a seguir la metodología citada por Ault y Blackmon (1987). Los brotes axilares de 5 a 15 mm de altura fueron cortados y subcultivados para el enraizamiento en el medio MS (1962) sin adenina, BAP o NAA, utilizando 1 mg l^{-1} de IBA para promover la formación de raíces; así mismo se utilizó el medio MS al 50% de su concentración.

En estos tratamientos los brotes permanecieron 12 semanas. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Técnicas de Desinfestación.

Contaminación. De los cuatro tratamientos que se utilizaron para evaluar la contaminación de las muestras los resultados mostraron un 100 % de contaminación con y sin vacío en los tratamientos H_2O_2 y testigo; por lo anterior, éstos no se incluyeron en el análisis estadístico. El porcentaje de contaminación se ilustra en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Por ciento de contaminación de semillas de *Astrophytum capricorne* sometidas a diversos agentes desinfectantes.

Agente desinfectante	Por ciento de contaminación	
	sin vacío	con vacío
H_2O (bidestilada)	100%	100%
NaOCl	58%	43%
HgCl ₂	78%	65%
H_2O_2	100%	100%

Una vez transformados los porcentajes de contaminación, se sometieron a un análisis de varianza el cual se muestra a continuación (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Análisis de varianza para la variable porcentaje de contaminación, en el experimento Técnicas de desinfección y micropropagación de *Astrophytum capricorne*.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	P>F.
Agentes D.	1	2199.5078	2199.5078	5.9946 *	0.020
Vacío	1	838.0546	838.5046	2.2841 N.S.	0.138
Interacción	1	4.1640	4.1640	0.0113 N.S.	0.912
Error	28	10273.6250	366.9151		
Total	31	13315.3515			

C.V. = 35.2763%

N.S. = No significativo.

* = Significativo.

El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre los agentes desinfectantes sin embargo para el caso de la interacción de factores así como el procedimiento con y sin vacío no se observó efecto significativo.

Cuadro 4 .- Comparación de medias para el factor A (Agentes desinfectantes) en la variable porcentaje de contaminación.

Niveles	Medias
HgCl ₂	62.58 A
NaOCl	46.00 B

Nivel de significancia = 0.05

DMS = 13.86

De acuerdo con los resultados obtenidos de la comparación de medias podemos concluir que el tratamiento más efectivo fue el NaOCl, (Cuadro 4). Lo anterior coincide con lo mencionado por Roca y Mroginski (1991), quienes mencionan que el NaOCl en concentraciones del 1% a 3%, es uno de los agentes más útiles como germicida, por lo que durante muchos años se ha utilizado como esterilizante superficial en los tejidos vegetales porque tiene la ventaja que se enjuaga más fácilmente y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables.

Por otro lado, el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) presentó un mayor porcentaje de contaminación, lo cual se puede atribuir a la baja concentración del agente desinfectante, sin embargo no es recomendable aumentar la concentración, debido a que es una sustancia altamente tóxica y corrosiva además que presenta una mayor dificultad para removerlo mediante el enjuague (Roca y Mroginski, 1991).

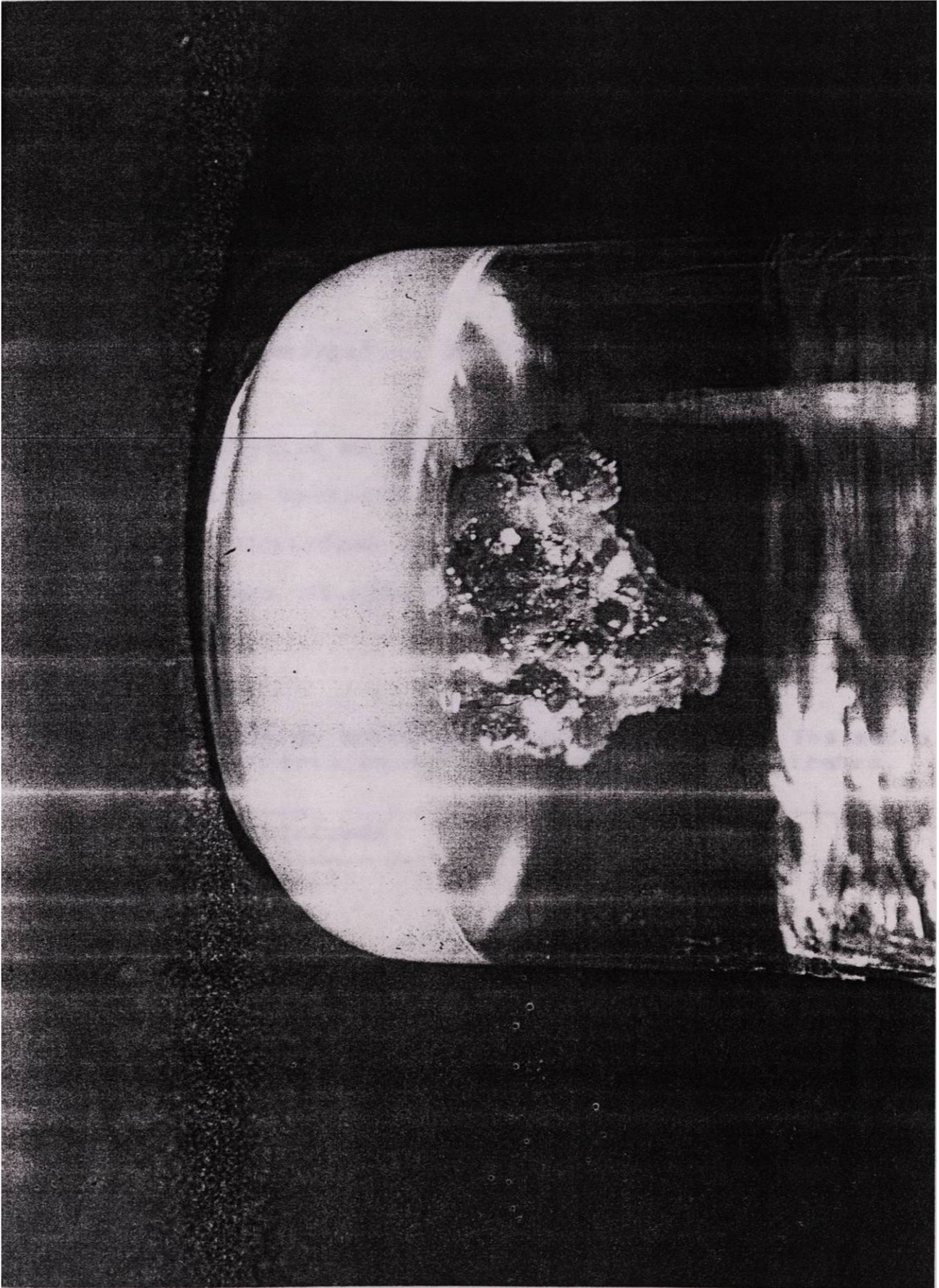
Las semillas tratadas con agua oxigenada (H_2O_2) mostraron una contaminación del 100%, igual que el testigo, considerándose por lo tanto que no resulta un agente desinfectante efectivo para las semillas de *Astrophytum capricorne*.

En general, se puede concluir que la técnica de desinfestación con NaOCl resultó ser efectiva si consideramos que frecuentemente los cactus son hospederos de patógenos exógenos y endógenos los cuales muchas veces no pueden ser controlados por la desinfestación superficial (Johnson y Emino, 1979).

4.2 Etapa de Inducción.

Para esta etapa el inóculo que se utilizó fue el brote de las plántulas asépticas, el cual ha sido utilizado con éxito por varios investigadores (Starling, 1985; Ault y Blackmon, 1987), lo anterior es importante cuando las plantas propagadas sirven para propósitos de conservación (Fay y Gratton, 1991).

La respuesta del inóculo en el medio de inducción se observó a las 2 semanas de la siembra (Ilustración 1), donde se hizo evidente la formación de un callo incipiente sobre la superficie del corte, lo anterior puede atribuirse a que varias combinaciones de BAP y NAA estimulan el crecimiento de callo en cactáceas (Mauseth, 1977). Los brotes apicales obtenidos de las plántulas germinadas *in vitro* resultó ser un inóculo apropiado para iniciar la micropropagación en el medio de inducción, puesto que además de observarse el crecimiento de callo, muchas de las areolas que presento el brote (13 en promedio) no



mostraron desdiferenciación, lo cual es favorable para la siguiente etapa de la micropropagación ya que se ha observado que en las porciones que presentan areolas se produce la formación de brotes (Vyskot y Jara, 1984).

4.3 Etapa de Proliferación de Brotes.

Con el objetivo de determinar si existía diferencia en la proliferación de brotes a partir de los medios con citocininas (BAP y BAP más Cinetina) se evaluó el número de brotes formados a partir de ambos. El número de brotes obtenidos se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5.- Número de brotes obtenidos a partir de los medio de proliferación a las 12 semanas de la siembra.

Repeticiones	Medio 1	Medio 2
1	13	59
2	12	4
3	2	6
4	5	5
5	8	47
6	8	49
7	11	52
8	11	14

Las medias de las 8 repeticiones de ambos medios se presentan en la figura 1.

El análisis de varianza para la variable número de brotes se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6.- Análisis de varianza para la variable número de brotes de *Astrophytum capricorne* a las 12 semanas a partir de la siembra.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Tratamiento	1	1722.2500	1722.2500	5.7333*	0.030
Error	14	4205.5000	300.3928		
Total	15	5927.7500			

C.V. = 90.6240%

* = significativo

Cuadro 7.- Comparación de medias para la variable número de brotes de *Astrophytum capricorne*.

Tratamientos	Medias
BAP y Cinetina	29.50 A
BAP	8.75 B

Nivel de significancia = 0.05

DMS = 18.58

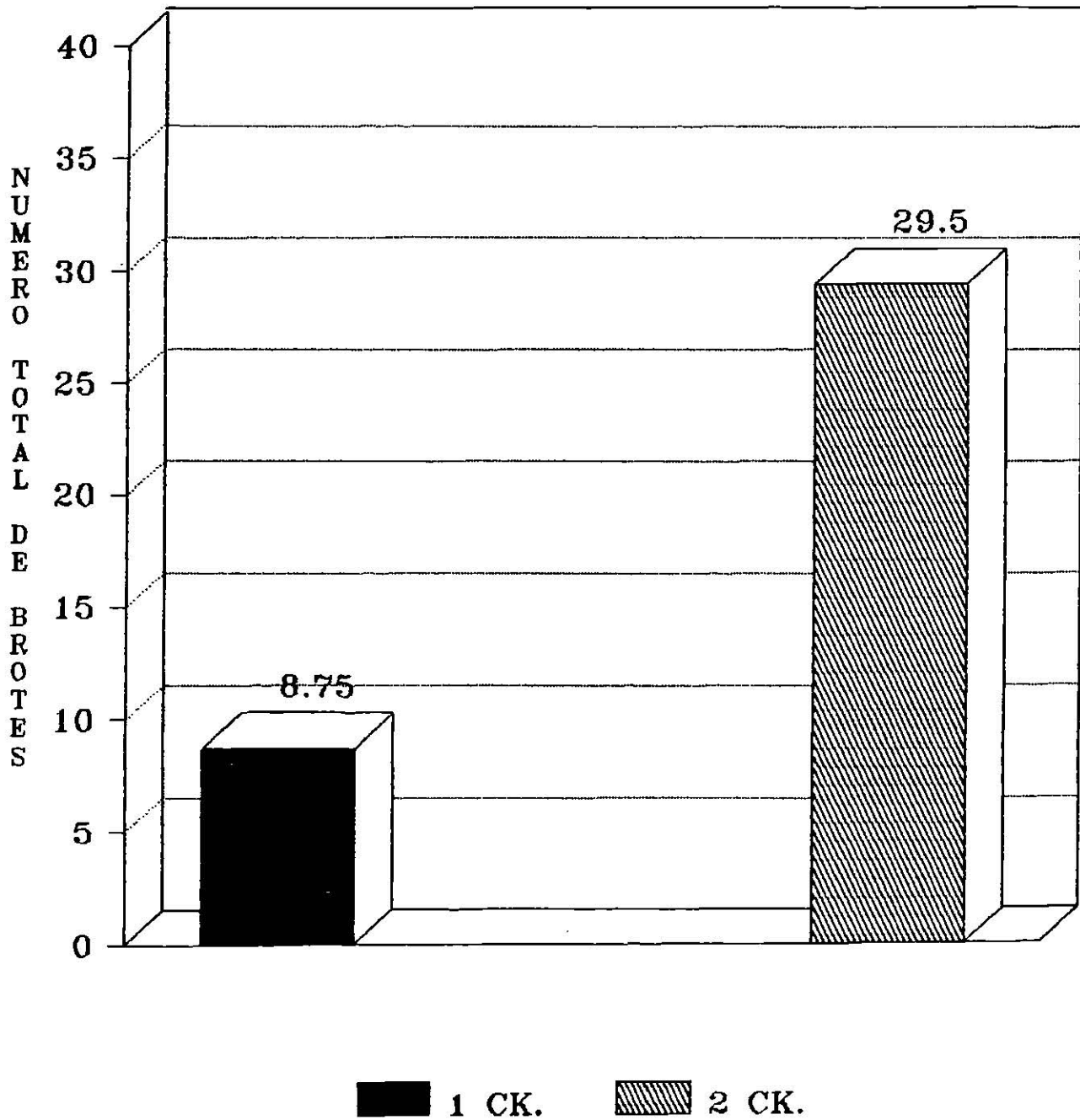


Figura 1.- Número de brotes de *Astrophytum capricorne* obtenidos a partir de los medios de proliferación a las 12 semanas de la siembra.

La comparación de medias (Cuadro 7), muestra una mayor eficiencia del medio con 2 citocininas para la diferenciación del número de brotes. (Ilustración 2) Lo anterior demuestra que la respuesta morfogénica depende predominantemente de los reguladores de crecimiento incluidos en el medio (Clayton, 1987; Fay y Gratton, 1991).

La diferencia en la respuesta puede atribuirse a que el medio 1 posee una combinación de auxina y citocinina , mientras que el medio 2 incluye 2 citocininas; normalmente en la micropropagación las citocininas se utilizan para romper el reposo de las yemas laterales (Fay y Gratton, 1991); en cactáceas, particularmente, se considera que el área meristemática está incluida en el tejido de las areolas (Gratton y Fay, 1991), por lo que es posible que nuevos brotes empiecen a crecer directamente de las areolas a partir de los meristemas en reposo (Vyskot y Jara, 1984). Por lo anterior, es evidente que la diferencia en el número de brotes es debido a la presencia de ambas citocininas.

Con el propósito de corroborar la eficiencia de éste medio de cultivo para la proliferación de brotes a partir de las areolas, se realizó posteriormente el subcultivo de los mismos, en el medio suplementado con las dos citocininas, esto es, los brotes obtenidos de los medios 1CK y 2CK se sembraron



en el medio 2CK fresco y a las 12 semanas de la siembra se realizó la evaluación del número de brotes. A los tratamientos se les denominó origen 1 y origen 2 dependiendo si provenían del medio con 1 ó 2 citocininas, respectivamente. Los resultados se muestran a continuación (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Número de brotes de *Astrophytum capricorne* obtenidos a las 12 semanas de la siembra en el medio con 2 citocininas, utilizando brotes provenientes de la primera evaluación.

Repeticiones	Brotes procedentes del	
	Medio 1	Medio 2
1	106	125
2	51	39
3	54	82
4	76	59
5	96	87
6	50	227
7	22	130
8	48	128

El análisis de varianza para la variable número de brotes en el medio con 2 citocininas (segunda evaluación) se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9.- Análisis de varianza para la variable número de brotes de la segunda evaluación, en el experimento Técnicas de desinfestación y micropropagación de *As trophytum capricorne*.

F.V.	g.l.	S.C.	C.M.	F.	P>F.
Tratamientos	1	5662.5625	5662.5625	2.0592	N.S. 0.171
Error	14	38497.8750	2749.8481		
Total	15	44160.4375			

C.V. = 57.7442%

N.S. = No significativo.

Como puede observarse, el análisis de varianza no muestra diferencia significativa para los tratamientos esto es, el número de brotes obtenidos resultó estadísticamente igual, independientemente del origen de los brotes.

Lo anterior puede atribuirse que una vez colocados los brotes del origen 1 en el medio con alto contenido de citocininas, el número pudo incrementarse debido a que los meristemas que permanecían parcialmente en reposo, fueron inducidos a la diferenciación. Esto ha sido observado también en otras especies de cactáceas en donde se ha obtenido una proliferación de brotes entre las 6 a 15 semanas a partir de los subcultivos (Ault y Blackmon, 1985, 1987), lo cual puede explicarse a que con las citocininas se favoreció el rompimiento del reposo de las yemas laterales.

Lo señalado anteriormente es importante debido a que en la micropropagación el número de brotes es la variable más importante (Clayton, 1987), puesto que el uso ventajoso de la micropropagación radica en la rápida producción de grandes cantidades de plantas con un mínimo de material vegetal (Hussey, 1986), al grado de considerarse que en algunas cactáceas como *Leuchtenbergia principis* es posible producir en 2 años más de 300,000 brotes a partir de una plántula (Starling 1985).

Los resultados claramente muestran las ventajas de la micropropagación por lo tanto, el desarrollo de estos métodos de propagación para cactus pudiera ayudar grandemente a la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción.

4.4 Etapa de Enraizamiento.

Con respecto a la etapa de enraizamiento no se obtuvieron respuestas favorables con los medios utilizados ya que con el medio (MS) adicionado con 1.0 mg l^{-1} IBA se necrosó el 100% de los brotes, mientras que con el (MS) a la mitad de su concentración se presentó un 80% de brotes necrosados.

Solo en el medio MS sin reguladores de crecimiento, los brotes se conservaron sin necrosis pero no hubo diferenciación

de raíces a las 12 semanas de la siembra. Sin embargo, posteriormente (después de 6 meses) se observó la formación de raíces en algunos brotes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible concluir:

1).- El mejor agente desinfectante para las semillas de *Astrophytum capricorne* resultó ser el NaOCl al 2% suministrado con vacío y sin vacío.

2).- El medio de cultivo con dos citocininas (BAP Y Cinetina) resultó ser más eficiente para la etapa de proliferación de brotes *in vitro*.

5.2 Recomendaciones

Al obtener resultados positivos en la etapa de proliferación es recomendable continuar con la siguiente etapa de micropropagación, esto es, la de enraizamiento, puesto que un requisito para lograr la aclimatación total es contar con plantas donde se hayan diferenciado las raíces.

Por lo anterior se sugiere continuar con los estudios para la inducción de raíces en los brotes obtenidos *in vitro* ya que los medios de cultivo mencionados no resultaron ser efectivos en el período donde normalmente se presentó la diferenciación. Así mismo es recomendable investigar la posibilidad de enraizar

in vitro en diversos sustratos (perlita, arena, suelo y perlita) ya que observaciones realizadas con los brotes obtenidos han mostrado que lo anterior es factible.

BIBLIOGRAFIA.

- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1985. *In vitro* Propagation of Selected native cacti species. Hort.Sci. 20 (3):541 pp.
-
- _____. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (cactaceae). 22 (126 - 127) pp.
- Britton, N. L. and J. N. Rose. 1963. The cactaceae descriptions and illustrations of plants of the cactus family. Vol. III (182 - 184) Dover publications, New york.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México U.N.A.M. México D.F. 1 pp.
- Cárdenas, C. E., O. González y T. Torres. 1991.(a). *In vitro* maintenance of *Echinocactus platyacanthus*. *In vitro* Cellular & developmental biology. 27(3):106A.
- Cárdenas, C. E., O. L. González, E. Olivares y T. Torres. 1991.(b). Cultivo *in vitro* de la "biznaga verde" *Echinocactus platyacanthus*. Memorias del IV Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas Saltillo, Coah. 249 pp.

- Campbell, F. T. 1982. The Lacey act and the cactus collector.
Cact & Succ. J. 54: 213 - 214 pp.
- Corona, N. V. y L. Yañez. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos, Cact. Suc. Méx. XXIX (3 - 7) pp.
- Clayton, P. W. 1987. (Micropagation as a means of conservation and commercialization of members of the subtribe cactinae (Cactaceae) Tesis de Maestría. New Mexico State University. Las Cruces, New Mex. 13 - 43 pp.
- Evans, D. A. 1989. Techniques in plant cell and tissue culture. En: S. Kang y C. J. Arntzen (Ed) plant biotechnology. Butterworths. Stoneham. M. A. 53 - 73 pp.
- Fay, M. F. and J. Gratton . 1991. Tissue culture of cacti and other succulents - a literature review and a report of micropropagation of Kew. Micropropagation unit, Royal botanic gardens. Richmond, Surrey. V. K.
-
- _____ . 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 28 P: 1-4 pp.

- Gratton, J. and M. F. Fay. 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro* En: J. W. Pollard y J. M. Walker (Ed). plant cell and tissue culture. Humana, press. Clifton, New Jersey.
- Havel, L, and Z. kolar. 1983. Microexplant isolation from cactaceae. Plant cell tissue organ culture 2: 349 - 353 pp.
- Hussey, G. 1986. *In vitro* propagation of horticultural and gricultural crops. En: S. H. Mantell y H. Smith (Ed) Plant iotechnology. Cambridge University Press. Cambridge, London.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1979. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. Hort.Sci. 14(5) : 605 - 606 pp.
- King, M. R. 1957. Studies in the tissue culture of Cacti. Cact & succ. J. (U.S.) 29 : 102 - 104 pp.
- Krogstrup, P. and J. V. Norgaard. 1991. Microprapagation of *Psiadia coronopus* (Lam.) Benth, a threatened endemic spcies from the island of Rodrígues. Plant cell, tissue and organ culture. 27: 227 - 230 pp.

- Lazarte , J. E., M. L. Gaiser and O. R. Brown. 1982. Department of horticultural Sciences, Texas A & M University, college Station, Texas 77843. Hort.Science 17 (1): 84 pp.
- Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197 - 214 pp.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culotures. Physiol Plant. 15: 473 - 479 pp.
- Mauseth, J. D. and W. Halperin. 1976. Cytokinin an gibberellic acid induced effects onthe structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Am. J. Bot. 63(10): 1295 - 1301 pp.
- Mauseth, J. D. 1977. Cactus. Tissue culture: A potential method of propagation. Cact. & Succ. J. (U.S.) 59: 80 - 81 pp.
- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. En: J. Reinert & Y. P. S. (Ed.), Plant

cell, tissue and organ culture, springer - verlag.
Berlin. 179 - 206 pp.

Navarro, U. S y R. Vera E. 1988. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Hurtado, M. D. y M. M. Merino.(Ed). Cultivo de tejidos vegetales Ed: Trillas. México, D.F 15 pp.

Pence, V. C. 1991. Center for reproduction of endangered wildlife. TCA Report 25 (1) 1 - 2 pp.

Roca, W. M . y L. A. Mroginski. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *In vitro*. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Ed). Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Colombia 12 - 13 pp.

Starling, R. J. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. cactus and succulent journal, 57:(114-115)pp.

Snedecor, G. W y W. G. Cochran. 1971. Métodos estadísticos. Ed: Continental, México 22, D. F., 683-685 pp.

Sánchez, E. 1990. El Japón y las cactáceas. La feria del verdor, Osaka 1990. Tetla-ni. 51: 5-7 pp.

- Saucedo, M. J. 1985. Estudio florístico, ecológico y utilizable en las cactáceas, del municipio de García, N. L., México. U.A.N.L. Facultad de Ciencias Biológicas. 5-7 pp.
- Sánchez, M. E. y G. Galindo 1989. El cactario regional del ITESM. Compus Querétaro. Cactaceae y suculentes Mexicanas tomo XXXIV No. 4: 92 pp.
- Vovides, A.P. 1981. (Lista Preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción) Biotica 6(2) 219-228 pp.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *In vitro*. J. Hort Sci. 59(3) 449 - 452 pp.

