



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Astrophytum ornatum* (DE CANDOLLE)
WEBER (CACTACEAE), ESPECIE AMENAZADA DE
EXTINCIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:

GILBERTO MENDOZA MADRIGAL

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

Índice	I
Abreviaturas	II
Resumen	III
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
1.- Las cactáceas	3
1.1.- Importancia	5
1.2.- Problemática de conservación	8
2.- Estrategias para la conservación de la biodiversidad	9
2.1.- El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	10
2.1.1.- Micropropagación en cactáceas	16
3.- <i>Astrophytum ornatum</i> (De Candolle) Weber (Cactaceae)	19
III. Justificación	23
IV. Objetivos	24
1.- General	24
2.- Particulares	24
V. Material y Método	25
1.- Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de <i>A. ornatum</i>	25
2.- Inducción y proliferación de brotes	26
3.- Individualización y pruebas de enraizamiento	28
4.- Crecimiento <i>in vitro</i>	28
5.- Aclimatización <i>in vitro</i> y establecimiento <i>ex vitro</i>	29
VI. Resultados y Discusión	31
1.- Germinación	31
2.- Respuestas morfogénicas	38
a).- Formación de callo	38
b).- Organogénesis	41
1. Activación areolar (yemas axilares)	41
2. Organogénesis directa	48
3. Regeneración apical	50
4. Rizogénesis	51
3.- Hiperhidratación y oxidación	52
4.- Individualización y pruebas de enraizamiento	55
5.- Crecimiento <i>in vitro</i>	59
6.- Aclimatización <i>in vitro</i> y evaluación de la sobrevivencia <i>ex vitro</i>	63
VII. Conclusiones	69
Literatura citada	71
Apéndice 1. Descripción botánica de <i>Astrophytum ornatum</i> (Arias-Montes, 1989; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b)	86
Apéndice 2. Formulación de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y MS 50%	87

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indol-butírico
ANA	Ácido α -naftalenacético
BA	N ⁶ -benciladenina
CA	Carbón activado
CAM	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>)
CITES	Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CONANP	Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
K	Kinetina
MS	Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962)
NOM	Norma Oficial Mexicana de Protección de Flora y Fauna Silvestre Terrestre y Acuática (NOM-059-SEMARNAT-2001)
RBBM	Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
TDZ	1-phenyl-3-(1-2-3-thidiazol-5-YL)urea Thidiazuron
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2ip	N ⁶ -2-isopentil-adenina

RESUMEN

Astrophytum ornatum conocida como “liendrilla” es una especie de la familia Cactaceae, endémica de México, muy apreciada como planta ornamental, por lo que ha sido objeto de colectas excesivas con fines de uso comercial que han reducido el número de individuos en sus poblaciones silvestres. Actualmente se encuentra en la categoría de amenazada de extinción (A) de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001. Se distribuye en los estados de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales representan una alternativa viable para promover su propagación y conservación, ya que es posible obtener un gran número de individuos que pueden ser comercializados de forma legal. En el presente trabajo se logró la propagación *in vitro* de esta especie a partir de explantes longitudinales provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Se obtuvo la regeneración de brotes por activación areolar y organogénesis directa en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 18 combinaciones de citocininas y auxinas (BA/ANA y K/2,4-D). Respectivamente se obtuvo un promedio de 2.93 y 5.95 brotes por explante en los tratamientos 2/0 mg/L de BA/ANA y K/2,4-D. Se alcanzaron porcentajes de enraizamiento de 93% en medio MS 100%. Después de 22 semanas de su establecimiento *ex vitro* se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de hasta el 88% en las plantas sometidas a una etapa de aclimatización *in vitro* en medio MS líquido a la mitad de sus componentes y adicionado con 7.5 g/L de sacarosa en puentes de papel filtro y contenedores ventilados.

I. INTRODUCCIÓN

La más alta diversidad y abundancia de cactáceas del mundo se concentra en México, donde desde tiempos prehispánicos han sido parte importante en la alimentación, medicina y como elemento de construcción (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a; Glass, 1998).

En la actualidad las cactáceas enfrentan problemas como la destrucción y/o modificación de su hábitat y la sobrecolecta en su hábitat natural con fines de uso ornamental.

El uso de las cactáceas como plantas de ornato ha cobrado particular importancia por lo que es indispensable implementar y desarrollar estrategias que permitan revertir los efectos del saqueo y que además contribuyan a su conservación.

Las dos formas de conservación de los recursos genéticos son la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; CONABIO, 1998; Primack, 2000). La primera involucra la preservación de la diversidad genética en el medio silvestre o hábitat natural mediante la creación de áreas naturales protegidas. La conservación *ex situ* comprende entre otras, la creación de jardines botánicos y las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, han sido empleadas en la propagación de especies hortícolas y ornamentales (Fay y Gratton, 1992) y recientemente en la preservación de especies amenazadas o en peligro de extinción, tal es el caso de la familia Cactaceae. La propagación *in vitro* de especies de cactáceas que se encuentran en alguna categoría de riesgo puede disminuir el daño a las especies silvestres, ya que reduce las presiones de colecta

sobre las poblaciones naturales mediante la satisfacción de demandas de tipo comercial (Johnson y Emino, 1979; Bonness *et al.*, 1993).

La propagación de cactáceas se ha llevado a cabo con éxito en varias especies, entre ellas *Turbincarpus laui* (Santos-Díaz *et al.*, 2003b), *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002); *Astrophytum myriostigma* y *Cephalocereus senilis* entre otras (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que aunque el cultivo *in vitro* sigue un procedimiento general, se requieren estudios específicos que permitan establecer el procedimiento más adecuado para cada especie.

El uso de las técnicas de propagación *in vitro* aplicado en conjunto a las técnicas de conservación *in situ* pueden contribuir de forma importante a la conservación de especies de cactáceas.

Astrophytum ornatum se encuentra amenazada de extinción y enfrenta la problemática antes mencionada, por lo que en este estudio se plantea su propagación *in vitro* a fin de contribuir a su conservación.

II. ANTECEDENTES

1.- Las cactáceas

Las cactáceas son plantas dicotiledóneas, suculentas y de diversos hábitos y hábitats. Hay cactáceas desde un centímetro de diámetro (*Blossfeldia liliputana*) hasta de 20 metros de altura, como el saguaro (*Carnegia gigantea*) (Barthlott y Hunt, 1993 citados por González *et al.*, 2001).

La familia Cactaceae es nativa del continente Americano (González *et al.*, 2001), se distribuye desde la Columbia Británica y Alberta, Canadá, hasta la Patagonia, cerca del extremo sur de Sudamérica (Hernández *et al.*, 2004).

El norte de México, el sur de Estados Unidos, el este de Brasil y partes de Bolivia, Perú, Chile y Argentina constituyen los más importantes centros de diversidad de cactáceas (Barthlott y Hunt, 1993 citados por Hernández *et al.*, 2004). La familia comprende cerca de 100 géneros y 1500 especies (Hunt, 1999 citado por Hernández *et al.*, 2004).

En México se concentra la más alta diversidad de cactáceas de todo el mundo con 850 a 900 especies (Rzedowski, 1993) agrupadas en 52 géneros, 84% de los cuales son endémicos (Challenger, 1998).

Las cactáceas se localizan principalmente en las zonas áridas y semiáridas, que en México ocupan la mitad del territorio (Challenger, 1998), alcanzan su máxima diversidad y abundancia en los matorrales xerófilos, aunque también es posible encontrarlas en los bosques tropicales caducifolios y espinosos, así como en las regiones cálido-húmedas.

En México se reconocen varias zonas caracterizadas por su gran diversidad de cactáceas. La ecorregión mexicana con la mayor diversidad de especies es el desierto Chihuahuense (Hernández y Godínez, 1994; Hernández y

Bárceñas, 1995; Hernández *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2004) con 324 especies, distribuidas en 39 géneros (Hernández y Gómez-Hinostrosa (en prensa) citados por Hernández *et al.*, 2004), es decir, en ésta zona se encuentran el 78% de los géneros y el 59% de las especies de cactáceas reportadas para el país.

El segundo centro de importancia es el Desierto de Sonora (ubicado en Sonora, Baja California y Baja California Sur). Otras zonas áridas que destacan por su diversidad de cactáceas son la zona árida del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (en Puebla y Oaxaca); la zona árida Queretano-Hidalguense (en Hidalgo y Querétaro); la región Mixteca (en Puebla y Oaxaca); y la depresión del Balsas (en Guerrero y Michoacán) (Gómez-Hinostrosa y Hernández, 2000).

De acuerdo a Hernández y Gómez-Hinostrosa (en prensa) citados por Hernández *et al.* (2004), dentro del desierto Chihuahuense, los estados más ricos en especies son San Luis Potosí (141), Coahuila (127), Nuevo León (114), Tamaulipas (104), Querétaro (93) y Guanajuato (90).

En cuanto a número de cactáceas endémicas, Oaxaca se ubica como el estado más rico del país (un género y 19 especies) (Hernández *et al.*, 2004).

Las cactáceas poseen una serie de adaptaciones morfofisiológicas adquiridas en respuesta a las presiones del medio árido. La adaptación fisiológica más evidente es su capacidad de almacenar y conservar agua en sus tejidos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978; Sánchez-Mejorada, 1986), debido al gran desarrollo del tejido parénquimatoso (suculencia), y el engrosamiento de la cutícula que evita la evapotranspiración. Además, el metabolismo CAM permite que la pérdida de agua por evapotranspiración sea menor (disminuye el riesgo de deshidratación), ya que mejora la “eficiencia de uso del agua” de la planta, es decir, la cantidad de carbono que se adquiere por cada unidad de agua que se

transpira (Mauseth, 1998; Challenger, 1998). La succulencia de los tejidos y el metabolismo CAM han permitido a las cactáceas sobrevivir en ambientes áridos extremos.

Entre las adaptaciones morfológicas más evidentes se encuentran: la reducción de la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas (*Mammillaria*, *Stenocactus*, *Coryphantha*); la modificación de las hojas en espinas que impiden una transpiración excesiva, condensan el agua atmosférica y protegen contra la herbivoría (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978; Challenger, 1998); la disposición hundida de los estomas que determina la formación de espacios aéreos que se saturan de vapor de agua, y permiten que la transpiración disminuya (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978) y las adaptaciones que permiten la rápida absorción del agua como la gran longitud y ramificación de sus raíces.

1.1.- Importancia

Las cactáceas, cumplen importantes funciones ecológicas, además de ser alimento y refugio de animales, son un excelente medio para evitar la erosión eólica y pluvial de las zonas áridas (Olguín, 1994).

Desde la época prehispánica han sido parte importante en el desarrollo cultural y económico de México. Siendo un elemento primordial en la alimentación, medicina, construcción y la manufactura de diversos artículos de uso doméstico. En códices, como el De la Cruz-Badiano, hay datos relacionados con el uso de las cactáceas antes del año 1500 (Scheinvar, 1982).

En el México precortesiano era frecuente el uso de nopales y cardones para tratar procesos inflamatorios, escoriaciones y dolores musculares (Sánchez-Mejorada, 1982 citado por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a).

En cuanto a su papel en el desarrollo cultural de México, cabe recordar que el 18 de julio de 1325, en un islote en el lago de Texcoco, Tenoch y los nueve caudillos aztecas encontraron un águila posada sobre un nopal devorando una serpiente, en el lugar donde éste se encontraba se fundó la ciudad de Tenochtitlán. El nombre proviene de *tenochtli*, que significa “donde está el nopal silvestre” (Sodi, 1968 citado por González *et al.*, 2001). Desde el siglo XVI, la imagen del nopal ha formado parte de los símbolos patrios de México, como el Escudo Nacional (González *et al.*, 2001).

En la actualidad siguen siendo ampliamente utilizadas en la construcción de cercas vivas, como forraje, alimento humano, como plantas medicinales y ornamentales, así como en la obtención de fibras, dulces, colorantes y bebidas.

Como alimento humano, principalmente se consumen los tallos (cladodios) de especies del género *Opuntia*, en especial de *O. ficus-indica*, *O. streptacantha* y *O. robusta* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a), conocidos comúnmente como “nopalitos”. La principal región productora de nopalitos se encuentra al SE del Distrito Federal en la Delegación Milpa Alta (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a; De la Rosa y Santamaría, 1998).

Los frutos de *Opuntia* (tunas), representan un importante factor económico en diversas zonas de México como el SE de Zacatecas, la porción central de Hidalgo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a) y en el Valle de Teotihuacán en el Estado de México (Challenger, 1998), en especial en el municipio de San Martín de las Pirámides. En esta localidad es donde más se han desarrollado las

técnicas de cultivo de este fruto (De la Rosa y Santamaría, 1998) y cada año se celebra la “Feria Nacional de la Tuna” donde se presentan los avances en cuanto a la producción y manufactura de nuevos productos derivados del nopal, tuna y xoconostle tales como cremas, mermeladas, conservas, dulces, salsas, ates, pegamentos, pinturas, jabones y licores, entre otros. La mayor parte su producción satisface el mercado nacional, distribuyéndose desde la Ciudad de México a diversas partes del país; entre las especies comercializadas destacan *Opuntia albicarpa*, *O. Ficus-indica*, *O. robusta var. larreyi*, *O. matudae* y *O. oligacantha* (Scheinvar, 2004).

En la confitería tradicional mexicana los tallos de *Echinocactus platyacanthus* se utilizan para elaborar el dulce cristalizado “acitrón” o “dulce de biznaga” (Rzedowski, 1978 citado por Challenger, 1998; Jiménez, 2002).

Las pencas o cladodios de *Opuntia* y los tallos de *Echinocactus* y *Ferocactus* se utilizan como forraje para el ganado equino y caprino (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a; Jiménez, 2002), además de que frutos como pitayas (*Hylocereus undatus*) se emplean como alimento para cerdos, gallinas y avestruces. También han sido utilizadas para tratar dolores reumáticos, control de la diabetes (Scheinvar, 1982; De la Rosa y Santamaría, 1998), y como laxante (Cruse, 1949, Negata, 1971 citados por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a).

En el medio rural es frecuente su uso como cercas o setos vivos para la delimitación de propiedades (géneros *Stenocereus* y *Opuntia*). En la obtención de colorantes a partir de insectos parásitos pertenecientes al género *Dactylopius* de los que se obtiene “la grana” o “cochinilla de nopal”, que se desarrolla principalmente en los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, y cuyo uso se remonta a siglos antes del descubrimiento de América.

También se utilizan como fuente de mucílagos para la preparación de pegamentos y gomas adhesivas; como fuente de pectinas para la elaboración de mermeladas y jaleas; en la industria cosmetológica en la fabricación de jabones, cremas y lociones para el pelo.

En la actualidad, el uso de las cactáceas como plantas de ornato ha cobrado particular importancia, razón por la cual se han desarrollado diversos establecimientos comerciales dedicados a la producción y venta de cactáceas. Los países donde la producción comercial está más desarrollada son: Japón, Holanda, Bélgica, Inglaterra, Francia, Italia, España y los Estados Unidos de América (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a).

1.2.- Problemática de conservación

La destrucción y/o modificación de su hábitat y la sobrecolecta (colecta ilegal) constituyen las principales causas de la reducción de las poblaciones silvestres de cactáceas (Benson, 1977; Vovides y Gómez-Pompa, 1977; Sánchez-Martínez *et al.*, 1995; Challenger, 1998; Castro-Gallo *et al.*, 2002).

El cambio de uso de suelo en las zonas áridas y semiáridas es ocasionado principalmente por la conversión a tierras de uso agrícola (agricultura de riego) y pecuario (sobrepastoreo de ganado introducido). Además, la extracción ilegal de ejemplares de sus hábitats naturales para formar parte de diferentes colecciones, ocasiona la drástica reducción de las poblaciones silvestres de cactáceas (Glass, 1998).

Estos factores, aunados al lento crecimiento y baja capacidad de recuperación de las poblaciones naturales, hace de las cactáceas un grupo taxonómico con un alto índice de especies amenazadas o en peligro de extinción.

Por ejemplo, la NOM-059-SEMARNAT-2001 incluye alrededor de 255 taxa entre especies (239) y subespecies (16) en alguna categoría de riesgo: Amenazadas, en Peligro de extinción, sujetas a Protección Especial y probablemente Extintas del medio silvestre; mientras que la UICN ubica a 65 especies mexicanas en su lista roja (Arias *et al.*, 2005).

Respecto a su situación dentro del comercio internacional, el CITES incluye a toda la familia Cactaceae en su Apéndice II y cerca de 41 especies mexicanas en el Apéndice I, que es el más restrictivo (Benítez y Dávila, 2002; Guzmán *et al.*, 2003).

Los ecosistemas de las zonas áridas son particularmente frágiles y de lenta restauración, por lo que el mejor método para la protección de cactáceas es la preservación del hábitat (Benson, 1977; Vovides y Gómez-Pompa, 1977).

2.- Estrategias para la conservación de la biodiversidad

Se han propuesto dos formas de conservación de los recursos genéticos, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Primack, 2000).

La conservación *in situ* está orientada a preservar el medio silvestre o hábitat natural y las especies que éste contiene con la finalidad de proteger la diversidad genética y su dinámica dentro de las poblaciones (Heywood, 1992 citado por Primack *et al.*, 2001), para lo cual, plantea el establecimiento de Parques y Reservas de la Biosfera.

La conservación *ex situ* se desarrolla fuera del hábitat natural de las especies y se considera como complemento y apoyo a los esfuerzos de conservación *in situ* (Sánchez-Martínez *et al.*, 1995; CONABIO, 1998; Robinson,

1992 citado por Primack, 2000). Está orientada a prevenir la extinción de especies bajo condiciones artificiales y supervisión humana. Comprende el establecimiento de jardines botánicos, bancos de germoplasma y colecciones de cultivo de tejidos (Withers *et al.*, 1990; CONABIO, 1998; Primack, 2000, 2002). De modo que es posible preservar parte de la diversidad genética y en especial de especies que están en riesgo.

En los jardines botánicos es posible la conservación de especies de interés taxonómico, hortícola, amenazadas o en peligro de extinción (Fay, 1994; Vovides *et al.*, 1997). Primack (2002) señala que el jardín botánico de Kew, en Inglaterra, tenía un estimado de 25,000 especies de plantas bajo cultivo –alrededor del 10 % del total mundial- de las cuales 2,700 enfrentan problemas de extinción. En México el jardín botánico del Instituto de Biología de la UNAM, está involucrado en la propagación de cactáceas, orquídeas y cícadas amenazadas, tanto por medios tradicionales como mediante el cultivo de tejidos (Chávez y Rubluo, 1995).

Los bancos de germoplasma *in vitro* intervienen en la conservación de recursos genéticos, en particular de los cultivos que son propagados vegetativamente o con semillas recalcitrantes que no pueden ser almacenadas en las condiciones convencionales de un banco de semillas (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Withers *et al.*, 1990; Fay, 1994).

2.1.- El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El CTV comprende un conjunto de técnicas basadas en el principio de la totipotencialidad celular. Estas técnicas permiten establecer en condiciones asépticas estructuras vegetales, células, órganos y tejidos (explantos) en medios

de cultivo nutritivos químicamente definidos y bajo condiciones ambientales controladas.

Estas técnicas de propagación presentan ventajas sobre los métodos tradicionales ya que a partir de poco material vegetal, es posible obtener la rápida propagación de un gran número de plantas libres de patógenos.

Las principales aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son: la selección de variantes somaclonales, el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma y la micropropagación.

La micropropagación es una técnica del cultivo de tejidos que desarrolla un sistema de propagación clonal, masiva de material vegetal, libre de patógenos con la subsecuente regeneración de nuevas plantas. La micropropagación se ha concentrado en la conservación de recursos genéticos vegetales de especies alimenticias, medicinales, forestales y ornamentales (Mazari y Rubluo, 1984 citados por Chávez y Rubluo, 1995; Pérez *et al.*, 1999; López-Escamilla, 2000; Selvakumar *et al.*, 2001).

Las formas de regeneración vegetal o vías morfogénicas son: la organogénesis y la embriogénesis somática.

La *organogénesis* define la formación y crecimiento de primordios unipolares (brotes) a partir de yemas, es decir, se originan plántulas incompletas por lo que es necesario promover su enraizamiento. En este caso existe siempre una conexión vascular entre los nuevos brotes y el tejido paterno (Jiménez-González, 1998a).

Dentro de la organogénesis se diferencian dos vías:

1).- Elongación de yemas axilares (activación areolar) se estimula el desarrollo de las yemas axilares, se presenta cuando se rompe la dominancia apical por la

adición de reguladores del crecimiento (citocininas) al medio de cultivo. Los individuos regenerados son genéticamente estables por lo que es el método más utilizado en la propagación comercial (Evans, 1990; Jiménez-González, 1998a).

2).- Formación de yemas adventicias permite la formación *de novo* de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o un pequeño grupo de células, cuando los explantes se cultivan en medios con elevadas concentraciones de citocininas (Jiménez-González, 1998a). Puede ser directamente del explante (organogénesis directa) o a partir de un callo (organogénesis indirecta), el cual consiste en una masa de tejido desorganizado de células vegetales inducido por la adición de reguladores del crecimiento (auxinas) al medio de cultivo (Schaeffer, 2003). Debido al origen unicelular de las yemas adventicias en esta vía existe una alta probabilidad de que se produzca variación somaclonal.

En la *embriogénesis somática* se obtiene la formación de embriones a partir de células que no son producto de la fusión de gametos. Los regenerantes son estructuras bipolares con un meristemo apical y uno radicular, los cuales no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y desarrollarse como plantas normales (Jiménez-González, 1998a).

La micropropagación comprende las siguientes etapas:

Etapas 0.- Selección del material vegetal

El material biológico que se va a utilizar como fuente de explantes debe encontrarse libre de contaminación. El explante debe ser fisiológicamente competente, es decir, capaz de regenerar nuevos individuos.

Etapa 1.- Establecimiento *in vitro*

El material vegetal se somete a un lavado en detergente y un proceso de desinfección en soluciones de alcohol e hipoclorito de sodio (NaOCl, cloro comercial), las concentraciones y tiempos de exposición varían dependiendo del tipo de material vegetal. También es común el uso de soluciones surfactantes como el Tween 80 para romper la tensión superficial del agua y permitir a las soluciones estar en contacto con el material vegetal.

En cactáceas, comúnmente se han utilizado como fuente de explantes diferentes secciones del tallo (apicales, laterales o basales), tubérculos y aréolas (yemas axilares); mientras que el medio de cultivo más utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962).

Vyskot y Jára (1984) señalan que es recomendable el uso de fragmentos de plantas jóvenes o de plántulas germinadas *in vitro*, debido a que su potencial morfogénico es mayor y se reduce considerablemente la incidencia de contaminación tanto bacteriana como fúngica.

Etapa 2.- Inducción y proliferación de brotes

En esta etapa se induce la formación y proliferación de brotes por la adición de hormonas al medio de cultivo. Las hormonas más utilizadas en la micropropagación son las citocininas y las auxinas. Las auxinas promueven la elongación celular y el desarrollo de la raíz, mientras que las citocininas promueven la división celular. En cactáceas, las citocininas son utilizadas para romper la latencia de las yemas axilares, y en general en la proliferación de brotes; algunas de las más utilizadas son la N⁶-Benciladenina (BA) y la Kinetina (K), en concentraciones de 1-2 mg/L.

Las auxinas generalmente se utilizan para promover la formación de callo y en la inducción de raíces, entre las empleadas con mayor frecuencia se encuentran el Ácido α -naftalenacético (ANA), el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el Ácido Indolacético (AIA), en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L.

En la inducción y proliferación de brotes generalmente se emplea una mayor concentración de citocininas respecto de las auxinas, sin embargo, es necesario determinar el balance hormonal más adecuado para cada especie.

Litz y Jaiswal (1991) y Olguín (1994) señalan que la inducción y desarrollo de los brotes están determinados por el tipo de explante, así como por el tipo y concentración de reguladores del crecimiento contenidos en el medio de cultivo.

Etapa 3.- Enraizamiento de los brotes

Durante esta etapa se promueve el enraizamiento de los brotes individualizados; la formación de raíces en cactáceas comúnmente se reporta en el medio MS basal sólo o adicionado con diferentes concentraciones de auxinas o carbón activado (CA).

Por ejemplo, en *Astrophytum myriostigma* y *Coryphantha elephantidens* se reportan en medio MS basal porcentajes de enraizamiento del 100% (Jiménez-Rodríguez *et al.*, 2001; Wakhlu y Bhau, 2000); mientras que en medio MS 50% la regeneración de raíces en brotes de *Turbinicarpus laui* se obtuvo después de sólo dos semanas de inducción (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

También se han obtenido resultados favorables en medio adicionado con las auxinas AIA, ANA y AIB en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002); mientras que con la adición de 3 g/L de CA se ha observado un rápido

crecimiento de los brotes, seguido de elevados porcentajes de enraizamiento (100%) (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Castro-Gallo *et al.*, 2002).

La obtención de plántulas completas es un paso fundamental en la micropropagación, es por ello que la formación de raíces determina en gran parte su éxito en condiciones *ex vitro*.

Etapa 4.- Aclimatización

Durante esta etapa las plantas se preparan para su transferencia a condiciones *ex vitro*, mediante este proceso se pretende maximizar su sobrevivencia.

Las condiciones propias del cultivo *in vitro* pueden inducir alteraciones morfofisiológicas en las plantas como la baja funcionalidad de los estomas, la escasa producción de ceras epicuticulares, limitada actividad fotosintética e hiperhidratación. La hiperhidratación que consiste en un incremento de agua en los tejidos (Debergh *et al.*, 1992), es un desorden fisiológico que se deriva de factores como: elevada humedad relativa, exceso de carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores del crecimiento, baja intensidad luminosa e inadecuado intercambio gaseoso del recipiente de cultivo (Evans, 1990; Ziv, 1991; Pérez-Tornero *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003b).

Estas alteraciones se reflejan en una reducción en la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*, por lo que se han ensayado diferentes estrategias enfocadas a incrementar su sobrevivencia como son la reducción de la humedad relativa y/o el incremento en la intensidad luminosa para inducir el funcionamiento de los estomas.

El uso de contenedores ventilados reduce la humedad relativa, promueve el funcionamiento de los estomas y la producción de ceras epicuticulares que reducen el nivel de pérdida de agua a través de la cutícula, que se refleja en un

mayor porcentaje de sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro* (Malda *et al.*, 1999a y Talavera *et al.*, 2001). Otras estrategias se han enfocado a realizar ajustes en la formulación de los medios de cultivo en etapas previas al establecimiento *ex vitro*.

2.1.1.- Micropropagación en cactáceas

La mayoría de las investigaciones sobre cultivo de cactáceas se han concentrado en la conservación de recursos genéticos, en particular en especies que revisten un interés ecológico, económico (ornamentales) y/o con algún grado de amenaza o en peligro de extinción (Mauseth, 1979; Debergh y Maene, 1981; Gratton y Fay, 1990; Bonness *et al.*, 1993).

Los primeros intentos de cultivo *in vitro* en cactáceas se remontan a 1957, cuando King indujo la formación de callo en varias especies (Starling y Dodds, 1983). Fue hasta 1976 que se reportó por Kólar y colaboradores la regeneración de brotes vía callo a partir de tejido medular cultivado en medio MS adicionado con 2 mg/L de K (Olguín, 1994) a partir de ahí se han realizado numerosos ensayos para lograr la micropropagación de diversos miembros de la familia Cactaceae (Tabla 1). Se destaca el trabajo de Martínez-Vázquez y Rubluo en 1989, con *Mammillaria san-angelensis*, cactácea endémica del Pedregal de San Angel, al sur de la Ciudad de México, ya que a partir de sólo ocho semillas provenientes de cinco plantas se logró la regeneración, reintroducción y restablecimiento de las plántulas en su hábitat natural evitando la extinción de la especie (CONABIO, 1998).

Tabla 1.- Estudios realizados para la propagación *in vitro* de diversos miembros de la familia Cactaceae

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO MS + HORMONAS (mg/L)	BROTOS POR EXPLANTE (%±DS)	REFERENCIA
<i>Mammillaria woodsii</i>	fracciones de tallo (tejido medular)	K (2.0) + AIA (2.0)	n.d	Kólar <i>et al.</i> , 1976 **
<i>Mammillaria elongata</i>	tubérculos	2iP (10.0) + AIA (1.0)	n.d	Johnson y Emino, 1979 *
<i>Epiphyllum chrysocardium</i>	fracciones de tallo	BA (1.0) + ANA (0.1)	n.d	Lazarte <i>et al.</i> , 1982 *
<i>Mammillaria carmenae</i>	tubérculos	BA (2.0) + ANA (1.0)	n.d	Vyskot y Jára, 1984
<i>Leuchtenbergia principis</i>	apical	BA (10.0) + ANA (0.1)	25	Starling, 1985
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	fracciones de tallo	BA (1.0)+ ANA (0.01)	n.d	Martínez-Vázquez y Rublúo, 1989 **
<i>Echinocactus grusonii</i>	fracciones de tallo	K (4.3) + AIA (0.8)	n.d	Frías, 1989 *
<i>Mammillaria haageana</i>	fracciones de tallo	BA (1.0)	n.d	Martínez-Vázquez y Rublúo, 1989 *
<i>Mediocactus coccineus</i>	apical	BA (1.0) + ANA (0.05)	n.d	Infante, 1992 *
<i>Mammillaria huitzilopochtli</i>	fracciones de tallo	BA (1.0)	n.d	Rublúo <i>et al.</i> , 1993 **
<i>Coryphantha clavata</i>		BA (1.0)	4.73 ± 0.512	
<i>Coryphantha durangensis</i>		BA (1.0) + ANA (0.01)	4.37 ± 0.492	
<i>Coryphantha radians</i>		BA (1.0)	4.15 ± 0.475	
<i>Echinocactus platyacanthus</i>		BA (1.0)	9.00 ± 0.985	
<i>Echinocereus dubius</i>		BA (1.0) + ANA (0.01)	4.87 ± 0.722	
<i>Echinocereus pectinatus</i>		BA (1.0) + ANA (0.01)	3.86 ± 0.966	
<i>Echinofossulocactus sp.</i>		BA (1.0)	12.05 ± 1.65	
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>		BA (1.0) + ANA (0.1)	5.83 ± 0.625	
<i>Ferocactus histrix</i>		BA (1.0) + ANA (0.01)	5.62 ± 0.630	
<i>Ferocactus latispinus</i>	transversales de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	BA (1.0) + ANA (0.1)	5.333 ± 0.834	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Ferocactus pilosus</i>		BA (1.0) + ANA (0.1)	5.125 ± 0.450	
<i>Mammillaria candida</i>		BA (1.0)	13.25 ± 2.37	
<i>Mammillaria craigii</i>		BA (1.0)	4.65 ± 0.349	
<i>Mammillaria formosa</i>		BA (1.0) + ANA (0.1)	4.42 ± 0.460	
<i>Mammillaria obscura</i>		BA (1.0) + ANA (0.1)	4.78 ± 0.510	
<i>Mammillaria sphaelata</i>		BA (1.0) + ANA (0.01)	17.50 ± 2.56	
<i>Mammillaria uncinata</i>		BA (1.0)	5.25 ± 0.432	
<i>Stenocactus coptonogonus</i>		BA (1.0)	16.75 ± 2.47	
<i>Schlumbergera truncata</i>	fracciones de tallo	BAP (20.0)	10	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Cephalocereus senilis</i>	fracciones de tallo	BA (10.0)	1.67	Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000
<i>Epithelantha micromeris</i>	brotos regenerados <i>in vitro</i> (n.d)	K (8.0)	17.25	Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001
<i>Carnegiea gigantea</i>		BA (2.0)	5.3 ± 0.5	
<i>Pachycereus pringlei</i>	transversales	BA (1.0)	3.8 ± 0.3	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<i>Stenocereus thurberi</i>		BA (1.0)	4.3 ± 0.4	
<i>Coryphantha elephantidens</i>	apical	BA (4.0)+ ANA (0.1)	2.9 ± 0.6	
<i>Mammillaria bocasana</i>	lateral	BA (2.0) + ATIB (2.0)	7.4 ± 0.4	
<i>Mammillaria oteroi</i>	lateral	BA (2.0)	5.3 ± 0.4	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Pachycereus schottii</i>	transversal	BA (3.0)	4.3 ± 0.6	
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	apical	BA (2.0)	9.6 ± 1.3	
<i>Thelocactus hexaedophorus</i>	apical	2ip (6.0)	13.6 ± 1.1	
<i>Pelecophora aselliformis</i>	hipocótilo (segmentos laterales)	BA (1.81)	5	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003

K—Kinetina; AIA—Ácido indolacético; 2iP—N⁶-2-isopentil-adenina; BA—N⁶-benciladenina; ANA—Ácido α-naftalenacético; BAP—6-Bencilaminopurina; ATIB—Ácido 2,3,5-triyodobenzóico. n.d—no determinado. * Tomado de Olguín (1994); ** Tomado de Rublúo (1997)

En cada uno de los trabajos señalados se han utilizado diferentes tipos de explantes: apicales, laterales o basales cultivados en medio MS adicionado con citocininas solas o en combinación con auxinas (ANA y AIA). La citocinina BA en concentraciones de 1-2 mg/L, es la más empleada en los cultivos *in vitro* y *Mammillaria* el género con el mayor número de trabajos reportados.

Asimismo, en otros trabajos se ha logrado la regeneración de cactáceas por embriogénesis somática, entre ellos se encuentran el de Minocha y Mehra (1974) con *Neomammillaria prolifera*; el de Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) con *Aztekium ritteri*. El de Infante en 1992 con *Mediocactus coccineus* (Infante, 1992 citado por Olguín, 1994); los de Stuppy y Nagl (1992) y Olguín (1994) con *Ariocarpus retusus* y el de Malda *et al.* (1999b) con *Obregonia denegrii*.

3.- *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae)

Durante la primera mitad del siglo XX, De Candolle describió una planta provista de ocho costillas y con tricomas en el tallo, a la que colocó en el género colectivo de *Echinocactus*, bajo el nombre de *Echinocactus ornatus* (Arias-Montes, 1989). Años después Charles Lemaire propuso un nuevo género al que designó como *Astrophytum*, nombre que proviene del griego *Aster* que significa estrella y *phyton* planta, donde se ubicó a *Astrophytum ornatum*, cuyo nombre significa “ornamento” o “de ornato” (Glass, 1998) que alude a su aspecto ornamental.



Figura 1. Ejemplar de *A. ornatum* en Venados, Metztitán, Hgo. (Tomado de Hooek, 2001).

Cactácea con tallo en principio esférico y hasta columnar según la edad (llega a medir hasta 2 m); no se ramifica a menos que sufra daños mecánicos. En los individuos jóvenes la epidermis está cubierta de abundantes estigmas escamosos (tricomas) que son menos conspicuos en tallos adultos, algunos no los presentan (Sánchez-Mejorada, 1978; Arias-Montes, 1989; CONANP, 2003) (Figura 1). Debido a ésta característica la especie es comúnmente conocida como

“liendrilla” o “biznaga liendrilla” (Apéndice 1) (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b; Arias-Montes, 1989). La presencia de tricomas se considera una

adaptación a las zonas áridas, ya que condensan el agua atmosférica y reflejan la radiación solar (Challenger, 1998).

Esta especie se localiza en los estados de Guanajuato (noroeste), San Luis Potosí (sureste) (Guzmán *et al.*, 2003), las zonas montañosas del centro y norte de Querétaro (Barrancas del río Moctezuma y en la cuenca del río Extórax) (Glass, 1998) y en el estado de Hidalgo. En éste último se distribuye en las laderas de las barrancas de Tolantongo, Tolimán y del río Tula (Hájek, 1977; Sánchez-Mejorada, 1978; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b; Scheinvar, 1993) y en las laderas calizas de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, desde unos 10 km al Este del poblado de Metztitlán, hasta los cerros que bordean la laguna (Alonso, 1964; Sánchez-Mejorada, 1978). Crece en compañía de especies como *Agave xylonacantha*, *A. lechuguilla*, *A. striata* y *Hechita argentea* entre otras (Hájek, 1977).

La extracción ilegal de plantas silvestres con fines de uso ornamental, es la causa principal de la reducción de las poblaciones silvestres del género *Astrophytum*. Debido a los altos precios que llegan a alcanzar en diversos mercados del mundo, por ejemplo en Japón en 1987, algunos ejemplares de *Astrophytum* se vendían hasta en 1300 dólares (Milliken, 1987 citado por Olguín, 1994).

Las especies pertenecientes al género *Astrophytum* figuran entre las más apreciadas por coleccionistas (CITES, 2001a; CITES, 2001b, CITES, 2002; Benítez y Dávila, 2002).

Debido a que son especies de lento crecimiento que pueden tardar hasta 4-5 años en florecer, su sobrecolecta afecta drásticamente a las poblaciones naturales que se regeneran muy lentamente.

Gracias a las nuevas políticas de uso sustentable y a las encaminadas al control del comercio internacional de estas especies, se ha fomentado su propagación en viveros para su venta legal en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, en Hidalgo; no obstante, es preciso evitar la colecta y perturbación de las poblaciones silvestres.

Esta especie se encuentra clasificada en la NOM-059-SEMARNAT-2001, en la categoría de Amenazada de extinción (A) (SEMARNAT, 2002; Guzmán *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2005). Se ubica en el Apéndice II del CITES, el segundo más restrictivo para su llevar a cabo su comercialización (Glass, 1998). Mientras que en las listas más recientes de especies amenazadas de la UICN no esta incluida (Arias *et al.*, 2005).

Son pocos los trabajos de micropropagación con el género *Astrophytum*, la mayoría se han llevado a cabo con *A. myriostigma*. En la tabla 2 se muestran los resultados de trabajos de cultivo *in vitro* realizados con este género. Los explantes apicales y laterales son los utilizados con más frecuencia; BA en concentraciones de 1.0-3.0 mg/L (sola o en presencia de las auxinas ANA, AIA ó 2,4-D) es la citocinina más utilizada, aunque también es común el uso de kinetina. Entre las principales respuestas morfogénicas obtenidas se encuentran la formación de callo, la organogénesis directa y por activación areolar.

Tabla 2. Estudios de propagación *in vitro* realizados con el género *Astrophytum*

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO MS + HORMONAS (mg/L)	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>Astrophytum myriostigma</i>	aréolas	K (0.5) + AIA (5.0)	brotos	Vyskot y Jára, 1984
<i>Astrophytum myriostigma</i>	transversales (plantas de invernadero)	BA (1.0) + ANA (0.01)	callo/activación areolar	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Astrophytum myriostigma</i>	apical y basal	BA (2.0)	organogénesis directa y activación areolar	Villavicencio-Gutiérrez <i>et al.</i> , 1999
<i>Astrophytum myriostigma</i>	longitudinales	BA (2.0) y (3.0)	organogénesis directa	Jiménez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2001
<i>Astrophytum ornatum</i>	apical lateral	BA (1.0) y (2.0) BA (2.0)	activación areolar	Castro-Gallo <i>et al.</i>, 2002
<i>Astrophytum myriostigma</i>	ápices y tallo	BA (3.0)	brotos	Vázquez-Zalapa <i>et al.</i> , 2004
<i>Astrophytum capricorne</i>	meristemo apical	BA (3.0) + 2,4-D (0.2)	brotos	Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 2004
<i>Astrophytum asterias</i>	plántulas germinadas <i>in vitro</i> (n.d)	BA (0.5) + ATIB (1.0)	activación areolar	Lizalde-Viramontes <i>et al.</i> , 2004.

K—Kinetina; AIA—Ácido indolacético; BA—N⁶-benciladenina; ANA—Ácido α -naftalenacético; 2,4-D—Ácido 2,4 diclorofenoxiacético; ATIB—Ácido 2,3,5-triyodobenzóico. n.d—no determinado.

El único trabajo de cultivo *in vitro* con *A. ornatum* del que se tiene reporte lo realizaron Castro-Gallo *et al.* (2002) donde obtuvieron a partir de explantes apicales y laterales en la combinación hormonal BA/ANA 2/0 mg/L un promedio de 11 y 4.7 brotes por explante respectivamente, el 73% de enraizamiento *in vitro* con AIA 1 mg/L y porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* de 96%.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia ecológica de *A. ornatum*, así como por su valor ornamental y estar considerada como Amenazada de extinción, es importante establecer estrategias que permitan su propagación y contribuyan a la conservación de sus poblaciones silvestres a través de las técnicas de cultivo de tejidos, que puedan ser empleadas eficazmente en esta especie y posteriormente aplicadas en otros miembros de este género.

Por lo anteriormente mencionado se plantearon los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVOS

1.- General

- Establecer las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae).

2.- Particulares

- Evaluar las respuestas morfogénicas según los diferentes reguladores del crecimiento utilizados.
- Determinar la combinación y concentración hormonal adecuada para la inducción de brotes.
- Inducir el enraizamiento de los brotes.
- Lograr el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1.- Establecimiento y germinación *in vitro* de *Astrophytum ornatum*

Semillas de *Astrophytum ornatum* procedentes de la “Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlán” (RBBM), Metztitlán, Hidalgo; se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel encerado.

Las semillas se escarificaron durante 15 segundos en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), posteriormente se lavaron en una solución de 50 ml de agua destilada y tres gotas de Dawn® (detergente líquido comercial) durante 20 minutos, enseguida se enjuagaron en 50 ml de agua destilada con 3 gotas de “Tween 80” y 3 de Microdyn® (bactericida comercial; plata coloidal 0.35%) durante 30 minutos, se desinfectaron con alcohol etílico 70% (v/v) durante 2 minutos, seguido de 30 minutos en 50 ml de hipoclorito de sodio (NaOCl, 6% cloro activo) al 30% (v/v). Por último en condiciones asépticas (campana de flujo laminar) las semillas se sometieron a tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Todo el proceso se realizó en agitación constante.

Se sembraron 45 semillas en cada uno de los siguientes medios de cultivo (Apéndice 2): 1) MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30 g/L; 2) MS al 50% de todos sus componentes (MS 50%) y 3) agua con agar (A/A). En todos los medios el pH se ajustó a 5.7-5.8 y se utilizó agar bacteriológico Bioxón® 8g/L.

Se sembraron cinco semillas por cada frasco Gerber® con 30 ml de medio de cultivo y se mantuvieron en incubación a $26\pm 2^\circ$ C, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa de $60-65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las semillas se observaron durante los 30 días posteriores a la siembra.

2.- Inducción y proliferación de brotes

A partir de plántulas germinadas *in vitro* de 1-1.5 cm de longitud seccionadas mediante un corte transversal y otro longitudinal, se obtuvieron dos explantes longitudinales (Figura 2).

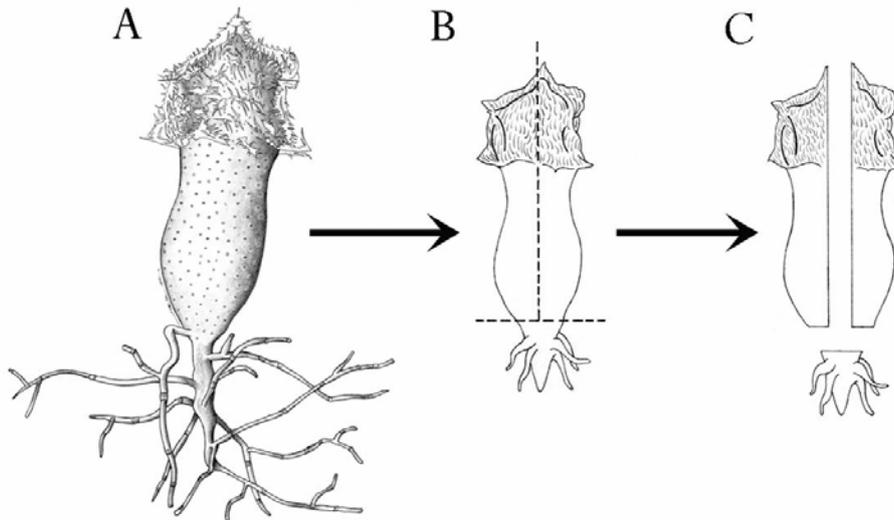


Figura 2. **A**—Plántula de *A. ornatum* a partir de semillas germinadas *in vitro*. **B**—cortes transversal y longitudinal para la obtención de explantes. **C**—explantes longitudinales.

Los explantes se colocaron en medio de cultivo MS con sacarosa 30 g/L, agar 8 g/L y pH 5.7-5.8 adicionado con N⁶ benciladenina (BA) ó Kinetina (K) en concentraciones de 0, 1 y 2 mg/L combinadas respectivamente con 0, 0.5 y 1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) ó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (medios de inducción). Se establecieron nueve tratamientos para cada combinación hormonal y se sembraron ocho explantes por tratamiento, uno por cada frasco Gerber® con 30 ml de los medios de inducción (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de N⁶-benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) (BA/ANA) ó Kinetina (K) y 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (K/2,4-D) utilizadas para inducir la formación *in vitro* de brotes de *Astrophytum ornatum* (Cactaceae).

	BA	K	(mg/L)	
	0	0	1	2
ANA	0	0/0	1/0	2/0
2,4-D	0.5	0/0.5	1/0.5	2/0.5
(mg/L)	1	0/1	1/1	2/1

Los cultivos fueron incubados a 26±2° C, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa 60-65 μmol·m⁻²·s⁻¹, permanecieron 8 semanas en medio de inducción y posteriormente fueron subcultivados a medio MS basal, donde se determinaron y evaluaron las respuestas morfogénicas obtenidas; el número de brotes regenerados por tratamiento se registró después de 16 y 40 semanas de cultivo en medio MS.

Repetición de tratamientos

De acuerdo a los resultados obtenidos, se llevó a cabo una repetición con el tratamiento de cada combinación hormonal donde se obtuvo el mayor número de brotes. Se utilizaron 30 explantes longitudinales obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* que se sembraron de forma individual en frascos Gerber® con 30 ml de medio de inducción.

Después de mantenerlos 8 semanas en medio de inducción y 16 semanas en medio MS se obtuvo el número total de brotes por explante. Sólo se consideraron los brotes que fue posible individualizar (brotes viables) y no presentaron hiperhidratación.

3.- Individualización y pruebas de enraizamiento

Brotos de 10 a 15 mm de longitud, provenientes de distintos tratamientos de BA/ANA y K/2,4-D se individualizaron y subcultivaron en los siguientes medios para estimular su enraizamiento:

- 1) Medio MS 100% (MS 100%)
- 2) Medio MS 50% (MS 50%)
- 3) Medio MS suplementado con 3 g/L de carbón activado (MS+CA)
- 4) Medio MS adicionado con 1 mg/L de ácido α -naftalenacético (MS+ANA).

Se sembraron 30 brotes en cada medio de cultivo y permanecieron en incubación a $26\pm 2^\circ$ C, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa $60-65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La formación de raíces se evaluó cada semana durante las 9 semanas posteriores al subcultivo. Se consideró como brote enraizado aquel que presentó una raíz de más de 5 mm de longitud.

4.- Crecimiento *in vitro*

Los brotes enraizados fueron transferidos a medio MS líquido sacarosa 15 g/L y se comparó su crecimiento *in vitro* con brotes colocados en medio MS sólido 15 g/L de sacarosa. Se sembraron en total 100 brotes en medio MS líquido, sacarosa 15 g/L en puentes de papel filtro (50 provenientes de los tratamientos de BA/ANA y 50 de K/2,4-D) y 50 brotes en medio MS sólido.

Como parámetros de crecimiento se consideraron la longitud del tallo y la raíz, el diámetro del tallo y el peso fresco de los brotes. Las mediciones se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar después de 12 y 24 semanas de incubación a $26\pm 2^\circ$ C, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa $60-65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.- Aclimatización *in vitro* y establecimiento *ex vitro*

Para estimular su sobrevivencia *ex vitro*, los brotes enraizados se sometieron a un proceso de aclimatización *in vitro*. Se colocaron en puentes de papel filtro y 25 ml de medio de cultivo MS líquido al 50%, adicionado con sacarosa 7.5 g/L en contenedores ventilados formados por recipientes de vidrio Gerber® de 110 ml de capacidad, con tapas de polipropileno a las cuales se les realizó un orificio central de 8 mm de diámetro, el cual se cubrió por ambos lados con una capa de cinta Micropore®.

Los cultivos permanecieron durante 12 semanas en etapa de aclimatización *in vitro* y fueron incubados a $26\pm 2^{\circ}$ C, fotoperiodo 16/8 e intensidad luminosa $60-65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se comparó la sobrevivencia *ex vitro* de 50 brotes enraizados con etapa de aclimatización *in vitro* y 50 sin etapa de aclimatización (procedentes de medio MS sólido y recipientes sellados). La mitad de los brotes enraizados de cada tratamiento (25) se obtuvieron de la combinación BA/ANA y la otra mitad de K/2,4-D.

Los brotes enraizados se colocaron en condiciones *ex vitro* en una mezcla de piedra pómez y materia orgánica (tierra de hoja) proporción (1:1) en charolas de plástico con tapas transparentes para mantener la humedad relativa. Después de 6 semanas se transfirieron a contenedores individuales y se mantuvieron en condiciones de invernadero.

Cada mes se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, el porcentaje final se registró después de 22 semanas de su establecimiento *ex vitro*.

En la figura 3 se muestra el procedimiento empleado en la micropropagación de *A. ornatum*.

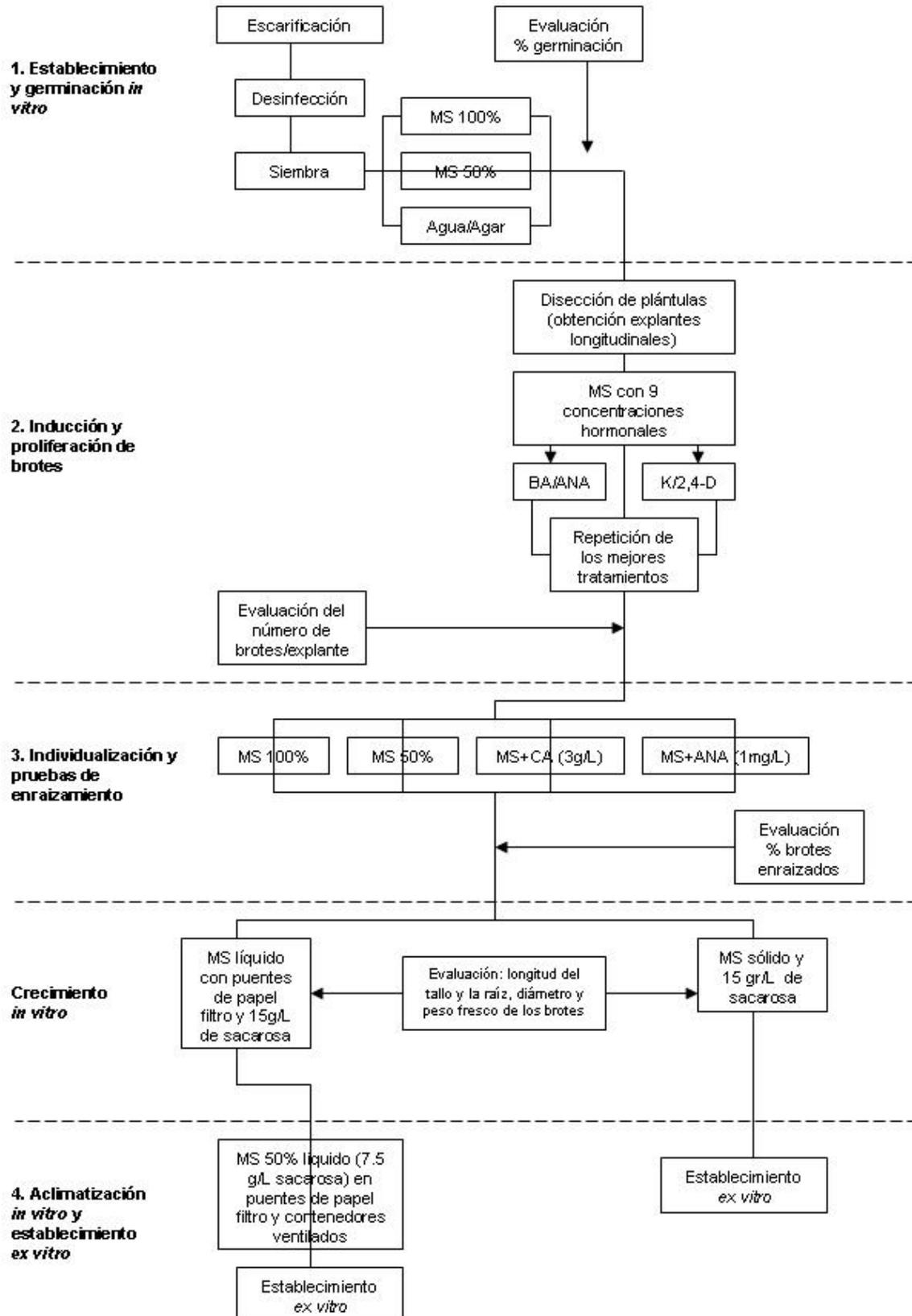


Figura 3.- Procedimiento empleado en la micropropagación y establecimiento *ex vitro* de *Astrophytum ornatum*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Germinación

La germinación consiste en la reactivación del metabolismo de la semilla, inicia con la asimilación de agua (imbibición) y termina con la emergencia de la radícula o hipocótilo a través de la testa (Bewley y Black, 1978). La testa constituye la principal barrera para la germinación de las semillas, debido a la presencia de inhibidores químicos y a que es impermeable a agua y gases (Arias y Lemus 1984 citados por Rabenda, 1990). En el presente estudio se consideró como semilla germinada aquella que presentó fractura de la testa y emergencia de la radícula.

Bregman y Bouman (1983) en un estudio donde se describen las semillas de varias cactáceas proponen que las del género *Astrophytum* son de tipo inoperculado, es decir no forman un opérculo; ésta especie posee semillas naviculares en “forma de sombrerete”.

Se observó que después de la asimilación de agua (imbibición) se produjo la rotura de la testa causada por el crecimiento del embrión. Se produjeron dos fracturas, la primera a lo largo de la cresta dorsal de la semilla y otra a nivel de su extremo lateral, asociada a pequeñas roturas laterales. El crecimiento de la radícula produjo pequeñas fracturas laterales en la testa y una vez que la radícula emergió completamente desarrolló pelos radiculares en la parte basal.

Con respecto al hipocótilo, al tiempo que éste se desarrolló, la cubierta seminal permaneció cubriendo los cotiledones y el meristemo apical, cuando el hipocótilo emergió totalmente la cubierta seminal se desprendió y los cotiledones se hicieron evidentes.

La germinación se presentó al segundo día de incubación, en el agua con agar (11.11%) y en medio MS 50% (4.44%), mientras que en medio MS 100% se presentó al cuarto día con el 6.66% (Tabla 4).

Tabla 4. Número de semillas de *A. ornatum* germinadas *in vitro* y porcentaje acumulado de germinación en los medios de cultivo: MS 50%, MS 100% y A/A. Evaluación por 30 días.

Tiempo (Días)	MS 50%		MS 100%		Agua/Agar	
	Semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)		Semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)		Semillas germinadas/total de semillas sembradas (%)	
0	0/45	0	0/45	0	0/45	0
2	2/45	4.44	0/45	0	5/45	11.11
4	8/45	17.77	3/45	6.66	7/45	15.55
6	25/45	55.55	6/45	13.33	19/45	42.22
8	33/45	73.33	8/45	17.77	23/45	51.11
10	33/45	73.33	17/45	37.77	23/45	51.11
12	34/45	75.55	31/45	68.88	25/45	55.55
14	35/45	77.77	34/45	68.88	31/45	68.88
16	35/45	77.77	34/45	75.55	31/45	68.88
18	36/45	80	34/45	75.55	33/45	73.33
20	36/45	80	34/45	75.55	33/45	73.33
22	37/45	82.22	35/45	77.77	34/45	75.55
24	37/45	82.22	35/45	77.77	34/45	75.55
26	37/45	82.22	35/45	77.77	34/45	75.55
28	37/45	82.22	35/45	77.77	34/45	75.55
30	37/45	82.22	35/45	77.77	34/45	75.55

Es probable que en los medios de cultivo MS 100% y MS 50% las semillas retarden más su germinación debido a que las sales disueltas en ellos limitan la disponibilidad de agua, esto hace lenta la imbibición por lo que el proceso germinativo se retrasa (Rosas, 2002), de modo que la germinación en MS 50% y MS 100% requiere de un mayor tiempo.

En los tres medios de cultivo la germinación se estabilizó a los 22 días de incubación (Tabla 4); después de 30 días, el más alto porcentaje de germinación se presentó en medio MS 50% (82.2%), seguido de MS 100% (77.7%), y finalmente en agua con agar (75.5%) a pesar de ser el medio que inició la germinación más rápidamente.

Es importante mencionar que son pocos los reportes de germinación con el género *Astrophytum*, la mayoría de ellos se han realizado con *A. myriostigma*, por ejemplo, Arredondo-Gómez y Camacho (1995) y Beristain (1997) evaluaron la germinación en semillas colocadas en cajas petri sobre papel filtro húmedo y obtuvieron el mayor número de semillas germinadas entre el 5-6 día de incubación. En el presente trabajo se observó que el porcentaje de germinación al sexto día de incubación fue de 55.5% en medio MS 50%, de 42.2% en agua con agar y de sólo el 13.3% en el medio MS 100% (Tabla 4).

La ausencia de germinación en algunas semillas puede explicarse debido a factores como la escasa permeabilidad de la cubierta seminal, inmadurez del embrión, inviabilidad de las semillas o estado de latencia (Santos-Díaz *et al.*, 2003 a, b). En algunos casos, las condiciones ambientales a las cuales las plantas madres están expuestas durante la formación y maduración de las semillas pueden ocasionar su dormición (Rabenda, 1990), motivo por el cual algunas semillas de cactáceas no germinan aún cuando las condiciones existentes sean favorables. Vázquez-Yañez y Rodríguez-Hernández (1995) consideran que la resistencia a la desecación, así como el prolongado estado latente son características que han sido adquiridas en el curso de la evolución; Santos-Díaz *et al.* (2003b) señalan que la reducción de la viabilidad de las semillas también puede estar dada por el daño que sufre el embrión durante el proceso de desinfección.

El proceso de escarificación (simula las condiciones a las que las semillas pueden estar expuestas en la naturaleza) se efectúa para romper la dormición de las semillas, por lo general se utiliza ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) (escarificación química), aunque también se pueden utilizar peróxido de

hidrógeno, ácido clorhídrico, nitrato de potasio y acetona (Roberts, 1972, Young y Young, 1986 citados por Rabenda, 1990).

En algunas cactáceas en estado silvestre este proceso se efectúa cuando las semillas al ser ingeridas por murciélagos, son liberadas de los inhibidores de la germinación a través de ácidos digestivos con lo cual aceleran su proceso de germinación (Stiles, 1989 citado por Rojas-Martínez, 2003). Al respecto, Escobar-Santos y Huerta-Martínez (1999) observaron que el paso de semillas de *Ferocactus histrix* por el tracto digestivo de algunos mamíferos (*Sylvilagus* sp.) aceleró su proceso germinativo en más de un 50%.

Durante la germinación de las semillas no se observó la presencia de contaminación por lo que la presente técnica de desinfección se considera favorable para esta especie.

Los porcentajes y tiempos de germinación fueron más elevados a los obtenidos en otras cactáceas, por ejemplo en agua con agar Oliveira *et al.* (1995) reportan para *Cereus peruvianus* porcentajes de germinación del 15% a los 20 días de la siembra; mientras que en el presente estudio, en agua con agar se alcanzaron porcentajes de germinación de 73.3% en el mismo periodo de tiempo.

En medio MS 100% Giusti *et al.* (2002) reportan en *Mammillaria pectinifera*, *Escobaria minima* y *Pelecypora aselliformis* porcentajes de germinación del 23%, 69% y 46% respectivamente; mientras que en *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* se obtuvieron porcentajes aproximados de germinación de 50% (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002); ambos trabajos no especifican los tiempos en que se evaluó la respuesta. A diferencia de estos resultados, en MS 100% se obtuvieron para *Astrophytum ornatum* porcentajes de germinación de 77.7 % a los 22 días de la siembra.

Los porcentajes de germinación obtenidos con *A. ornatum* en medio MS 50% 30 días después de la siembra (82.2%), son similares a los reportados en otras cactáceas aunque en periodos de tiempo más largos, por ejemplo en *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* Rosas (2002) obtuvo porcentajes de germinación del 80% y 88% respectivamente después de 50 y 34 días incubación.

Por otra parte, son superiores a los obtenidos por Olguín (1994) en MS 50% con *Ariocarpus retusus* con el 55% de germinación *in vitro* después de 30 días de incubación, y en *Turbincarpus laui* (Santos-Díaz *et al.*, 2003b) donde sólo germinó el 29% de las semillas, aunque no se precisan los tiempos en que se evaluó esta respuesta.

A diferencia de Mata-Rosas *et al.* (2001) que en *Turbincarpus laui* cultivado en medio MS 50% obtuvieron el porcentaje de germinación más bajo (28.1%), con *A. ornatum* se obtuvo en este medio el porcentaje de germinación más alto (82.2%); resultado que concuerda con el obtenido por Rosas (2002) quién evaluó el efecto de los medios de cultivo MS, MS 50% y agua con agar sobre la germinación de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* y obtuvo que el medio MS 50% fue el más favorable para la germinación.

Olguín (1994) evaluó la germinación de *Ariocarpus retusus* en medio MS (sacarosa 30 g/L) y el MS 50% con 15 g/L y 30 g/L de sacarosa, y obtuvo su mayor porcentaje de germinación (66%) en el medio con la mayor concentración de nutrientes y sacarosa (MS sacarosa 30g/L). En tanto que en el medio MS 50% sacarosa 30 g/L el porcentaje de germinación fue menor al obtenido en MS 50% sacarosa 15 g/L.

Al parecer, en la germinación de algunas especies de cactáceas resulta favorable reducir el medio MS a la mitad de todos sus componentes, esto encuentra sustento en lo reportado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) y Castro-Gallo *et al.* (2002) al utilizar el medio MS 50% como el medio inicial en la germinación de diversas especies de cactáceas.

Se observaron diferencias morfológicas entre las plántulas germinadas en los diferentes medios de cultivo (Figura 4). En general las plántulas germinadas en agua con agar presentaron una forma globosa, el hipocótilo fue más ancho que el epicótilo, el cual permaneció



Figura 4. Plántulas de *A. ornatum* germinadas *in vitro* en los medios MS (a), MS 50% (b) y a/a (c).

reducido y con todas las aréolas concentradas en el ápice; mientras que el desarrollo de la raíz fue limitado. En las plántulas germinadas en MS 50% se observó un mayor desarrollo (longitud) del hipocótilo respecto del epicótilo, aunque el grosor en ambos fue muy similar. En medio MS 100% la longitud y grosor del epicótilo fue todavía mayor con respecto al hipocótilo, ya que a medida que se elongó desarrolló nuevas aréolas con espinas. En ambos medios nutritivos la longitud y desarrollo de la raíz fue similar y mayor que en agua con agar (Figura 4).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Elías-Rocha *et al.* (1998) en *Mammillaria candida* al observar un mayor desarrollo de las plántulas expresado por el largo del epicótilo, desarrollo y longitud del sistema radicular, en las germinadas en medio MS 100% respecto a las de medio MS 50%.

Se sugiere que las diferencias morfológicas pueden atribuirse a que en el medio de agua con agar, la ausencia de sales produjo en las plántulas una mayor disponibilidad y rápida absorción de agua que causó que adquirieran su forma globosa. Por otro lado, la presencia de nutrientes en MS 100% y MS 50% favoreció el desarrollo de las plántulas. Elías-Rocha *et al.* (1998), refuerzan esta idea al señalar que en *Mammillaria candida* estas diferencias estuvieron claramente relacionadas con la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.

No obstante que la metodología empleada para el establecimiento y germinación de *A. ornatum* produjo porcentajes favorables de germinación respecto a los obtenidos en otros estudios, sería importante realizar ensayos omitiendo la escarificación y determinar así su efecto, favorable o negativo, en el proceso germinativo de *A. ornatum*, ya que en algunas especies la escarificación resulta indispensable para la germinación. Por ejemplo, Olguín (1994) aplicó la escarificación química con H₂SO₄ a semillas de *Ariocarpus retusus* y observó que las semillas no escarificadas no germinaron, mientras que Rosas (2002) observó que en *Polaskia chichipe* la escarificación química con H₂SO₄ y HCl causó bajos porcentajes de germinación.

En *A. ornatum* los porcentajes y tiempos de germinación fueron distintos en cada uno de los medios ensayados, lo que hace suponer que igualmente son específicos en cada especie.

2.- Respuestas morfogénicas

a).- Formación de callo

Después de la cuarta semana en el medio de inducción, se observó la formación de dos tipos de callo: 1) en la combinación BA/ANA se desarrolló callo de compacto-semicompacto de color verde claro-intenso, de consistencia dura y que ocasionalmente presentó lana en la superficie (Figura 5).

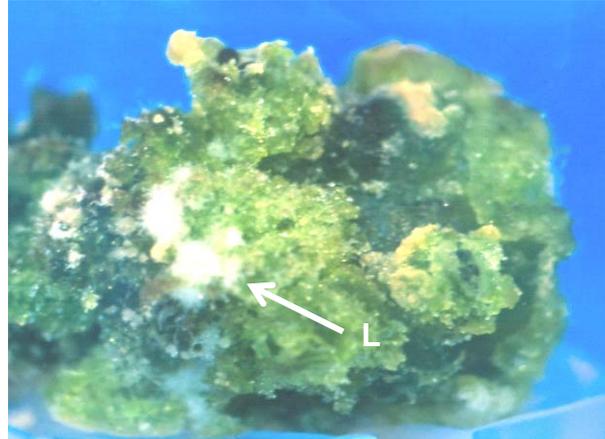


Figura 5. Callo compacto-semicompacto a partir de explantes longitudinales de *A. ornatum* en BA/ANA 2/0.5 mg/L. L-lana.

Las características del callo pueden variar según la especie, por ejemplo en *Turbiniarpus laui* se reporta que en la combinación hormonal BA/ANA se originó callo friable de color verde claro a hialino (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

Los tiempos de respuesta a la formación de callo se han reportado para otras especies de cactáceas en periodos que van desde dos semanas de inducción en *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu y Bhau, 2000), 3-4 semanas en *Coryphantha macromeris* (Smith *et al.*, 1991), después de 4 semanas de inducción en *Cereus peruvianus* y *Turbiniarpus laui* (Oliveira *et al.*, 1995 y Mata-Rosas *et al.*, 2001 respectivamente), y hasta después de 8-12 semanas de incubación en *Carnegiea gigantea* (Baker y Marín, 1999).

La formación de callo inició a partir de las zonas de corte del explante y conforme se desarrolló lo cubrió completamente. En la mayoría de los tratamientos se presentó de forma simultánea a la formación de brotes.

En otros trabajos donde se reporta la formación de callo a partir de la zona de corte del explante, éste se ha obtenido tanto en presencia de auxinas (Machado y Prioli, 1996), de citocininas (Castro-Gallo *et al.*, 2002), en combinación de ambas (Ault y Blackmon, 1987, Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Wakhlu y Bhau, 2000), como en total ausencia de hormonas (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000).

La mayor proliferación de callo se obtuvo en las combinaciones de BA con ANA 2/0.5 y 2/1 mg/L. Esta respuesta también ha sido reportada por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) en varias especies de cactáceas y por Elías-Rocha *et al.* (1998) en *Mammillaria candida*, donde la proliferación de callo fue mayor en los tratamientos que incluyeron ANA.

2) En K/2,4-D a partir de las zonas de corte del explante, se desarrolló callo semicompacto-friable de color verde blanquecino, pigmentación rojiza en la superficie, consistencia suave y oxidación en las zonas de corte (Figura 6).

La pigmentación roja en los callos también se ha reportado en diversas especies del género

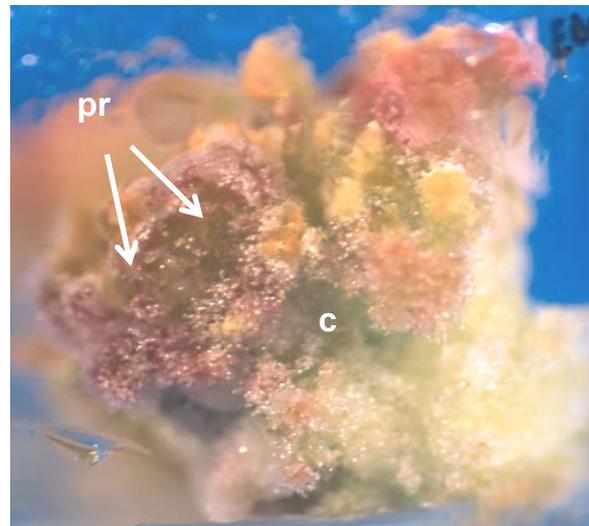


Figura 6. Formación de callo semicompacto-friable de *A. ornatum* a partir de explantes longitudinales en K/2,4-D 2/0.5 mg/L. C—callo; pr—pigmentación rojiza.

Mammillaria, entre las que se encuentran: *M. candida*, *M. craigi*, *M. obscura*, *M. uncinata*, *M. formosa*, *M. sphacelata* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998) y *M. bocasana* (Castro-Gallo *et al.*, 2002); así como en brotes regenerados de

fracciones de tallo de *Schlumbergera truncata*, ésta característica del callo es atribuida a la presencia de betalainas en etapas tempranas de desarrollo (Pérez *et al.*, 1999).

Se observó que la proliferación de callo en los tratamientos de la combinación K/2,4-D fue menos abundante que en los de BA/ANA, ya que en ninguno de los tratamientos cubrió el explante completamente.

La mayor proliferación de callo se obtuvo en los tratamientos de K/2,4-D 1/0.5, 2/0.5 y 2/1 mg/L. En otros trabajos donde se ha utilizado la combinación K/2,4-D en la inducción de callo, por ejemplo Minocha y Mehra (1974) con *Neomammillaria prolifera*, se reporta que en los tratamientos en ausencia de la auxina 2,4-D el callo no se desarrolló, mientras que su presencia produjo mayor crecimiento, así como un incremento en peso fresco y seco.

Al parecer, la coloración clara del callo en K/2,4-D estuvo asociada a la presencia de 2,4-D, una respuesta similar fue observada por Wakhlu y Bhau (2000) en *Coryphantha elephantidens* donde la combinación K/2,4-D originó callo compacto de color verde, mientras que la auxina sola dio lugar a callo friable blanco translúcido.

Asimismo, se observó que la presencia de 2,4-D en el medio de cultivo pareció inducir la necrosis de los tejidos, esta respuesta ya había sido reportada en *Cereus peruvianus* por Oliveira *et al.* (1995) en la combinación K/2,4-D, cuando a mayor concentración de 2,4-D en el medio de cultivo se produjo la necrosis y muerte de los explantes, mientras que cuando fue mayor la concentración de kinetina se formó callo verde compacto.

b).- Organogénesis

1. Activación areolar (yemas axilares)

Se observó que después de 5-7 semanas de inducción, se inició el desarrollo de los brotes. Durante la formación de éstos, las aréolas incrementaron su tamaño y formaron protuberancias que se hicieron más evidentes con el desarrollo de lana (Figura 7a), las protuberancias paulatinamente progresaron en su desarrollo hasta diferenciarse en brotes con numerosos tricomas y la presencia de espinas (Figura 7b); los brotes emergieron asincrónicamente del explante (Figura 8).



Figura 7. **a**–Aréola de *A. ornatum* con desarrollo de lana e incremento en tamaño; **b**– brote diferenciado después de ocho semanas de inducción en K/2,4-D 2/1 mg/L.



Figura 8. Formación asincrónica de brotes de *A. ornatum* regenerados por activación areolar en BA 2mg/L.

Castro-Gallo *et al.* (2002) en un trabajo realizado con 10 especies de cactáceas donde se incluye a *A. ornatum*, reportaron la regeneración de brotes a partir de aréolas después de 8 semanas de inducción, pero no especifican el

tiempo que requirió ésta especie. En *A. myriostigma* la regeneración de brotes ocurre entre la 5-7 semana de inducción (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 1999). Por su parte Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) en un trabajo de micropropagación con 21 especies de cactáceas donde se incluye a *A. myriostigma* mencionan que de manera general los tiempos de inducción van de 8 a 12 semanas, aunque no precisan el tiempo requerido por esta especie en particular.

Con base en lo anteriormente expuesto, se observa que el tiempo de inducción necesario para la activación de las aréolas en éste género es de 5-7 semanas.

El tiempo necesario para la inducción de las yemas axilares es variable entre especies, puede ir desde 16 días como en *Cereus peruvianus* (Machado y Prioli, 1996); cuatro semanas como en *Lophophora williamsii* (Ortiz-Montiel y Alcántara-García, 1997); de 4-6 semanas en *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon, 1987); 6-7 semanas en *Cephalocereus senilis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000); mientras que para otras especies los periodos de inducción pueden variar de entre 6 a 12 semanas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998).

A las 16 semanas de su transferencia a medio MS, se observó que el mayor número de brotes por explante (15) se formó en aquellos procedentes de BA 2 mg/L, mientras que en K/2,4-D se presentó en los provenientes de 2/0.5 mg/L donde se generaron 2.7 brotes por explante.

Después de 40 semanas, en BA 2 mg/L se registró un incremento promedio de 5 brotes para obtener finalmente 20 brotes por explante (Tabla 5); en la combinación K/2,4-D 2/0.5 mg/L el incremento fue de 0.4 brotes por explante para obtener al final un promedio de 3.1 brotes por explante (Tabla 6).

Es importante mencionar que en los tratamientos K 1 y 2 mg/L la regeneración de brotes no se presentó por activación areolar, sino por organogénesis directa que se describe más adelante.

Tabla 5. Efecto de las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento BA y ANA en la regeneración de brotes de *A. ornatum* por activación areolar.

Tratamientos BA/ANA (mg/L)	Promedio de brotes por explante		Explantes con brotes (%)
	16 semanas	40 semanas	
0/0	0	0	0
0/0.5	1	1.12	50
0/1	0.87	1	62.5
1/0	6.25	7.37	100
1/0.5	7.12	8.62	100
1/1	6.5	7	87.5
2/0	15.87	20.25	100
2/0.5	8.62	9	75
2/1	9.62	10.75	75

Tabla 6. Efecto de las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento K y 2,4-D en la regeneración de brotes de *A. ornatum* por activación areolar.

Tratamientos K/2,4-D (mg/L)	Promedio de brotes por explante		Explantes con brotes (%)
	16 semanas	40 semanas	
0/0	0	0	0
0/0.5	0.75	1	37.5
0/1	1.12	1.5	37.5
1/0	–	–	–
1/0.5	1.62	2	75
1/1	1.5	1.87	75
2/0	–	–	–
2/0.5	2.75	3.12	50
2/1	1	1.37	75

En general se observó que el mayor número de brotes por explante, así como el mayor porcentaje de explantes con brotes, se obtuvieron en los tratamientos en presencia de citocininas en ausencia o bajas concentraciones de auxinas.

El número promedio de brotes por explante obtenido en BA 2 mg/L es mayor que el reportado por Castro-Gallo *et al.* (2002) en esta misma especie, donde después de 8 semanas, obtuvieron 11 brotes por explante en la misma concentración hormonal. Mientras que en un trabajo realizado con *A. myriostigma* Vázquez-Zalapa *et al.* (2004) obtuvieron un promedio de 17 brotes por explante incrementando la concentración de BA a 3 mg/L, aunque no precisan tiempo de inducción y vía de regeneración.

Comúnmente en el cultivo *in vitro* se reporta que la citocinina BA sola o combinada con ANA promueve una mayor proliferación de brotes; en *A. ornatum* se observó que la presencia de BA en el medio de cultivo promovió la formación de brotes por activación de las yemas axilares. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) quienes utilizaron las citocininas BA, 2iP y TDZ en diferentes concentraciones para la regeneración de *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*, en ambas especies el mayor número de brotes por explante se obtuvo en los tratamientos en presencia de la citocinina BA.

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) realizaron un estudio donde evaluaron la regeneración de brotes en tres especies de cactáceas columnares (*Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* y *Carnegiea gigantea*) en distintas combinaciones de BA y 2iP con ANA. En *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* el mayor número de brotes por explante (3.8 y 4.3 respectivamente) se obtuvo en BA 1 mg/L, seguido de *Carnegiea gigantea* con 5.3 brotes por explante en BA 2 mg/L.

Otras especies que registran elevadas tasas de proliferación son *Mammillaria sphaelata* con 17.5 brotes por explante (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), *Astrophytum myriostigma* con 17 (Vázquez-Zalapa *et al.*, 2004),

Stenocactus coptonogonus con 16.75 brotes por explante (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998); mientras que para *Thelocactus hexaedophorus* Castro-Gallo *et al.* (2002) reportaron 13.6 brotes por explante.

En otras especies el promedio de brotes regenerados por explante es muy reducido, tal es el caso de *Coryphantha elephantidens* con 2.9 brotes por explante (Castro-Gallo *et al.*, 2002), *Nyctocereus serpentinus* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998) con 2.1 brotes por explante y *Astrophytum asterias* con 2.3 brotes por explante (Lizalde-Viramontes *et al.*, 2004).

Se observó que para promover la formación de brotes de *Astrophytum ornatum* son indispensables niveles de hormonas exógenas, ya que los tratamientos control (0/0) de BA/ANA y K/2,4-D no generaron brotes (Tablas 5 y 6). Sin embargo, para otras especies del género como *A. myriostigma* (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 1999), no se requirió la adición de hormonas exógenas para la formación de brotes.

La formación de brotes en ausencia de reguladores del crecimiento también se reporta en especies como *Cereus peruvianus* (Machado y Prioli, 1996) y *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

Con base en lo anterior se confirma que cada especie responde de manera particular al efecto de las hormonas exógenas.

De forma general se observó una mayor respuesta de las aréolas de la parte apical del explante o próximas a ésta, sin embargo, no se observó un patrón regular de respuesta en cuanto al número de aréolas activadas en cada explante. En un estudio realizado en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), se señala que la respuesta de las yemas

axilares varía según su ubicación en el explante, de modo que la dominancia apical del explante favorece la activación de las aréolas apicales.

Se observó que en algunos de los brotes individualizados colocados en medio MS 100% el tejido continuó regenerando brotes por activación areolar

(Figura 9). Es probable que esta respuesta se deba a que los reguladores del crecimiento siguen actuando sobre el tejido provocando la formación de nuevos brotes. En especies como *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001) y *Ferocactus acanthodes* (Ault y

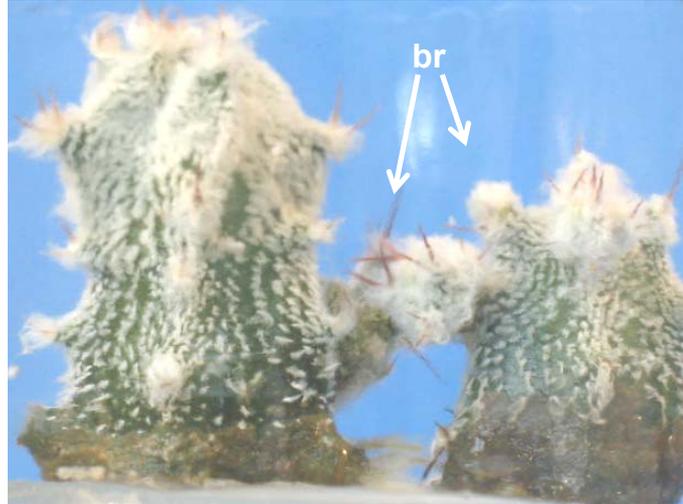


Figura 9. Formación de brotes por activación areolar a partir de brotes individualizados de *A. ornatum* en medio MS. br-brotes.

Blackmon, 1987), también se ha observado que el tejido, aún después del subcultivo, mantiene su potencial morfogenético y continúa generando brotes.

Durante la proliferación de brotes se observó la oxidación del 10% de los brotes generados de la combinación K/2,4-D, y un alto índice de brotes con hiperhidratación (>50%) en los generados de la combinación BA/ANA. La hiperhidratación fue más frecuente en los tratamientos con la mayor concentración de BA 2/0, 2/0.5 y 2/1 mg/L. Los brotes hiperhidratados fueron traslúcidos, de color verde claro, apariencia vítrea y reducido número de aréolas con espinas (Figura 10a); rápidamente aumentaban su tamaño y reventaban desdiferenciándose en callo (Figura 10 b y c).

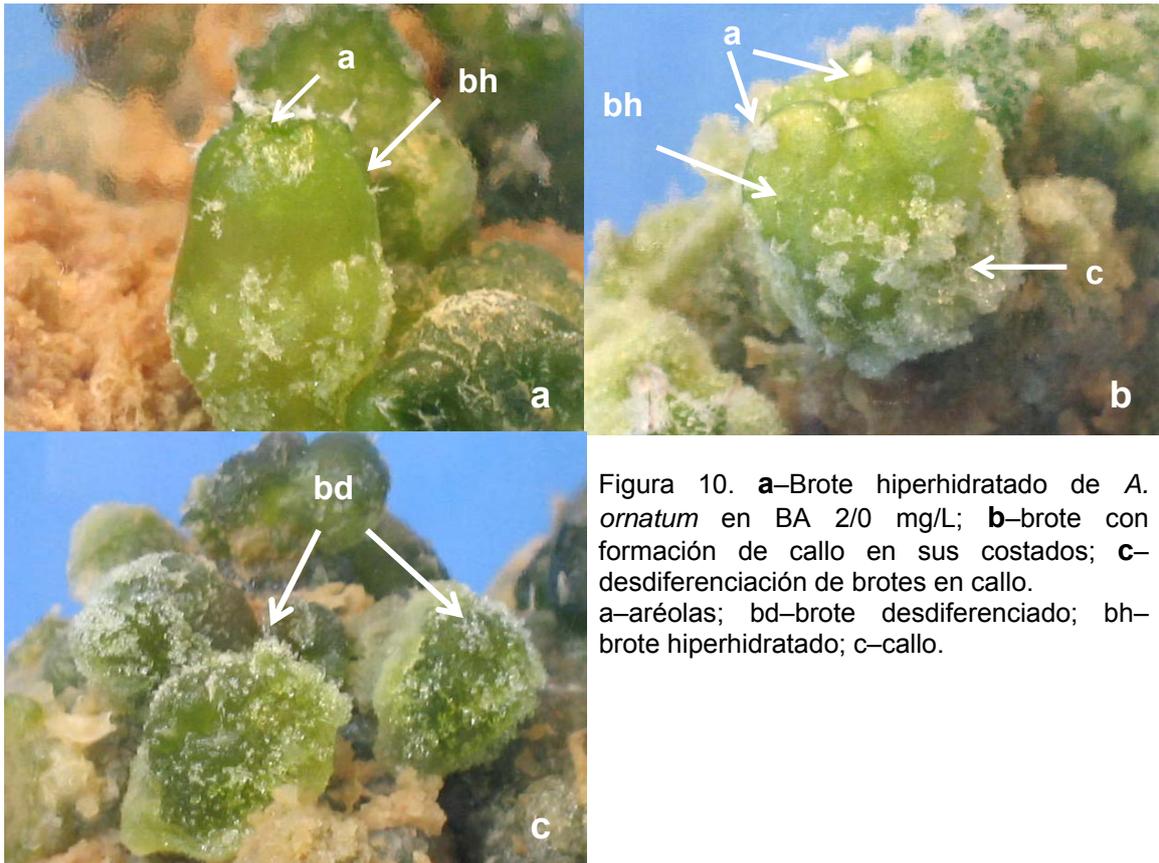


Figura 10. **a**–Brote hiperhidratado de *A. ornatum* en BA 2/0 mg/L; **b**–brote con formación de callo en sus costados; **c**–desdiferenciación de brotes en callo. a–aréolas; bd–brote desdiferenciado; bh–brote hiperhidratado; c–callo.

En la repetición realizada con BA y K 2 mg/L se observó que después de haber permanecido 8 semanas en el medio de inducción y 16 en medio basal, el promedio de brotes por explante fue menor al obtenido en el primer barrido hormonal, ya que sólo se consideraron los brotes viables y sin hiperhidratación, por lo que al final, el mayor número de brotes por explante se obtuvo en K 2 mg/L (5.95), seguido de BA 2 mg/L con 2.93 brotes por explante (Tabla 7).

El promedio de brotes por explante obtenido en el presente trabajo es similar al reportado en otras especies del género *Astrophytum*.

Tabla 7. Promedio de brotes por explante de *A. ornatum* obtenidos *in vitro* después de 8 semanas en medio de inducción con BA y K 2 mg/L y 16 semanas en medio MS. Repetición de los mejores tratamientos regenerativos.

Tratamiento 2 mg/L	Número de Explantes	Número de brotes	Brotes/explante X ± DS
BA	30	88	2.93 ± 1.96
K	30	178	5.95 ± 3.93

De acuerdo a los resultados de un Análisis de Varianza, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de brotes obtenido entre ambas citocininas.

En general, se observó que la diferenciación, crecimiento y desarrollo de los brotes generados de K/2,4-D fue más acelerado respecto a los regenerados de BA/ANA.

2. Organogénesis directa

Como se señaló anteriormente, dentro de los diferentes tratamientos ensayados con K/2,4-D, aquellos que contenían K 1 y 2 mg/L en ausencia de la auxina, presentaron la formación de brotes por organogénesis directa. La cual se empezó a manifestar en la porción apical de los explantes después de dos semanas en el medio de inducción, inicialmente el tejido se tornó de color pardo y con una apariencia granular (Figura 11a), pero no se desdiferenció dando lugar a un callo, sino que estos gránulos se empezaron a desarrollar incrementando su tamaño y después de la cuarta semana de inducción se inició su diferenciación a brotes (Figura 11 b y c).

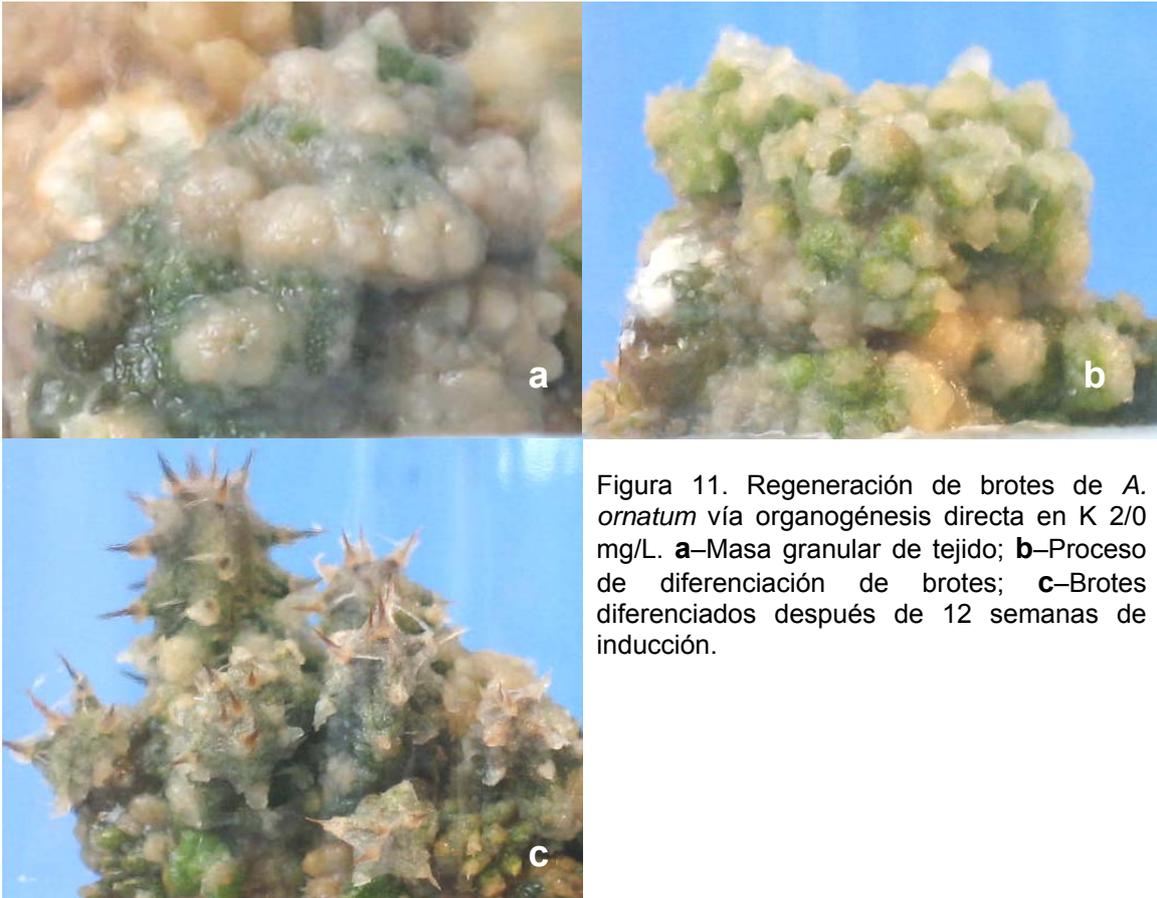


Figura 11. Regeneración de brotes de *A. ornatum* vía organogénesis directa en K 2/0 mg/L. **a**–Masa granular de tejido; **b**–Proceso de diferenciación de brotes; **c**–Brotos diferenciados después de 12 semanas de inducción.

Hasta donde se ha revisado en la literatura, no se ha señalado esta apariencia, ni estructura granular en los tejidos, previo a la formación de los brotes.

La organogénesis directa de *A. myriostigma* fue reportada también por Villavicencio-Gutiérrez *et al.* (1999), que evaluaron el efecto de BA y K 0.5, 1 y 2 mg/L en combinación con AIB 0.1 mg/L, después de 5-7 semanas; pero no especifican en que concentración se expresó ni como se llevó a cabo el desarrollo de los brotes.

Después de 40 semanas en medio MS se obtuvo respectivamente en K 1 y 2 mg/L un promedio de 6 y 8 brotes por explante. El promedio de brotes por explante obtenido en *A. ornatum* es similar al que reportan Jiménez-Rodríguez *et*

al. (2001) en *A. myriostigma* vía organogénesis directa con un promedio de 7-8 brotes por explante en concentraciones de BA 2-3 mg/L.

Las diferencias en cuanto al número de brotes regenerados entre especies puede atribuirse a factores como el origen del explante y/o los tiempos de inducción. Al respecto Jiménez-González (1998b) señala que en los explantes provenientes de plántulas jóvenes y de tejido menos diferenciado la respuesta *in vitro* es mejor. En los trabajos citados los explantes provenían de plántulas germinadas *in vitro*, por lo que es posible que en este caso las diferencias sean producto de los tiempos de inducción o la propia fisiología de la especie.

Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) consideran que la tasa de multiplicación también puede estar relacionada con el tipo y concentración de hormonas.

3. Regeneración apical

Después de la cuarta semana en los medios de inducción, los explantes de los tratamientos BA/ANA 0/0, 0/0.5 y 0/1 mg/L y el 20% de los explantes colocados en K/2,4-D 2/0 mg/L iniciaron la regeneración de su porción apical.

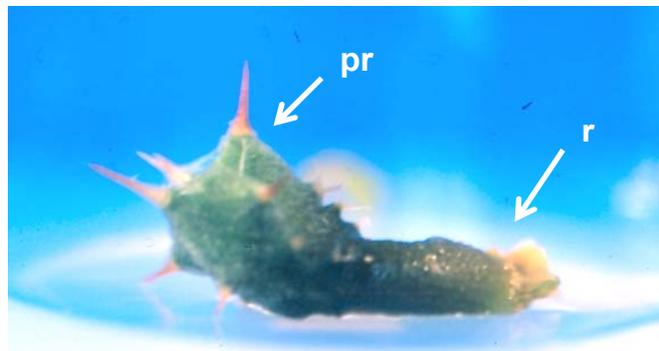


Figura 12. Plántula de *A. ornatum* formada por regeneración apical en medio MS sin reguladores del crecimiento. pr—porción regenerada; r—raíz.

Esta respuesta morfogénica que consistió en la cicatrización de la zona de corte, la regeneración y elongación del polo apical de los explantes, la formación de raíces en su base (Figura 12) y el consecuente desarrollo como plántulas completas, se presentó en los explantes que al momento del corte conservaron el meristemo apical.

La regeneración apical fue más frecuente en los tratamientos en presencia de ANA; según Davies (1990) y Gaspar *et al.* (1996), esto se debe a que entre las funciones de éste grupo de hormonas está la de promover la dominancia apical e inhibir el crecimiento de las yemas laterales. Sin embargo, en los tratamientos control (0/0) donde la regeneración apical se observó en el 80% de los explantes, así como en el tratamiento K 2 mg/L es probable que en la regeneración apical intervinieran las auxinas presentes en el tejido (endógenas).

4. Rizogénesis

La regeneración de raíces adventicias se presentó a partir del callo o directamente de los explantes longitudinales (porción media de la zona de corte), en los tratamientos K/2,4-D 0/0, 1/0.5, 2/0 y 2/1 mg/L y en BA/ANA 0/0, 0/0.5, 0/1 y 2/0 mg/L en diferentes tiempos (Figura 13). Las raíces fueron hialinas y posteriormente se tornaron color marrón.

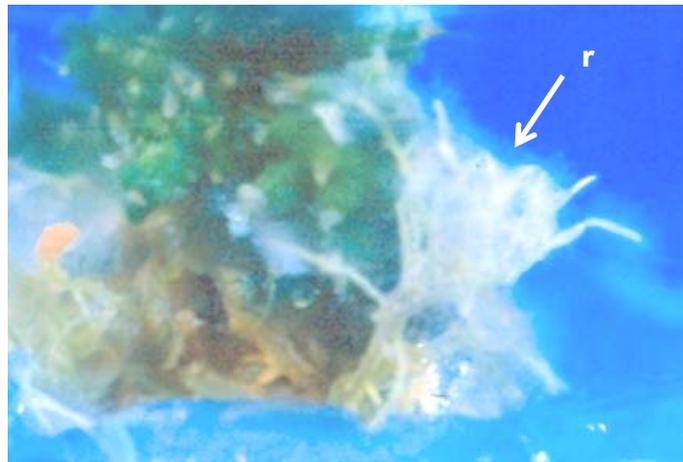


Figura 13. Rizogénesis de *A. ornatum* a partir de la porción media del explante después de 7 semanas en K 2 mg/L. r-raíz.

En otras especies como *Neomammillaria prolifera* se reporta la regeneración de raíces directamente del explante en K 20 mg/L (Minocha y Mehra, 1974). Por su parte, Mata-Rosas *et al.* (2001) en *Turbincarpus laui* obtuvieron en BA/ANA la formación de raíces directamente del explante, aunque no especifican las concentraciones.

Además de la elongación celular y la regeneración apical, la rizogénesis también es producto del efecto de las auxinas (Gaspar *et al.*, 1996), sin embargo, en los tratamientos donde no se adicionan es probable que su formación sea producto del efecto de auxinas endógenas.

3.- Hiperhidratación y oxidación

A lo largo del cultivo *in vitro* la hiperhidratación fue un problema frecuente en los brotes generados de la combinación BA/ANA.

Generalmente en trabajos de cultivo *in vitro* se reporta que la hiperhidratación esta asociada a elevadas concentraciones de citocininas y en particular a la presencia de BA en el medio de cultivo. Según Minocha y Mehra (1974); y Williams y Taj (1998) citados por Villavicencio-Gutiérrez *et al.* (1999), esto corresponde a que altas dosis de citocininas incrementan la susceptibilidad de los tejidos a la hiperhidratación, ya que inducen una mayor difusión de agua en el tejido.

La hiperhidratación en presencia de BA también se ha reportado en especies como *Cephalocereus senilis* con BA 10 mg/L (Ortiz-Montiel y Alcántara-García, 1997); *Stenocereus thurberi* en combinaciones de BA o 2ip (1, 2 y 3 mg/L) con ANA 0.5 mg/L (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002); en *Mammillaria candida* con BA 5 mg/L y ANA 0.01 mg/L (Elías-Rocha *et al.*, 1998) y en especies como *Mammillaria formosa*, *M. candida* y *M. sphaelata* con BA 1 mg/L y ANA (0.1, 0.01 mg/L) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998). Al igual que en el presente estudio con *A. ornatum*, en *Cephalocereus senilis* (Ortiz-Montiel y Alcántara-García, 1997) y *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1998), el mayor nivel de hiperhidratación coincidió con los mejores tratamientos regenerativos.

En el presente trabajo más del 50% de los brotes generados en la combinación BA/ANA presentó hiperhidratación, aunque el porcentaje de brotes hiperhidratados es alto, en otras especies se registran porcentajes aún mayores, por ejemplo, en *Pelecyphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera* se obtuvieron respectivamente porcentajes de hiperhidratación del 63.7% y 62.4% en diferentes combinaciones de TDZ con 2,4-D (Giusti *et al.*, 2002).

Sin embargo, en otras especies el porcentaje de brotes hiperhidratados que se registra es menor, por ejemplo en *Astrophytum myriostigma* se obtuvo en el 35% de los brotes (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 1999), mientras que en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* en menos del 5% del total de los brotes (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

En el presente trabajo el 5% de los brotes que presentaron hiperhidratación recuperaron su condición normal después de haber sido subcultivados en medio MS 100%.

Para evitar este desorden fisiológico regularmente se recomienda limitar la disponibilidad de agua en el medio elevando las concentraciones de agar (10-12 gr/L) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002); reducir la concentración de citocininas (Elías-Rocha *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002); y/o disminuir el tiempo de exposición a ellas.

Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002); Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) y Santos-Díaz *et al.* (2003a) mencionan que la hiperhidratación puede impedir el enraizamiento de los brotes y/o disminuir su sobrevivencia durante la etapa de aclimatización, por lo que es importante evitarla.

El CA también se ha utilizado en concentraciones de 0.5 gr/L para disminuir la hiperhidratación en brotes de *Astrophytum capricorne* durante la etapa de inducción (Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 2004).

Por otra parte, en el presente estudio se observó que en la combinación hormonal K/2,4-D los tejidos (explantes y brotes) perdían la coloración verde tornándose hialinos (color marrón). Al parecer, este fenómeno estuvo relacionado con la presencia de la auxina 2,4-D, ya que fue más frecuente en los tratamientos que la incluyeron y causó la muerte del tejido.

Esta aseveración se sustenta en lo reportado en *Cereus peruvianus* (Oliveira *et al.*, 1995) y *Opuntia ficus-indica* (Llamoca-Zárate *et al.*, 1999), donde se reporta que la presencia de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo causó la oxidación de los tejidos.

La oxidación de los tejidos generalmente se atribuye a la excreción y oxidación de componentes fenólicos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002), para su control Llamoca-Zárate *et al.* (1999) recomiendan breves periodos de inducción. Sin embargo, son necesarios otros estudios a nivel hormonal y fisiológico para determinar otras posibles causas de esta anomalía.

4.- Individualización y pruebas de enraizamiento

La raíz emergió después de dos semanas de incubación en todos los medios ensayados, presentándose en MS+CA (43%), seguido de MS+ANA (38%), MS 100% (35%) y MS 50% (30%).

Los tiempos necesarios para la regeneración de raíces coinciden con los obtenidos por Mata-Rosas *et al.* (2001) en *Turbincarpus laui* donde la regeneración de raíces en medio MS 50% se obtuvo después de dos semanas de inducción. A diferencia de éstos resultados en *Cereus peruvianus* los primeros brotes enraizados se obtuvieron después de 5 semanas de inducción en medio MS adicionado con ANA o AIA 1 mg/L (Machado y Prioli, 1996). Aunque en ambos trabajos no se especifica el porcentaje de brotes enraizados.

1) Medio MS+CA

En MS+CA las raíces fueron de color verde claro a hialino y generalmente emergieron de la parte central del tallo.

En este medio se observó que las raíces después de emerger no continuaron su desarrollo, este resultado es similar al obtenido por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) en un trabajo con varias especies de cactáceas donde se incluye a *A. myriostigma*, al observar que la adición de 2 g/L de CA al medio de cultivo no tuvo ningún efecto en el desarrollo de las raíces.

En el presente trabajo se observó un mayor desarrollo y rapidez de crecimiento en los brotes de *A. ornatum* colocados en medio adicionado con 3 g/L de CA. El efecto benéfico del CA sobre el desarrollo de los brotes es atribuido a que éste absorbe del medio o bien del explante sustancias que promueven el crecimiento desorganizado (Fridborg y Eriksson, 1975 citados por Elías-Rocha *et*

al., 1998) por lo que en presencia de CA se reduce la formación de callo (Santos-Díaz *et al.*, 2003a, 2003b) y se favorece el desarrollo de los brotes. Otras especies donde se reporta un acelerado crecimiento de los brotes en presencia de CA son *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

El porcentaje de brotes enraizados después de 9 semanas de incubación fue de 85% con una longitud promedio de 0.85 cm (Figura 14). En otros estudios donde se adicionan 3 g/L de CA al medio MS para la inducción de raíces, se reportan en *Acharagma aguirreana*, *Pachycereus schotti* y *Stenocereus stellatus* porcentajes de enraizamiento del 100% después de 6 semanas de inducción (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

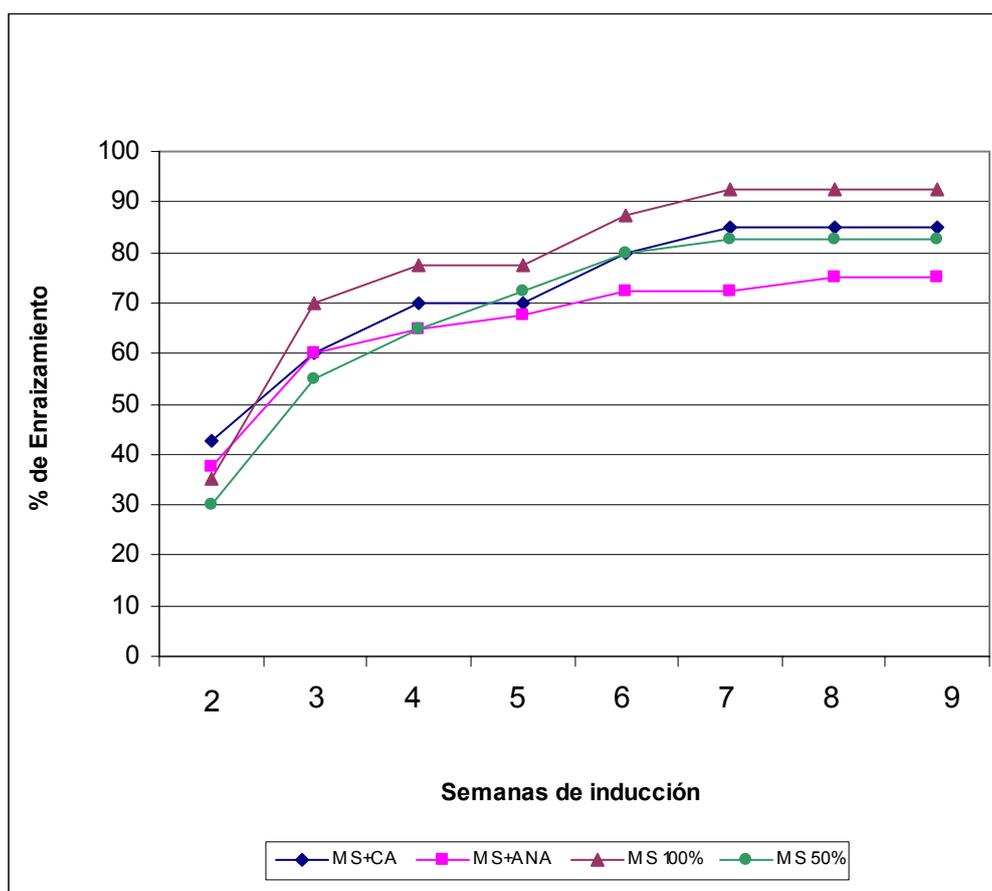


Figura 14. Porcentaje de brotes enraizados de *A. ornatum* colocados en: MS+3g/L de carbón activado (MS+CA), MS+1mg/L de ANA (MS+ANA), MS 100% y MS 50%. Evaluación cada semana durante 9 semanas.

2) Medio MS+ANA

En este medio las raíces emergieron prácticamente de toda la base del tallo, fueron gruesas y de color blanco; después de 5 semanas de inducción las raíces del 70% de los brotes interrumpió su desarrollo, adquirieron una coloración marrón que se propagó a todo el brote ocasionando su muerte.

El porcentaje final de brotes enraizados en este medio fue de 75% (Figura 14) con una longitud promedio de las raíces de 0.95 cm. Este resultado es similar al reportado en *A. myriostigma* por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) donde se obtuvieron porcentajes de enraizamiento de 75% en medio MS adicionado con AIB 1 mg/L y al obtenido en *Astrophytum ornatum* con el 73% de enraizamiento en medio MS adicionado con AIA 1 mg/L (Castro-Gallo *et al.*, 2002).

En otras especies el porcentaje de brotes enraizados que se reporta en medio con auxinas es aún mayor, por ejemplo Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) reportan en *Cephalocereus senilis* el 100% de enraizamiento en medio MS adicionado con AIA 0.5 mg/L. El mismo porcentaje de brotes enraizados se obtuvo para *Cereus peruvianus* en medio MS con AIA ó ANA 1 mg/L (Machado y Prioli, 1996).

Por su parte, Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) evaluaron el efecto del medio MS 50% y MS basal solo y adicionado con ANA y AIB 1 y 2 mg/L sobre el enraizamiento de *Aztekium ritterii* obteniendo la formación de raíces en medio MS adicionado con AIB 2 mg/L.

3 y 4) Medios MS 50% y MS 100%

Las raíces regeneradas en los medios MS 50% y MS 100% mostraron características morfológicas y de desarrollo muy similares; fueron de color verde claro y generalmente emergieron del centro del tallo formando una raíz principal (Figura 15 a y b).

El mayor porcentaje de brotes enraizados al final del tratamiento se obtuvo en el medio MS 100% (93%) con una longitud promedio de la raíz de 1.56 cm; seguido de MS 50% donde enraizó el 83% de los

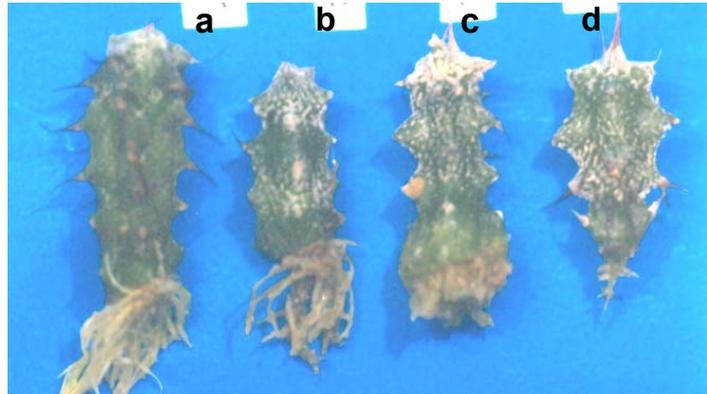


Figura 15. Brotes de *A. ornatum* enraizados *in vitro* en los medios MS (a), MS 50% (b), MS+ANA 1 mg/L (c) y MS MS+CA 3 g/L (d), después de 9 semanas de incubación.

brotes y la longitud promedio fue de 1.25 cm. Es probable que estas diferencias estén dadas por la proporción de sacarosa y/o concentración de nutrientes en el medio de cultivo, de modo que una mayor cantidad de éstas favoreció la formación y desarrollo de raíces.

En otras especies de cactáceas también se reportan altos porcentajes de enraizamiento en medio MS, por ejemplo en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora aselliformis* y *Escobaria minima* se obtuvieron porcentajes de 84.4 a 92.5% (Giusti *et al.*, 2002), mientras que en especies como *Coryphantha elephantidens* y *Astrophytum myriostigma* se lograron porcentajes de enraizamiento del 100% (Wakhlu y Bhau, 2000 y Jiménez-Rodríguez *et al.*, 2001).

De acuerdo a los resultados obtenidos en *A. ornatum* por Castro-Gallo *et al.* (2002), los obtenidos en *A. myriostigma* por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) y Jiménez-Rodríguez *et al.* (2001), y los que se derivan del presente trabajo, se

observa que el medio MS 100% es el más adecuado para el enraizamiento *in vitro* de miembros del género *Astrophytum*.

5.- Crecimiento *in vitro*

La evaluación del crecimiento *in vitro* de los brotes individualizados se realizó a las 12 y 24 semanas de incubación tanto en aquellos que se colocaron en medio MS sólido como en los que fueron transferidos a medio MS líquido en puentes de papel filtro, procedentes de los diferentes tratamientos hormonales.

Se observó que en la primera evaluación la longitud promedio alcanzada en los brotes que se colocaron en medio sólido fue de 2.0 cm, seguido de los transferidos a medio líquido provenientes de BA/ANA (3.1 cm) y K/2,4-D (4.2 cm). En la segunda evaluación (24 semanas) los brotes establecidos en medio sólido incrementaron su tamaño y alcanzaron en promedio 2.2 cm, seguido de aquellos que provenían de los tratamientos de K/2,4-D (4.5 cm) y finalmente los de BA/ANA de 5.1 cm (Tabla 8). Es posible observar un incremento promedio de 2 cm en estos brotes, que en comparación con el resto de los ensayos fue de 0.2 - 0.3 cm en el mismo periodo de tiempo.

Tabla 8. Incremento en longitud y diámetro del tallo, peso fresco y longitud de la raíz en los brotes enraizados colocados en medio sólido y medio líquido provenientes de las combinaciones hormonales BA/ANA y K/2,4-D después de 12 y 24 semanas de incubación.

PARÁMETRO	MEDIO	COMBINACIÓN HORMONAL	SEMANAS DE INCUBACIÓN	
			12	24
			X ± DS	
LONGITUD TALLO	SÓLIDO	BA/ANA	2.0 ± 0.678 cm	2.2 ± 0.713 cm
		K/2,4-D		
	LÍQUIDO	BA/ANA	3.1 ± 1.11 cm	5.1 ± 1.38 cm
		K/2,4-D	4.2 ± 1.50 cm	4.5 ± 1.45 cm
PESO FRESCO	SÓLIDO	BA/ANA	0.81 ± 0.731 gr	0.86 ± 0.746 gr
		K/2,4-D		
	LÍQUIDO	BA/ANA	4.5 ± 2.31 gr	7.2 ± 3.64 gr
		K/2,4-D	3.6 ± 2.87 gr	3.8 ± 3.30 gr
DIÁMETRO TALLO	SÓLIDO	BA/ANA	0.83 ± 0.245 cm	0.87 ± 0.229 cm
		K/2,4-D		
	LÍQUIDO	BA/ANA	1.2 ± 0.449 cm	1.5 ± 1.27 cm
		K/2,4-D	1.2 ± 0.463 cm	1.4 ± 0.488 cm
LONGITUD RAÍZ	SÓLIDO	BA/ANA	1.0 ± 0.418 cm	1.2 ± 0.442 cm
		K/2,4-D		
	LÍQUIDO	BA/ANA	0.57 ± 0.424 cm	1.3 ± 0.925 cm
		K/2,4-D	0.59 ± 0.487 cm	1.0 ± 0.417 cm

Se observó que a las 12 semanas el peso fresco promedio de los brotes enraizados provenientes de los tratamientos de BA/ANA fue de 4.5 g, seguido de K/2,4-D con 3.6 g y en medio sólido 0.81 g y se registró un incremento a las 24 semanas de 2.7 g en los tratamientos de BA/ANA, para registrar finalmente en promedio 7.2 g, seguido de K/2,4-D (3.8 g) y finalmente de 0.86 g en medio sólido (Tabla 8).

En cuanto al diámetro del tallo, en la primera evaluación se observó que en los brotes que se colocaron en medio líquido, tanto los provenientes de BA/ANA como de K/2,4-D tuvieron un diámetro promedio de 1.2 cm, y en medio sólido 0.83

cm. Después de 24 semanas los brotes en medio líquido registraron un incremento de 0.2 - 0.3 cm para alcanzar 1.5 cm de diámetro en aquellos que provenían de tratamientos de BA/ANA y 1.4 cm en los de K/2,4-D; seguido de los de medio sólido con 0.87 cm (Tabla 8).

Respecto a la raíz, se observó que la longitud promedio a las 12 semanas en los brotes que se colocaron en medio sólido fue de 1.0 cm, seguido de K/2,4-D (0.59 cm) y BA/ANA (0.57 cm), colocados en medio líquido. En la segunda evaluación (24 semanas) se registró un incremento de 0.41 y 0.73 cm en la raíz de los brotes establecidos en medio líquido para obtener finalmente en promedio 1.0 cm en aquellos que provenían de K/2,4-D, seguido de BA/ANA (1.3 cm), y de los que se colocaron en medio sólido (1.2 cm) (Tabla 8).

El acelerado crecimiento de cactáceas durante el cultivo *in vitro* puede deberse a varios factores. Malda *et al.* (1999a) sugieren que los reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo durante la etapa de inducción, la humedad presente en los contenedores y la continua fijación de CO₂ son factores que favorecen el crecimiento *in vitro* de las plantas con metabolismo CAM.

Respecto al uso de medios líquidos sobre el crecimiento *in vitro* Ortiz-Montiel y Alcántara-García (1997) mencionan que la presencia de agar en los medios de cultivo disminuye la disponibilidad de agua y nutrientes, ocasionando que el desarrollo de las plantas sea más lento que en el medio líquido.

En general se pudo observar que el mayor desarrollo de los brotes enraizados se obtuvo al colocarlos en medio líquido provenientes de las combinaciones de BA/ANA (Figura 16). Sin embargo, frecuentemente se observó la hiperhidratación de los brotes procedentes de esta combinación y es probable que éste mayor crecimiento este asociado en parte a este desorden fisiológico,

que generalmente es producto de la elevada humedad relativa presente en el recipiente de cultivo y/o de niveles de citocininas (BA) aún presentes en el tejido (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) y Santos-Díaz *et al.* (2003a) señalan que la hiperhidratación puede afectar la sobrevivencia de los brotes enraizados durante su proceso de aclimatización. A fin de reducir su efecto negativo para ésta especie, se observó que el tiempo de 12 semanas en medio líquido es el mejor, ya que no se presentó hiperhidratación.

Sin embargo, son necesarios estudios anatómicos y fisiológicos para determinar en que medida el crecimiento de los brotes enraizados es resultado de su desarrollo *in vitro* o producto de la hiperhidratación de sus tejidos, y determinar cómo influye en la sobrevivencia en condiciones *ex vitro*.



Figura 16. Brote enraizado de *A. ornatum* regenerado *in vitro* colocado en medio MS líquido sacarosa 15 g/L en puentes de papel filtro.

6.- Aclimatización *in vitro* y evaluación de la sobrevivencia *ex vitro*

En la evaluación de esta etapa se utilizaron brotes enraizados (be) sometidos a un proceso de aclimatización *in vitro* en contenedores ventilados, los cuales después de 22 semanas de establecimiento *ex vitro* obtuvieron porcentajes de sobrevivencia de 88% (22 be) en los provenientes de K/2,4-D y de 72% (18 be) en BA/ANA, en cambio en los brotes enraizados que no pasaron por el proceso de aclimatización *in vitro* se registró el 84% (21 be) de sobrevivencia en los provenientes de K/2,4-D y del 68% (17 be) en los de BA/ANA (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de sobrevivencia en brotes enraizados de *A. ornatum* provenientes de las combinaciones hormonales BA/ANA y K/2,4-D con y sin etapa de aclimatización *in vitro*. Lecturas después de 22 semanas de su establecimiento *ex vitro*.

BROTOS SIN ACLIMATIZACIÓN		BROTOS CON ACLIMATIZACIÓN	
K/2,4-D	BA/ANA	K/2,4-D	BA/ANA
84 %	68 %	88 %	72 %

Se puede observar que los porcentajes de sobrevivencia en los brotes enraizados provenientes de la combinación K/2,4-D fueron muy cercanos lo que hace suponer que en su sobrevivencia *ex vitro* probablemente no exista una influencia del proceso de aclimatización, sino más bien de la combinación hormonal en la cual se formaron los brotes.

Por su parte, en los brotes enraizados provenientes de tratamientos con BA/ANA es probable que la presencia de hiperhidratación, haya afectado su sobrevivencia *ex vitro* haciéndolos más susceptibles a factores del medio externo como alta intensidad luminosa y baja humedad relativa. De modo que la sobrevivencia *ex vitro* fue menor en los brotes sin etapa de aclimatización.

Castro-Gallo *et al.* (2002) sugieren que la sobrevivencia *ex vitro* en cactáceas está dada por aparición de nuevas aréolas (crecimiento del tallo). En este estudio se observó que en condiciones *ex vitro* los brotes que pasaron por una etapa de aclimatización *in vitro* requirieron de menor tiempo para reiniciar su crecimiento (tallo) que los no aclimatizados.

Kadleček *et al.* (2001) mencionan que durante la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro*, éstas pueden sufrir reacciones de estrés provocadas tanto por remover su sistema radicular del medio con agar y colocarlas en el sustrato, como por el incremento considerable en la intensidad de luz en condiciones externas. Es probable que estos factores sean los causantes de que el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro* se vea interrumpido temporalmente. Malda *et al.* (1999b), mencionan que el nivel de succulencia en los tallos de las plantas CAM puede minimizar el estrés de éstas durante la aclimatización.

Los porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* obtenidos en *A. ornatum*, son menores a los que reportan en la misma especie Castro-Gallo *et al.* (2002) con el 96% de sobrevivencia en brotes enraizados evaluados después de 11 semanas de establecimiento *ex vitro* y a los obtenidos por Jiménez-Rodríguez *et al.* (2001) en *A. myriostigma* con el 100% de sobrevivencia, aunque no especifican el tiempo en que se evaluó dicha respuesta, ni el número total de plantas establecidas.

Los porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* en otras especies de cactáceas son variables, algunos son relativamente bajos como en *Coryphantha macromeris* con el 55% (Smith *et al.*, 1991); otros más favorables, superiores al 70% se reportan en *Schlumbergera truncata* (Pérez *et al.*, 1999) y *Turbinicarpus laui* (Santos-Díaz *et al.*, 2003b); en *Epithelantha micromeris* se obtuvo el 84%

(Velásquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001); el 86% en *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002); en *Cereus peruvianus* el 87% (Oliveira *et al.*, 1995); el 88% en *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002); el 90% se alcanzó en *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002); superiores al 90% se registran en *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon, 1987) y *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1998); del 94-100% en *Turbincarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001); e incluso del 100% en *Cereus peruvianus* (Machado y Prioli, 1996) y *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu y Bhau, 2000).

No obstante, para tener una estimación precisa de la sobrevivencia *ex vitro* es importante tener en cuenta la cantidad de plantas establecidas así como los tiempos de evaluación considerados en el estudio, sin embargo, son pocos los trabajos que lo precisan.

La diferencia en el porcentaje de sobrevivencia entre brotes aclimatizados y no aclimatizados procedentes de la combinación BA/ANA, puede estar asociada a que la reducción de la humedad relativa en los recipientes ventilados promovió un mejor funcionamiento de los estomas y la producción de ceras epicuticulares que redujo la pérdida de agua a través de la cutícula (Short *et al.*, 1984; Short *et al.*, 1987; Ziv *et al.*, 1987; citados por Roberts *et al.*, 1990), esto favoreció en condiciones *ex vitro* la sobrevivencia de los brotes enraizados sometidos a una etapa de aclimatización *in vitro*, mientras que los provenientes de recipientes sellados fueron más susceptibles y no toleraron ser transferidos a un medio con menor humedad relativa.

Las condiciones prevalecientes en el recipiente de cultivo durante la micropropagación pueden favorecer el desarrollo de plantas con morfología,

anatomía y fisiología anormales (Pospíšilová *et al.*, 1999) afectando su sobrevivencia, éstas alteraciones pueden ser corregidas durante el proceso de aclimatización (Preece y Sutter, 1991), en el cual se consideran factores como la temperatura, humedad relativa, intensidad luminosa, el flujo de aire y la concentración de CO₂ (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Entre las principales alteraciones a la fisiología de las cactáceas durante el cultivo *in vitro* se encuentra el que los estomas pueden permanecer abiertos, lo que permite una continua asimilación de CO₂, que se traduce en un rápido y continuo crecimiento de las plantas (Malda *et al.*, 1999a).

El uso de contenedores ventilados durante el cultivo *in vitro* para estimular la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*, también ha sido evaluado por Talavera *et al.* (2001) quienes utilizaron contenedores sellados con tapas con orificios de 133 mm² de diámetro cubiertos con diferentes tipos de membranas para el cultivo de plantas de *Cocos nucifera* (Palmae). Obtuvieron un mejor funcionamiento de los estomas y por tanto una reducción en los niveles de agua que se pierden a través de las hojas en los contenedores cubiertos con papel filtro Whatman No. 1, que permitieron un mayor nivel de ventilación.

Majada *et al.* (2000) en *Dianthus caryophyllus* (Caryophyllaceae) evaluaron el efecto de contenedores con diferentes niveles de ventilación y obtuvieron un mejor desarrollo de las plantas expresado por el desarrollo de xilema y floema, grosor de la cutícula y morfología de los estomas, en los contenedores con mayor nivel de ventilación.

Por su parte, Malda *et al.* (1999b) evaluaron el crecimiento de *Coryphantha mínima* en contenedores sellados y con ventilación, y obtuvieron un mayor

crecimiento de los brotes en los contenedores sin ventilación, mientras que el porcentaje de sobrevivencia fue más alto en los contenedores ventilados.

En los trabajos antes citados se observa que el uso de contenedores ventilados durante el desarrollo *in vitro* puede inducir cambios fisiológicos en las plantas que favorecen su sobrevivencia en condiciones *ex vitro*. En *A. ornatum* el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* fue mayor en los brotes enraizados que incluyeron una etapa de aclimatización *in vitro* en recipientes con ventilación.

Las concentraciones de sacarosa y la presencia de agar en el medio de cultivo también pueden influir de manera importante en el desarrollo *in vitro* y la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*.

En relación a la sacarosa, Viña *et al.* (1999) citados por Kadleček *et al.* (2001) observaron un mayor crecimiento *ex vitro* en plantas de aguacate sometidas a un pretratamiento *in vitro* con bajas concentraciones de sacarosa en comparación con otras donde la concentración de sacarosa fue mayor.

Malda *et al.* (1999b) evaluaron el crecimiento de plantas de *Coryphantha minima* sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa (0, 0.5, 1.5, 3.0 y 4.5%) y encontraron que las concentraciones 1.5 y 3.0% estimularon una mayor asimilación de CO₂, así como un incremento en volumen y ganancia en peso fresco; en concentraciones más altas el crecimiento fue menor, mientras que la ausencia de sacarosa provocó la muerte de las plantas.

En el presente trabajo se observó una mayor sobrevivencia *ex vitro* en los brotes sometidos a una etapa de aclimatización *in vitro* con reducidas concentraciones de sacarosa (7.5 g/L). Al respecto, Pospíšilová *et al.* (1999) mencionan que la presencia de sacarosa origina una reducción significativa en el potencial hídrico del medio de cultivo y ocasiona el marchitamiento de las plantas

transferidas a sustrato debido a que el potencial hídrico de éste es mayor, mencionan además que en ausencia de sacarosa las plantas tienen el potencial de desarrollar un aparato fotosintético funcional.

Respecto al uso de medio líquido, se sabe que puede favorecer el desarrollo *in vitro* de los brotes enraizados ya que facilita la asimilación de agua y nutrientes, no obstante, pudo haber contribuido a la hiperhidratación, ya que ésta fue más frecuente en los brotes enraizados provenientes de la combinación BA/ANA transferidos a medio

líquido y contenedores ventilados respecto a los que se colocaron en medio sólido.

De lo anterior se deriva que el uso de contenedores ventilados no evitó la hiperhidratación de los brotes

enraizados pero favoreció su sobrevivencia en condiciones *ex vitro* (Figura 17).



Figura 17. Plantas de *A. ornatum* después de 18 meses de haber sido establecidas *ex vitro*.

Actualmente se tienen cerca de 218 plantas de *A. ornatum* en condiciones de invernadero.

VII. CONCLUSIONES

- El proceso de desinfección permitió el establecimiento *in vitro* de las semillas de *A. ornatum* y el medio MS 50 % fue el más conveniente para su germinación.
- Las respuestas morfogénicas que se presentaron fueron: callo, activación areolar, organogénesis directa, regeneración apical y rizogénesis.
- El callo se presentó en ambas combinaciones hormonales sin afectar el crecimiento y desarrollo de los brotes.
- La regeneración de brotes se presentó por activación areolar excepto en K 1 y 2 mg/L donde se presentó por organogénesis directa y cuya diferenciación y desarrollo de los brotes fue más acelerado respecto a los regenerados por activación areolar.
- El mayor número de brotes por explante se obtuvo en BA y K 2 mg/L
- La presencia de ANA en el medio de cultivo estimuló la regeneración apical
- La formación de raíces adventicias se atribuyó al efecto de auxinas exógenas y endógenas.
- La combinación BA/ANA ocasionó altos índices de hiperhidratación en los brotes regenerados.
- El medio MS basal fue el más conveniente para promover el enraizamiento de los brotes individualizados.
- El mayor crecimiento *in vitro* se presentó en las plantas colocadas en medio líquido procedentes de la combinación BA/ANA.
- El proceso de aclimatización *in vitro* en contenedores ventilados, medio líquido MS 50% sacarosa 7.5 g/L favoreció la sobrevivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*.

- En la sobrevivencia *ex vitro* de las plantas se observó una mayor influencia de la combinación hormonal de la cual se regeneraron los brotes, que su paso por una etapa de aclimatización *in vitro*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al establecimiento de una metodología de micropropagación en esta especie, y pueden servir de base para otras especies del género *Astrophytum*, sin embargo, estudios anatómicos y fisiológicos del material vegetal durante el cultivo *in vitro* pueden contribuir al mejoramiento de este sistema de propagación.

LITERATURA CITADA

- Alonso, LG.** 1964. Estudio monográfico de las cactáceas del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México. 53p.
- Arias, S; Guzmán, U; Mandujano, MC; Soto-Galván, M y Golubov, J.** 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La lista Roja (IUCN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas mexicanas*. 50:100-110.
- Arias-Montes, AS.** 1989. Variación Morfológica de *Astrophytum ornatum* (DC.) Web. (Cactaceae) en cuatro poblaciones de las zonas áridas queretana e hidalguense. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México.
- Arredondo-Gómez, A y Camacho-Morfín, F.** 1995. Germinación de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) en relación con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 40:34-38.
- Ault, JR y Blackmon, WJ.** 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience*. 22(1):126-127.
- Baker, WP y Marín, LE.** 1999. Successful cloning of the "saguaro" (*Carnegiea gigantea*, Cactaceae). *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*. 31(2) 97-100.
- Benítez, H y Dávila, P.** 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas*. 6 (40): 8-11.
- Benson, L.** 1977. Preservation of cacti and management of ecosystem. *In*: Prance, GT y Elías, TS (eds.). *Extinction is forever*. New York Botanical Garden, N.Y. 283-300 p.

- Beristain, MSR.** 1997. Germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire en relación con la disponibilidad de luz, lugar de procedencia y reguladores del crecimiento. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México.
- Bewley JD y Black M.** 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Development, germination and growth. Springer-Verlag. New York. 306 p.
- Bonness, MS; Paré, PW y Mabry, TJ.** 1993. Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cactus and Succulent Journal*. (US). 65:144-147.
- Bravo-Hollis, H y Sánchez-Mejorada, H.** 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. UNAM. México. 20-61 p.
- Bravo-Hollis, H y Sánchez-Mejorada, H.** 1991a. Las Cactáceas de México. Vol. II. UNAM. México. 643 p.
- Bravo-Hollis, H y Sánchez-Mejorada, H.** 1991b. Las Cactáceas de México. Vol. II. UNAM. México. 91-101 p.
- Bregman R y Bouman F.** 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 86:357-378.
- Castro-Gallo, IA; Meza-Rangel, E; Pérez-Reyes, ME y Pérez-Molphe-Balch, E.** 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae*. 4(2):5-24.
- Challenger, A.** 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO, Instituto de Biología-UNAM. México. 847 p.

- Chávez, VMA y Rubluo AI.** 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. *In*: Linares, E; Dávila, P; Chiang, F; Bye, R y Elías, TS. (eds.). Conservación de Plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México.123-131 p.
- CITES. 2001a.** Detección de traficantes de cactáceas en México. Undécima reunión del comité de Flora. Langkawi (Malasia). 1-2 p.
- CITES. 2001b.** Venta de Cactus en Internet, Comercio de cactus Mexicanos. Undécima reunión del comité de Flora. Langkawi (Malasia). 1-2 p.
- CITES. 2002.** Venta de Cactus en Internet. Duodécima reunión del comité de Flora. Leiden (Países Bajos). 1-4 p.
- Comparán-Sánchez, S y Luna-Martínez, J.** 2004. Propagación por cultivo de tejidos de la especie *Astrophytum capricorne* Britton et Rose. *In*: Hernández, RMP; Cházaro, HRM; Cházaro, BMJ; Vázquez, GJA. (eds.). Libro de Resúmenes IV Congreso Mexicano y Latinoamericano y del Caribe de cactáceas y otras suculentas, del 3 al 9 de mayo del 2004, Guadalajara, Jalisco, México.
- CONABIO, 1998.** La diversidad biológica de México: estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. 341 p.
- CONANP, 2003.** Programa de Manejo Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlán. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México. 202p.
- Davies, PJ.** 1990. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. *In*: Davies, PJ. (Ed.). Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer Academic Publishers.1-11 p.

- De la Rosa, HJP y Santamaría, AD.** 1998. El nopal. Usos, manejo agronómico y costos de producción en México. CONAZA-UACH–CIESTAAM. México. 182 p.
- Debergh, P; Aitken-Christie, J; Cohen, D; Grout, B; Von Arnold, S; Zimmerman, R y Ziv, M.** 1992. Reconsideration of the term “Vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30:135-140.
- Debergh, PC y Maene, LJ.** 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 14:335-345.
- Elías-Rocha, MA; Santos-Díaz, MS y Arredondo-Gómez, A.** 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia*. 6:96-101.
- Escobar-Santos, VE y Huerta-Martínez, FM.** 1999. Relaciones ecológicas de *Ferocactus histrix* (DC.) Lindsay en los llanos de Ojuelos, Jalisco-Zacatecas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 44(2):40-48.
- Evans, NE.** 1990. Micropropagation. In: Pollard, JW y Walter, JM. (eds.). Methods in Molecular Biology, vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 93-102 p.
- Fay, MF y Gratton, J.** 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya*.10:33-48.
- Fay, MF.** 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. *Biodiversity and Conservation*. 3:176-183.

- Flores-León, R y Ortiz-Montiel, G.** 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia*. 7:92-96.
- Ford-Lloyd, B y Jackson, M.** 1986. Conservation. In Ford-Lloyd y Jackson (eds.). Plant Genetic Resources: An introduction to their conservation and use, Baltimore. 50-67 p.
- Gaspar, T; Kevers, C; Penel, C; Greppin, H; Reid, DM y Thorpe, TA.** 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology*. 32:272-289.
- Giusti, P; Vitti, D; Fiocchetti, F; Colla, G; Saccardo, F y Tucci, M.** 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 1790:1-14.
- Glass, CE.** 1998. Guía para la identificación de las cactáceas Mexicanas. UNAM-CONABIO. Fideicomiso Fondo para la Biodiversidad.
- Gómez-Hinostrosa, C y Hernández, HM.** 2000. Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, México. *Biodiversity and Conservation*. 9:403-418.
- González, DA; Riojas, LME y Arreola, NHJ.** 2001. El género *Opuntia* en Jalisco. Guía de campo. Universidad de Guadalajara-CONABIO. México. 135p.
- Gratton, J y Fay, MF.** 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. In: Pollard, JW y Walker, JM. (eds.). Methods in molecular biology, vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 219-225 p.
- Guzmán, U; Arias, S y Dávila, P.** 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM-CONABIO. México. 315 p.

- Hájek, F.** 1977. Observaciones sobre *Astrophytum ornatum* y *Astrophytum myriostigma* y sus variedades. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 22:88-91.
- Hernández, HM y Godínez, HA.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26:33-52.
- Hernández, HM y Bárcenas, RT.** 1995. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert. I. Distribution patterns. *Conservation Biology*. 9(5): 1176-1188.
- Hernández, HM; Gómez-Hinostrosa, C y Bárcenas, RT.** 2001. Diversity, spatial arrangement, and endemism of Cactaceae in the Huizache area, a hot-spot in the Chihuahuan Desert. *Biodiversity and Conservation*. 10:1097-1112.
- Hernández, HM; Gómez-Hinostrosa, C y Goettsch, CA.** 2004. Cactáceas. *In:* García-Mendoza, AJ; Ordoñez, MJ y Briones-Salas, M. (eds.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza-World Wildlife Found. México.199-207 p.
- Hoock, H.** 2001. Die Gattung / The Genus *Astrophytum* Lemaire. Dokumente, daten und monographie.
<<http://www.astrobases.de/ornatum/bilder/Metz1/index.htm>>. Fecha de consulta: 10 de abril de 2007. Fecha de última modificación: 13 de marzo de 2007.
- Jiménez, SC.** 2002. *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto. (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 47 (1).

- Jiménez-González, EA.** 1998a. Generalidades del cultivo *in vitro*. *In: Pérez-Ponce, JN.* (Ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas, Cuba. 13-42 p.
- Jiménez-González, EA.** 1998b. Cultivo de ápices y meristemas. *In: Pérez-Ponce, JN.* (Ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Cuba. 45-65 p.
- Jiménez-Rodríguez, JA; Mata-Rosas, M y Chávez-Ávila, VM.** 2001. Micropropagación de *Astrophytum myriostigma* Lem. Resúmenes XV Congreso Mexicano de Botánica, del 14 al 19 de octubre del 2001, Querétaro, Qro, México.
- Johnson, JL y Emino, ER.** 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal.* (US). 51:275-277.
- Kadleček, P; Tichá, I; Haisel, D; Čapková, V y Schäfer, C.** 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science.* 161:695-701.
- Litz, RE y Jaiswal, V.** 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. *In: Debergh, PC y Zimmerman, RH.* (eds.). Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 247-263 p.
- Lizalde-Viramontes, H; Pérez-Molphe, BE; Pérez-Reyes, ME y Dávila-Figueroa, C.** 2004. Propagación por técnicas de cultivo de tejidos de cactáceas de los géneros *Astrophytum*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Epithelantha*, *Ferocactus* y *Morangaya*. *In: Hernández, RMP; Cházaro, HRM; Cházaro, BMJ; Vázquez, GJA.* (eds.). Libro de Resúmenes IV Congreso Mexicano y Latinoamericano y del Caribe de cactáceas y otras suculentas, del 3 al 9 de mayo del 2004, Guadalajara, Jalisco, México.

Llamoca-Zárate, RM; Studart-Guimarães, C; Landsmann, J y Campos, FAP.

1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 58:155-157.

López-Escamilla, AL. 2000. Organogénesis y adquisición de la competencia morfogénica a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez (Gymnospermae), especie en peligro de extinción. Tesis de Doctor en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. 126 p.

Machado, MFPS y Prioli, AJ. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cell Development Biology*. 32:199-203.

Majada, JP; Tadeo, F; Fal, MA y Sanchez-Tamés, R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 63:207-214.

Malda, G; Backhaus, RA y Martin, C. 1999a. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell tissue and Organ Culture*. 58:1-9.

Malda, G; Suzán, H y Backhaus, R. 1999b. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*. 81:71-87.

Mata-Rosas, M; Monroy, RMA; Goldammer, KM y Chávez-Ávila, VM. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass Et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Development Biology*. 37:400-404.

Mauseth, JD. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal*. 51:186-187.

- Mauseth, J.** 1998. Energy metabolism: photosynthesis. *In: Mauseth, J. (Ed.). Botany an introduction to plant biology 2nd edition.* Janes y Bartlett Publishers. 262-294p.
- Minocha, SC y Mehra, PN.** 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany.* 61(2):168-173.
- Murashige, T y Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15:473-479.
- Olguín, SLP.** 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México. 85 p.
- Oliveira, SA; Machado, MFPS; Prioli, AJ y Mangolin, CA.** 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Society for In Vitro Biology.* 31:47-50.
- Ortiz-Montiel, JG y Alcántara-García, R.** 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas.* 42:3-6.
- Pelah, D; Kaushik, RA; Mizrahi, Y y Sitrit, Y.** 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 71:81-84.
- Pérez, JC; Flores, R y Ortiz, G.** 1999. Reproducción *in vitro* del "Cactus de Navidad" *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas.* 44:79-83.

- Pérez-Molphe-Balch, E; Pérez-Reyes, ME; Villalobos-Amador, E; Meza-Rangel, E; Morones-Ruiz, LR y Lizalde-Viramontes, HJ.** 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Development Biology.* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E y Dávila-Figueroa, CA.** 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cell Development Biology.* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E; Pérez-Reyes, ME; Dávila-Figueroa, CA y Villalobos-Amador, E.** 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *HortScience.* 37(4):693-696.
- Pérez-Tornero, O; Egea, J; Olmos, E y Burgos, L.** 2001. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. *In vitro Cell Development Biology.* 37:250-254.
- Pospíšilová, J; Tichá I; Kadleček, P; Haisel, D y Plzáková, Š.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum.* 42 (4): 481-497.
- Preece, JE y Sutter, EG.** 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In:* Debergh, PC y Zimmerman, RH. (eds.). Micropropagation. Technology and application. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 71-93 p.
- Primack, R.** 2000. Conservation at the population and species levels. *In:* Primack, R. (Ed.). A primer of conservation biology. Sinauer Associates Inc. Publishers. U.S.A. 121-182 p.

- Primack, R.** 2002. *Ex situ* conservation strategies. *In*: Primack, R. (Ed.). Essentials of conservation biology 3rd edition. Sinauer Associates, Inc Publishers. U.S.A. 377-412 p.
- Primack, R; Rozzi, R y Feinsinger, P.** 2001. Establecimiento de áreas protegidas. *In*: Primack, R; Rozzi, R; Feinsinger, P; Dirzo, R y Massardo, F. (eds.). Fundamentos de conservación biológica: perspectivas latinoamericanas. Fondo de Cultura Económica. México. 449-475 p.
- Rabenda, I.** 1990. Breaking dormancy in cactus seed. Part 1. *Cactus and Succulent Journal*. (US). 62 (2): 86, 94.
- Roberts, AV; Smith, EF y Mottley, J.** 1990. The preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization. *In*: Pollard, JW y Walker, JM. (eds.). Methods in Molecular Biology. *Plant Cell Tissue Culture*, Vol 6. Humana Press. 227-236 p.
- Rodríguez-Garay, B y Rubluo, A.** 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal*. (U.S.) 64:116-119.
- Rojas-Martínez, AE.** 2003. Murciélagos: Arquitectos del desierto. El silencioso trabajo en pro de la vegetación. *Ciencia y Desarrollo*. Marzo-Abril. 4-9 p.
- Rosas, LUY.** 2002. Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México. 109 p.
- Rubluo, A.** 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). *In*: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). Biotechnology in agriculture and Forestry, vol 40. Springer-Verlag. Berlin. 193-205 p.

- Rzedowski, J.** 1993. Diversity and origins of the fanerogamic flora of Mexico. *In:* Ramamoorthy, TP Bye, R; Lot, A y Fa, J. (eds.). Biological diversity of México. Origins and distribution. Oxford University Press, Nueva York.129-144 p.
- Sánchez-Martínez, E; Galindo, G y Hernández, J.** 1995. Propagación de cactáceas del Estado de Querétaro, México: estrategia para su conservación. *In:* Linares, E; Dávila, P; Chiang, F; Bye, R y Elías, TS. (eds.). Conservación de Plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México.107-115 p.
- Sánchez-Mejorada, H.** 1978. Manual de campo de las cactáceas y suculentas de la Barranca de Metztitlán. Sociedad Mexicana de Cactología A. C. México. 28 p.
- Sánchez-Mejorada, H.** 1986. Suculentas. *In:* Lot, A y Chiang, F. (eds.). Técnicas especiales de recolección y preparación de ejemplares de grupos selectos de plantas. Consejo Nacional de la flora de México, A.C. México.103-111p.
- Santos-Díaz, MS; Méndez-Ontiveros, R; Arredondo-Gómez, A y Santos-Díaz, ML.** 2003a. *In vitro* organogenesis of *Pelecycphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro Cell Development Biology.* (39) 480:484.
- Santos-Díaz, MS; Méndez-Ontiveros, R; Arredondo-Gómez, A y Santos-Díaz, ML.** 2003b. Clonal propagation of *Turbinicarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction. *Bradleya.* (21) 7:12.
- Schaeffer, WI.** 2003. Terminology Associated with Cell, Tissue and Organ culture, Molecular biology and molecular genetic. *In vitro Cell Development Biology.* 26:97-101.

- Scheinvar, L.** 1982. La familia de las cactáceas en el Estado de México. Tesis de Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México.
- Scheinvar, L.** 1993. Datos preliminares sobre la flora cactológica del estado de Hidalgo. *In: Villavicencio, MA; Marmolejo, YS y Pérez-Escandón, BE.* (eds.). Investigaciones recientes sobre Flora y Fauna de Hidalgo, México. UAEH. México. 37-110 p.
- Scheinvar, L.** 2004. Flora cactológica del estado de Querétaro. Diversidad y riqueza. Fondo de Cultura Económica. México. 392 p.
- Selvakumar, V; Anbudurai, PR y Balakumar, T.** 2001. *In vitro* propagation of the medicinal plant *Plumbago zeylanica* L. through nodal explants. *In vitro Cell Development Biology.* 37:280-284.
- SEMARNAT.** 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. *Diario Oficial de la Federación.* México.
- Smith, RH; Burdick, PJ; Anthony, J y Reilley, AA.** 1991. *In Vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience.* 26(3):315.
- Starling, RJ y Dodds, JH.** 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya.* 1:84-90.
- Starling, RJ.** 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus and Succulent Journal.* (U.S.). 57:114-115.
- Stuppy, W y Nagl, W.** 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya.* 10: 85-88.

- Talavera, CR; Espadas, FL; Aguilar, ML; Maust, BE; Oropeza, CM y Santamaría, JM.** 2001. The control of leaf water loss by coconut plants cultured *in vitro* depends on the type of membrane used for ventilation. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 76 (5) 569-574.
- Vázquez-Yañez, C y Rodríguez-Hernández, MC.** 1995. Bancos de semillas: relación entre hábitat de origen y longevidad potencial en almacenamiento. *In: Linares, E; Dávila, P; Chiang, F; Bye, R y Elías, TS.* (eds.). Conservación de Plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 117-121p.
- Vázquez-Zalapa, T; Calderón, GE; Martínez, JC; Ortiz, AF; Pérez, AO; Hernández, OD y Martínez-Palacios, A.** 2004. Micropropagación de cactáceas en peligro de extinción. *In: Hernández, RMP; Cházaro, HRM; Cházaro, BMJ; Vázquez, GJA.* (eds.). Libro de Resúmenes IV Congreso Mexicano y Latinoamericano y del Caribe de cactáceas y otras suculentas, del 3 al 9 de mayo del 2004, Guadalajara, Jalisco, México.
- Velázquez-Enciso, LE y Soltero-Quintana, R.** 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 46:56-62.
- Villavicencio-Gutiérrez, EE; Villegas-Monter, A; Arellano-Ostoa, G y Vargas-Hernández, J.** 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 44(2): 49-55.
- Vovides, AP y Gómez-Pompa, A.** 1977. The problems of threatened and endangered plant species of México. *In: Prance, GT y Elías, TS.* (eds.). Extinction is forever. New York Botanical Garden, N.Y. 77-88 p.

- Vovides, AP; Luna, V y Medina, G.** 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*. 39:1-42.
- Vyskot, B y Jára, Z.** 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*. 59(3):449-452.
- Wakhlui, AK y Bhau, BS.** 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In vitro Cell Development Biology*. 36:211-214.
- Withers, LA; Wheelans, SK y Williams, JT.** 1990. *In vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica*. 45:9-22.
- Ziv, M.** 1991. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In: Debergh, PC y Zimmerman, RH. (eds.). Micropropagation. Technology and Application, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.* 45-69 p.

APÉNDICE 1. Descripción botánica de *Astrophytum ornatum* (Arias-Montes, 1989; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b)

Planta de tallo en principio esférico, globoso y hasta columnar de 15-25 cm de diámetro y 50-100 cm y hasta 2 metros de altura, no ramifica a menos que sufra daños mecánicos. *Epidermis* en principio color verde claro a opaco, luego grisáceo cubierta de abundantes estigmas escamosos (tricomas) menos conspicuos en tallos adultos. *Raíces* fibrosas, de hasta 2 m de largo. *Costillas* prominentes, agudas de 5 a 8, de 5-6 cm de altura o más. *Aréolas* distantes (1.5 a 2.5 cm), elípticas, de 0.9-1.8 cm de largo y de 0.7-1.2 cm de ancho y lana de color amarillento en la zona basal. *Espinas*; radiales de 6-8 ó 10, de 2 a 5 cm de longitud, gruesas, rígidas, rectas a ligeramente curvas, color amarillo ámbar, base rojiza o pardo oscura, se desarrollan en forma horizontal; centrales, por lo general 1, a veces 2, de 7-10 cm de largo, similares a las radiales pero más rígidas, gruesas y largas. *Flores* diurnas, cercanas al ápice, de 7-9 cm de largo y 4 de ancho, de color amarillo-verdoso y en forma de embudo; pericarpelo globular, de 0.5 a 1 cm de longitud y de 3 a 7 cm de diámetro cubierto de escamas largas y agudas, lanosas, con borde dentado; segmentos exteriores del perianto lanceolados, amarillentos, con espinas puntiagudas color café, borde superior dentado, (0.6 a 1.5 cm de largo y de 0.2 a 0.8 cm de ancho); segmentos interiores del perianto amarillo claro, agudos, con bordes dentados, (1.5 a 2.5 cm de largo y de 0.7 a 1.0 cm de ancho); estambres amarillos, granos de polen 12 (-15) colpados; cavidad ovárica elíptica. *Fruto* globoso, semiseco, dehiscente (se abre como estrella al liberar las semillas) de color verde opaco, 2.5-3 cm de largo y de 1.3 cm de diámetro, cubierto totalmente de escamas y lana amarilla. *Semillas* naviculares (forma de sombrerete) de 2.5-3 mm de longitud y 1.5-1.7 mm de ancho, hilo de 2.4 a 2.8 mm de longitud, testa verrucosa brillante y negra a pardo oscura.

APÉNDICE 2. Formulación de los medios de cultivo:

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y MS 50%

	MS 100%	MS 50%
Macronutrientes	mg/L	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	17	8.5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440	220
Micronutrientes		
KI	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9	8.45
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	4.3
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.0125
Solución de Hierro-EDTA		
NaEDTA	37.3	18.65
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	13.9
Vitaminas		
Ácido nicotínico	0.5	0.25
Piridoxina-HCl	0.5	0.25
Tiamina-HCl	0.1	0.05
Aminoácidos		
Inositol	100	50
Glicina	2	1
Sacarosa (g/L)	30	15
Agar (g/L)	8	8