



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Análisis fisiológico del efecto de tres marcas de agar y Gelrite
en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de
Echinocactus platyacanthus Link et Otto (Cactaceae)**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
CLAUDIA LOAIZA ALANIS

DIRECTOR: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2008

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGÍA VEGETAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA.

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitirme ingresar para realizar mis estudios y el presente trabajo.

Al proyecto El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del Estado de Hidalgo FOMIX-HGO-2005-C01-053 por la beca otorgada para la realización de éste trabajo.

A todos mis profesores por haber sido una fuente de aprendizaje fundamental en mi formación, por que gracias al ejemplo de todos ustedes he llegado hasta donde estoy en este momento, especialmente a las profesoras Lupe, Beatriz y Brenda y los profesores Azael y Elpidio.

A la M. en C. Rosario Ramírez Trejo por enseñarnos a querer otro poco las plantas, gracias al amor y dedicación con que nos impartió el curso de Plantas.

A la Doctora Ana Laura López Escamilla por todo el apoyo y paciencia para dirigir mi trabajo de tesis y por compartir conmigo sus conocimientos y consejos, muchas, muchas gracias.

A la Doctora Maritza López Herrera por el apoyo para la realización de éste trabajo y por todos sus consejos desde el principio, muchas gracias.

A las autoridades y personal de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán por las facilidades proporcionadas y la donación de semillas de *Echinocactus platyacanthus*.

A los profesores Dra. Maritza López Herrera, M. en C. Leticia Romero Bautista, M. en C. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, Dr. Arturo Sánchez González, M. en C. Manuel González Ledesma y Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval por la revisión de éste trabajo.

A mis compañeros y **amigos** del laboratorio de Morfofisiología Vegetal por todo el apoyo, aprendizaje y momentos de alegría que hemos compartido juntos, con cariño y afecto a Miriam, Su Lin, Alejandra, Roberto, Nelly y Alejandro, gracias por todo.

A mis amigos: Víctor gracias por tu apoyo y consejos, así como tu disposición de ayuda cada vez que he necesitado algo, Chepis por hacer mucho más llevaderos los días de trabajo y de tristeza gracias al entusiasmo y alegría que se contagia

A mis padres Martha y Gonzalo, por darme la vida y mostrarme el camino para que ésta sea mejor, gracias por la libertad, confianza, amor, apoyo, respeto, etc., etc., etc. con que me han permitido vivir, muchas e infinitas gracias. A mis hermanos Lili y Gabriel por el cariño con que me han apoyado en todo momento y por compartir todas mis locuras, tristezas y alegrías, ah y también por soportarme gracias. Los quiero mucho.

A toda mi familia y amigos, a mis tíos, primos y abuelos que siempre me están echando porras para seguir adelante, a los que físicamente ya no se encuentran pero siempre están cerca de mi, gracias por haber sido parte de mi vida y por los días compartidos.

Un agradecimiento especial con todo mi cariño para mi tía Consuelo y mi tío Héctor, quienes siempre han sido un gran apoyo para mi familia, gracias por todo.

A ti que apareciste en mi vida fugazmente para iluminar mi camino y ser un ángel en mi vida, en donde quiera que te encuentres te quiero mucho y siempre vas a estar en mi corazón Javi.

Gracias a todos por estar conmigo y darme fuerzas para seguir adelante cuando creo que me he rendido, por apoyarme incondicionalmente y sobretodo por existir y estar ahí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	10
1. El cultivo de tejidos	10
2. Problemas frecuentes dentro del cultivo de tejidos vegetales	11
3. Agar, Gelrite y otros agentes gelificantes	12
4. El potencial hídrico	21
5. Pigmentos fotosintéticos	23
6. Generalidades de las cactáceas	25
7. <i>Echinocactus platyacanthus</i>	27
8. Germinación <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> del género <i>Echinocactus</i>	28
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. OBJETIVOS	30
1. General	
2. Particulares	
V. MATERIAL Y MÉTODO	31
1. Elaboración de medio de cultivo con cuatro agentes gelificantes	31
2. Medición del potencial hídrico	31
3. Cultivo <i>in vitro</i>	32
4. Cultivo <i>ex vitro</i> para grupo control	33
5. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1. Medición del potencial hídrico	36
2. Cultivo <i>in vitro</i>	39
a. Germinación	40
b. Características morfológicas de las plántulas sembradas en los diferentes agentes gelificantes	43
3. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos	50
VII. CONCLUSIONES	54
Literatura citada	56
Anexo I	65
Anexo II	67

ABREVIATURAS

A-A	Agar-agar Sigma
BA	Benciladenina
Bacto	Bacto agar Difco
FeEDTA	Etilen diamino tetraacetato
GA ₃	Ácido giberélico
Gr	Gelrite Gellan Gum Sigma
2iP	6 dimetil alil aminopurina
K	Kinetina
MS50%	Medio de cultivo Murashige y Skoog al 50% de sus componentes
nm	nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
SH	Medio de cultivo Schenk y Hildebrant

RESUMEN.

El agar, componente importante en el cultivo *in vitro*, es uno de los agentes gelificantes de mayor costo entre los elementos para la elaboración del medio de cultivo y de los más utilizados; por ello y para optimizar su uso y evaluar cómo puede afectar el proceso de la germinación, en el presente estudio se utilizó a *Echinocactus platyacanthus* como modelo para el análisis fisiológico del efecto del agente gelificante sobre plántulas germinadas *in vitro*. De las semillas sembradas asépticamente en medio de cultivo Murashige y Skoog al 50% de sus componentes (MS 50%) y gelificado con tres marcas de agar y Gelrite: Agar-agar Sigma (6 g L^{-1}), Bacto agar Difco (8 g L^{-1}), agar bacteriológico Bioxon (8 g L^{-1}) y Gelrite Gellan Gum Sigma (3 g L^{-1}), se obtuvieron las curvas de germinación acumulada en cada medio, se describieron las diferencias morfológicas en las plántulas y se realizó la cuantificación de pigmentos fotosintéticos de estas. Con una cámara psicométrica se midió el potencial hídrico de los medios (recién elaborado e incubado tres meses). El 100% de germinación se obtuvo en Gelrite. Se observaron diferencias en el tamaño de las plántulas, largo de las raíces, presencia o ausencia de tricomas en las aréolas, color, cantidad de espinas y tamaño del epicótilo. Las plántulas de Bacto agar Difco presentaron mayor porcentaje de clorofila *a*, *b* y total (0.81, 1.29 y 2.06% respectivamente), los carotenos muestran valores negativos, presentando Gelrite el mayor porcentaje (-0.11 %), se encontraron diferencias significativas entre los valores registrados en agar Bioxon, Bacto agar Difco y Agar-agar con respecto a los de Gelrite y el grupo control. El medio fresco elaborado con Agar-agar registró un potencial hídrico de -0.48 MPa y el incubado por tres meses, el medio con Bacto agar presentó el mayor potencial (-0.48 MPa).

I. INTRODUCCIÓN.

Mediante el cultivo de tejidos vegetales se pueden estudiar diversos aspectos de la biología vegetal, como la fisiología y bioquímica de las plantas que se cultivan mediante ésta técnica, su éxito depende sustancialmente del medio de cultivo empleado (Szabados *et al.*, 1993), para ello se utilizan una gran cantidad de medios de cultivo que cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para sostener el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Algunos de estos medios son específicos y se adaptan a un sólo tipo de tejido o a una determinada especie vegetal, mientras que otros son de uso más general, como el formulado por Murashige y Skoog en 1962 (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

El medio de cultivo (que puede ser sólido o líquido) proveerá de nutrimentos y agua al explante y al mismo tiempo le proporcionará soporte. En el caso del medio de cultivo sólido, se utilizan diferentes agentes gelificantes, como son: la agarosa, ficol, isubgol, gum Katira, carrágeno, Gelrite, Phytigel y agar, entre otros (Babbar *et al.*, 2005). Cada uno de los anteriores difiere en el material de procedencia y de manera general se ha considerado que los agentes gelificantes no intervienen en el crecimiento y desarrollo de la planta (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Se ha podido observar en diferentes estudios que el agar no es inerte fisiológicamente, puesto que posee cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999), lo anterior, probablemente le confiera diferentes particularidades en el potencial hídrico que permitirán una mayor o menor toma de agua y nutrimentos al tejido y que se reflejará en las características fisiológicas y morfológicas del explante. De igual manera, la concentración de los agentes gelificantes afecta el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Marga *et al.*, 1997). El evaluar cómo afecta el agente gelificante utilizado en las plantas cultivadas *in vitro*, permitirá ampliar los conocimientos sobre esta área y optimizar recursos para obtener resultados más prometedores.

El descenso en las poblaciones de cactáceas debido a la destrucción de hábitats y al comercio ilegal (Godínez, 1991), han sido las causas principales para el desarrollo de estrategias para su protección y conservación, siendo el cultivo de tejidos vegetales una de las técnicas que se utiliza para obtener plantas rápida y continuamente (Malda *et al.*, 1999), sin embargo, es necesario hacer estudios que permitan optimizar los recursos que se utilizan en el cultivo de cactáceas. En la actual investigación se utilizó como modelo de estudio a *Echinocactus platyacanthus*, con la finalidad de analizar el efecto fisiológico de tres marcas de agar y Gelrite en la germinación y desarrollo de plántulas cultivadas *in vitro*, y de esta manera proporcionar datos para que se realicen más trabajos de este tipo en la familia de las cactáceas.

II. ANTECEDENTES.

1. El cultivo de tejidos

El cultivo *in vitro* se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten cultivar en condiciones asépticas órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos. Su origen se remonta a principios del siglo XX; en el año de 1902 cuando Haberlandt intenta cultivar células aisladas de plantas, es él quien postula el principio de la totipotencialidad celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan las técnicas del cultivo *in vitro* (Dodds y Roberts, 1995; Jiménez, 1998). A partir de este momento comienza a desarrollarse una serie de prácticas e implementación de diferentes técnicas, como es el caso de White y Gautheret que a mediados del siglo XX desarrollaron las bases en las que se fundamentan los métodos actuales para lograr el cultivo de tejidos vegetales como se le conoce hoy en día. Debido a la ignorancia de tres factores fundamentales, los primeros trabajos que se desarrollaron, no tuvieron gran éxito: uno de ellos fue el desconocimiento acerca de los requerimientos nutricionales de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, otro fue el uso de tejidos vegetales maduros y bien diferenciados y el tercero el desconocimiento de la acción de fitohormonas o reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetal (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Con el perfeccionamiento de las herramientas para el cultivo *in vitro*, como son el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento acerca de los reguladores de crecimiento, entre la década de los años 40 y la década de los 50's (Krikorian, 1985; Jiménez, 1998), se han implementado diferentes medios de cultivo de acuerdo con los requerimientos nutricionales específicos que tiene cada tipo de planta. Los medios específicos son variaciones de los medios básicos de acuerdo a las necesidades de una determinada especie en cuanto a fuentes de materia química y reguladores de crecimiento se refiere (Fontúrbel, 2002). Uno de los medios básicos más usado es el medio Murashige y Skoog (MS), formulado en 1962 (Murashige y Skoog, 1962), que tiene, compuestos inorgánicos, los cuales son: macronutrientes, cloruro de calcio y

micronutrientes, los cuales podemos encontrar también en otros medios de cultivos, en diferentes concentraciones; mientras que los compuestos orgánicos son: vitaminas, inositol, solución de FeEDTA y glicina. Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos, de acuerdo con las necesidades que la planta tenga de toma de agua y nutrimentos. El medio líquido facilita la absorción de nutrimentos y agua al explante, a éste no se le adiciona ningún tipo de agente gelificante, en algunos casos el sustrato usado para soportar el material biológico comúnmente son puentes de papel filtro; en el caso del medio de cultivo sólido, se han utilizado una gran variedad de agentes gelificantes; como es el caso de los carrágenos, alginatos, ficol, agarosa, isubgol como sustitutos de agar (Jain y Babbar, 2002), al igual que el de Phytigel y el agar son de los más utilizados.

2. Problemas frecuentes dentro del cultivo de tejidos vegetales.

Aún cuando el cultivo de tejidos vegetales representa una gran ventaja dentro de las distintas aplicaciones que involucra, en muchas ocasiones se presentan problemas que afectan el rendimiento de los cultivos, evitando que se obtengan resultados mucho más prometedores. Algunos de ellos son: la contaminación por bacterias y hongos, los patógenos internos, exudación excesiva y brotes necróticos.

Uno de los principales problemas que se ven reflejados dentro del cultivo de tejidos vegetales es un fenómeno llamado hiperhidratación o vitrificación como fue llamado anteriormente. Las plantas hiperhidratadas tienen una apariencia vidriosa en sus hojas o tallos, frecuentemente exhiben internodos cortos y presentan una apariencia arrosada, el diámetro de los tallos puede ser grande o muy pequeño, las hojas gruesas, elongadas, arrugadas y/o curvadas, frágiles y translúcidas, con una superficie reducida o hipertrofiada. El color puede ser anormal y la iniciación de raíces adventicias en brotes es usualmente difícil (Kevers *et al.*, 1984; Debergh *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 2002).

Se han enlistado un gran número de factores como posibles responsables de la hiperhidratación, muchos de estos sólo actuarán para inducir o evocar la hiperhidratación cuando otras condiciones en el sistema de cultivo no son optimizados. Por ejemplo, la benciladenina (BA) inducirá hiperhidratación cuando los cultivos sean estresados por otros factores, tales como alta capacidad de retención de agua en el espacio superior del contenedor. Dentro de los factores involucrados en la inducción y el control de la hiperhidratación están el tipo explante, el medio, el contenedor y el ambiente. El medio de cultivo que ha sido relacionado a la concentración y tipo de agente gelificante utilizado, la presencia de una capa líquida en el medio gelificado, el nivel y el tipo de citocinina, la concentración y composición de sales y la presencia de ciertos elementos minerales en abundancia (Debergh *et al.*, 1992).

La hiperhidratación parece ser consecuencia de una relación entre el potencial hídrico del agua en el medio y los brotes en desarrollo (Debergh *et al.*, 1992), éste fenómeno ocurre en mayor proporción en medio líquido y con menor frecuencia en medio sólido, altas concentraciones del agente gelificante evitan en gran medida este desorden; igualmente ha sido útil disminuir la concentración de citocininas, sustituyéndola por otra hormona o agregando agentes antivitrificantes (Hartmann *et al.*, 2002), incrementar las concentraciones de Ca^{2+} y disminuir las de NH_4 o Cl^- ha sido de ayuda para evitar o reducir la hiperhidratación, otras técnicas han incluido el uso de pectina o agar hidrolizado, floridzina o floroglucinol, CoCl_2 , fructosa o galactosa como una fuente de carbono, metionina, AgNO_3 y retardadores del crecimiento (Debergh *et al.*, 1992).

3. Agar, Gelrite y otros agentes gelificantes.

Se conoce como agentes gelificantes a los componentes del medio de cultivo que se utilizan para mantener a éste en un estado semisólido o sólido y que proporciona un sostén al explante.

Inicialmente los experimentos fueron basados en agares de los laboratorios Difco y estos contenían contaminantes desconocidos; consecuentemente, el agente gelificante fue un suplemento nutricional. Hoy en día hay una amplia variedad de agentes gelificantes relativamente puros. El tipo de agente gelificante y las concentraciones a ser empleadas pueden ser tan importantes como la selección de la mezcla ideal de nutrimentos. Algunos ejemplos de agentes gelificantes son los siguientes: agarosa, Phytigel, que es un sustituto de agar sintetizado desde gomas gelificantes y junto con Agargel (Sigma) fueron utilizados para controlar la vitrificación de los cultivos. Transfergel (Sigma) es un gel portador, suplementado con un medio nutricional completo para la siembra de propágulos tales como embriones somáticos, microcortes y brotes (Dodds y Roberts, 1995). Los agentes gelificantes antes mencionados, sólo representan algunos ejemplos de los que son utilizados y que pueden ser elaborados por diferentes laboratorios o compañías, como son Sigma, Kelco, Laboratorios Difco, Baltimore, Merck, Becton Dickinson y Bioxon, entre otros.

El agar es un agente gelificante comúnmente utilizado (Bonga y Von Aderkas, 1992); etimológicamente, la palabra agar viene de la lengua Malaya, la cual describe a una alga roja del género *Eucheuma*. El agar es un polisacárido extraído de algas marinas pertenecientes a la familia de las Rodophyceae. Es una mezcla de polisacáridos complejos (glúcidos o carbohidratos) principalmente agarosa, agarpectina, galactosa y ácido urónico: la pared celular de estas algas está diferenciada en una capa interna de celulosa y una externa amorfa de naturaleza péptica, rica en coloides gelificados. Estas sustancias son indigeribles y constituyen fibra de tipo soluble (<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>)

Las principales características del agar son: es un hidrocoloide completamente soluble en agua a 100°C, no aporta sabor, ni aroma y carece de color, es un gel termoreversible, gelifica entre 35 y 43°C, se derrite entre 85 y 95°C, es el único hidrocoloide que ofrece geles que pueden soportar temperaturas de esterilización, pero estas características pueden cambiar de acuerdo a la marca utilizada o el tipo de agente gelificante, como se puede observar en la tabla 1, donde se muestran algunas

características físicas como son la fuerza del gel y el punto de gelificación de los agentes gelificantes utilizados en este estudio (<http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-Agar>).

Tabla 1. Características físicas (según el productor) de los agentes gelificantes utilizados para el cultivo de *Echinocactus platyacanthus*.

Agente gelificante	Punto de gelificación °C	Pérdida en el secado (%)	Punto de fusión °C	Fuerza del gel (g cm ⁻²)
Agar-agar	32-35	10	84.5-87.5	800-1100
Bacto	3.6	17.3	88	600
Bioxon	32-38	5-11	85+/-5	650-900
Gelrite	30-45	6-16	No especificado	550-850

La composición del agar y la fuerza del gel, que es definida como fuerza que puede ser aplicada a un gel para que éste se fracture (Sigma, 2006) son influenciadas por la especie de alga que es utilizada para procesar y la concentración utilizada (Marga *et al.*, 1997), así como los nutrimentos, la intensidad de luz, temperatura, pH del medio de cultivo y la edad del tejido del alga.

El proceso que se utiliza para la obtención de agar no lo separa completamente de las sales solubles en el agua, pequeñas moléculas orgánicas, polisacáridos no gelificantes y otros polímeros permanecen en el extracto. Suplementos comerciales pueden contener mezclas de diferentes especies de algas marinas en proporciones variables, algunas de las cuales pueden ser algas pardas o rojas que no contribuyen en la extracción del agar (Nairn *et al.*, 1995).

Hace mas de 100 años, Robert Koch, introdujo el agar como agente gelificante para el medio de cultivo bacteriano, pero fue White en el año de 1939 el primero en usar el agar como agente gelificante para el medio de cultivo en tejidos vegetales (Babbar *et al.*, 2005) y es uno de los más usados debido a las ventajas que representa. La desventaja más importante es que el agar no es un producto estándar y como consecuencia, la marca y la cantidad de agar utilizada puede afectar el crecimiento y el desarrollo de los tejidos (Beruto *et al.*, 1999a).

El agar ha sido utilizado como el agente gelificante por excelencia, debido a sus propiedades, pero ya que es el componente más caro en la preparación del medio de

cultivo (Jain y Babbar, 2002; Babbar *et al.*, 2005), se han realizado trabajos probando la eficacia de otros agentes gelificantes que puedan utilizarse en su lugar y que tengan un efecto igual o parecido (Tabla 2). Se han empleado otros agentes gelificantes como Gelrite o Phytigel que son polisacáridos y su uso asegura la claridad de los geles y la preparación de medios de bajo costo (Podwyszynska y Olszewski, 1995).

Tabla 2. Algunos trabajos de propagación utilizando distintos tipos y concentraciones de agentes gelificantes

Espece	Tipo de agar utilizado	Concentraciones (g L ⁻¹)	Resultados	Referencia
<i>Malus</i> sp. "Almey" <i>Pyrus communis</i>	Phytagar	30, 60, 90, 120	Altas concentraciones reducción en la proliferación de brotes de 'Almey' Bajas concentraciones, excelente proliferación de brotes	Amer, 1982
<i>Malus</i> sp. <i>Pyrus</i> sp.	Phytagar	0-12	<i>Malus</i> sp. mayor proliferación de brotes en 3 g L ⁻¹ 28.1 brotes. <i>Pyrus</i> en 12 g L ⁻¹ 12.8 brotes	Singha, 1982
<i>Cydonia oblonga</i>	Bacto agar Difco	5, 6 y 7	Agar 5 g L ⁻¹ mayor número de brotes por explante (14.5)	Gulsen y Dumanoglu, 1991
	Sacarosa	20, 30, 40 y 50	Sacarosa 30 g L ⁻¹ mayor número de brotes (16.1), El incremento de sacarosa, aumenta el grosor, largo y tamaño del callo, su calidad es afectada debido a la fragilidad de los brotes y el envejecimiento temprano	
<i>Cucumis sativus</i> (embriones somáticos)	Gelrite Kelco	1.5, 3, 6	Gelrite 1.5 hiperhidratación Agar 7 g L ⁻¹ mayor cantidad de embriones somáticos en presencia de sacarosa	Ladyman y Girad 1992
	Agar Baltimore	3.5, 7, 14		
	Sacarosa, Fructosa, Maltosa y Glucosa	3		

Continúa **Tabla 2.**

Especie	Tipo de agar utilizado	Concentraciones (g L⁻¹)	Resultados	Referencia
<i>Ranunculus</i> sp.	Oxoid, Merck y Roth		Afectación de la disponibilidad del agua y los minerales para el tejido, pobre desarrollo y crecimiento de los brotes, algunas con síntomas de hiperhidratación, malformación de hojas, pecíolo muy alargado y algunas deformaciones estructurales.	Beruto <i>et al.</i> , 1999b
<i>Discorea trifida</i> <i>Discorea alata</i>	Phytigel Agar	1.3, 1.8, 2.3 7, 8, 9	Phytigel 1.3 y 1.8 g L ⁻¹ incrementó número de hojas, altura. Peso fresco y seco (ambas especies)	Chacón <i>et al.</i> , 2000

La mayor parte de estos trabajos implican la investigación de la influencia que tiene el agente gelificante en el crecimiento y desarrollo de los tejidos, evaluando la formación de brotes o de la germinación de embriones somáticos en especies de plantas leñosas, herbáceas o de importancia hortícola como la manzana y la pera principalmente.

Asimismo, se han realizado diversos experimentos evaluando la composición del medio, en los cuales se ha estudiado como es el efecto que tiene en los cultivos *in vitro* modificando las concentraciones de sacarosa, citocininas, tipos y concentraciones de agentes gelificantes y su interacción (Tabla 3).

Tabla 3. Diversos trabajos realizados empleando diferentes marcas y concentraciones de agentes gelificantes en combinación con citocininas, sales minerales, condiciones ambientales

Especie	Tipo de agar, medio de cultivo, fitohormona, condiciones de incubación, fuente de carbono utilizado	Concentraciones (g L ⁻¹)	Resultados	Referencia
<i>Cynara scolymus</i> (Alcachofa)	Siete marcas de agar	6, 8, 10, 11, 13, 15	Incremento del peso fresco con Difco agar a 6 g L ⁻¹ + 12 µM de BA. La hiperhidratación se incrementa al subir las concentraciones de BA y es superada incrementando las concentraciones de Difco Bacto agar	Debergh, 1983
<i>Malus</i> sp. (manzana) <i>Pyrus</i> sp. (pera)	Difco Bacto agar Phytagar Agar TC + Benciladenina	3 a 12	Los explantes fueron influenciados tanto por la marca del agar como por la concentración de estos	Singha y Townsed, 1985
Ocho especies de plantas leñosas	Agar y Gelrite + temperatura + obscuridad	No se especifican las concentraciones	Mejor supervivencia en medio gelificado con Gelrite que con agar.	Williams y Taji, 1987
Dos cultivares de <i>Malus</i> sp. (York y Vermont)	Bacto agar Gelrite diferentes concentraciones de K y Mg	7 1.0, 1.5, 2	Gelrite, altos porcentajes de hojas y ramas hiperhidratadas, 1.5 g L ⁻¹ mostró mayor número de brotes útiles totales (2.5) para el cultivar Vermont, no hubo diferencias significativas con las otras concentraciones de Gelrite y Bacto agar; el cual no ocasionó hiperhidratación y el número de brotes útiles para York fue de 3.2, encontrando diferencias significativas entre este y Gelrite.	Pasqualetto <i>et al.</i> , 1988

Continúa **Tabla 3.**

Especie	Tipo de agar, medio de cultivo, fitohormona, condiciones de incubación, fuente de carbono utilizado	Concentraciones (g L ⁻¹)	Resultados	Referencia
<i>Cydonia oblonga</i> (membrillo)	Varias concentraciones de Phytagar y calcio + BA	6 y 12	Phytagar 0.6% severa hiperhidratación y brotos necróticos. Phytagar 1.2% más calcio de 3, 18 y 30 μM decremento en el crecimiento de los brotes, e incremento lineal de K ⁺ , Ca ⁺ , Mg ⁺ y B ⁺ en los explantes al aumentarlo en el medio, decremento en Mn ⁺ y Na ⁺ .	Singha <i>et al.</i> (1990)

Existen también trabajos que han valorado diferentes parámetros, como el factor fisicoquímico del medio gelificante en distintos medios de cultivo, la influencia de la fuente de carbono, la naturaleza química y el comportamiento termal de los medios gelificados con diferentes tipos de agar (Tabla 4).

Tabla 4: Estudios realizados en relación a aspectos fisicoquímicos de los agentes gelificantes

Tipo de evaluación	Diferentes condiciones experimentales	Concentraciones	Resultados	Referencia
Influencia del medio basal, la fuente de carbono, el agente gelificante	Murashige y Skoog, White, B5, Nitsch y Nitsch, Schenck y Hilderbrandt	8 g L ⁻¹	Valores de pH post autoclave fueron mayores para medio conteniendo sacarosa y progresivamente menores con maltosa, glucosa y fructosa. Carbón activado neutralizado y ácido lavado también incrementó el pH post autoclave de medio MS líquido y solidificado con agar y el pH cambió demasiado durante ocho semanas de almacenamiento.	Owen <i>et al.</i> (1991)
	Bacto agar Difco, Noble agar Difco, agar T. C., agar Oxoid, agar Sigma, agar purificado Sigma, carrágeno			
	Phytagar y Agargel	2 g L ⁻¹		

Continúa **Tabla 4.**

Tipo de evaluación	Diferentes condiciones experimentales	Concentraciones	Resultados	Referencia
Naturaleza química y comportamiento termal de tres marcas de agares:	sacarosa y maltosa glucosa y fructosa	0.1M 0.2 M.	Los cambios en el pH del medio causados por los agentes gelificantes, pero no por carbón activado, pueden ser aliviados ajustando el pH después de su adición.	Beruto <i>et al.</i> (1999)
	carbón activado y carbón activado neutralizado Sigma	5 g L ⁻¹	Impurezas en los agentes gelificantes, altos niveles Ca, K, S y Cu. Contenido de humedad en el medio almacenado varió desde un 3% en Oxoid, hasta 18% en Bacto agar Difco. No se encontraron diferencias significativas entre el potencial hídrico de Oxoid, Merck y Roth baja disponibilidad de minerales Oxoid mayor disponibilidad de minerales	
	Oxoid, Merck y Roth			

Se han realizado trabajos probando la eficacia de otros agentes gelificantes que puedan sustituir al agar y que tengan un efecto similar o parecido en las plantas cultivadas *in vitro*. Agentes gelificantes como Gelrite o Phytigel que son polisacáridos, proporcionan claridad en los geles y bajo costo (Podwyszynska y Oleszewski, 1995), pero como se observa en las tablas anteriores, en algunos casos generan hiperhidratación severa y necrosis, por lo que aún se requiere realizar diversos estudios.

Se han utilizado algunos compuestos como alternativas de agentes gelificantes, entre ellos: almidón de maíz, microcristales de celulosa, almidones modificados, gum Katira y Guar gum (Tabla 5).

Tabla 5. Mezclas de agares con diversos compuestos como alternativa para solidificar el medio de cultivo

Tipo de cultivo y especie	Grupo control	Mezcla empleada	Resultados	Referencia
Cultivo de tabaco y zanahoria.	Bacto agar Difco (9 g L ⁻¹)	Mezcla de agar (4.5 g L ⁻¹) + almidón de maíz (35 g L ⁻¹), y almidón de maíz (80 y 90 g L ⁻¹)	Al incrementar los niveles de almidón, el peso seco del cultivo de tabaco se elevó, superando los 0.8 g callo ⁻¹ y con agar, el peso fue mayor de 0.2 g callo ⁻¹ .	Henderson y Kinnersley (1988)
Micropropagación de seis cultivares de manzana y dos cultivares de pera	Bacto agar Difco (7.5 g L ⁻¹).	Mezcla de almidón de maíz (7 g/L) y Gelrite (0.5 g/L)	La mezcla de almidón-Gelrite produjo 11.8 número de brotes por explante y en agar 10.5 brotes por explante, la mezcla produjo altos porcentajes de hiperhidratación en ambos cultivares de pera, pero al adicionar un agente encargado del control hídrico (polisacárido HCA), este problema se redujo significativamente.	Zimmerman <i>et al.</i> (1995)
Microesquejes de <i>Manihot esculenta</i>	Phytigel (2 g L ⁻¹)	Almidones modificados (100 g L ⁻¹) más Phytigel 2 g L ⁻¹	Los resultados no mostraron diferencias significativas con 4 brotes y 5 raíces por explante en ambos casos.	Romany <i>et al.</i> , 2006
<i>Nicotiana tabacum</i>	Agar (7 g L ⁻¹)	Microcristales de celulosa (200 g L ⁻¹) más agar 7 g L ⁻¹	Botes axilares de explantes nodales, plántulas cultivadas en medio con Microcristales de celulosa fueron más grandes y desarrollaron más nudos.	Gorinova <i>et al.</i> , 1993
<i>Syzygium cuminii</i> (brotes) <i>Albizia lebeck</i> (embriones somáticos)	Agar bacteriológico Glaxo (9 g L ⁻¹)	Gum Katira (30 g/L)	Regeneración de raíces androgénesis <i>in vitro</i>	Jain y Babbar, 2002
<i>Linum usitatissimum</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> <i>Crateya nurvata</i>	Agar bacteriológico Glaxo (9 g L ⁻¹)	Guar gum (20, 30 y 40 g L ⁻¹)	En proliferación de brotes axilares, respuestas rizogénicas y embriogénicas se obtuvieron mejores resultados en medio gelificado con Guar gum.	Babbar <i>et al.</i> , 2005

4. El potencial hídrico.

En 1960 Ralph, Slatyer y Sterling (Salisbury y Ross, 1992) propusieron el uso del potencial químico del agua como referencia para una propiedad importante en los sistemas planta-suelo-aire, definieron al potencial hídrico de cualquier sistema o parte de un sistema que contenga o pueda contener agua como equivalente al potencial químico del agua en este sistema o parte de él, comparado con el potencial químico del agua pura a la misma temperatura y presión atmosférica; sugirieron además asignar como valor de referencia al cero para el potencial hídrico del agua pura (Salisbury y Ross, 1992).

En fisiología vegetal, el término potencial hídrico, se refiere a la energía libre contenida o potencial químico de las moléculas del agua en el suelo, en las células o en la atmósfera (Devlin, 1980; Kramer, 1974 citado en Rosas, 2002), siendo usado el término de potencial hídrico como una medida del estatus de agua en la planta (Taiz y Zeiger, 2002). En las plantas el potencial hídrico está formado por varios componentes: potencial de soluto, potencial mátrico, potencial de presión y potencial gravitacional (Bewley y Black, 1985).

$$\Psi_H = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_g + \Psi_m$$

El potencial de soluto (Ψ_s) está determinado por la cantidad de partículas disueltas en el agua. El potencial de presión (Ψ_p) es el reflejo de las fuerzas físicas que se ejercen sobre el agua desde su ambiente; el potencial gravitacional (Ψ_g) sólo es sustancial cuando el agua es transportada sobre distancias verticales de más de 5 a 10 metros, por lo que el término puede ser omitido de la fórmula general de potencial hídrico. Por último, el potencial mátrico (Ψ_m) se da por la interacción de las superficies por el agua, sin embargo, como ésta última es pequeña y muy difícil de medir, el impacto del potencial mátrico en el potencial hídrico usualmente se ignora. Para las circunstancias en las cuales el potencial gravitatorio y el mátrico son significativas, la ecuación de potencial hídrico se simplifica frecuentemente a:

$$\Psi_H = \Psi_s + \Psi_p$$

Mientras menor sea el potencial hídrico en una célula o tejido vegetal, mayor será su habilidad de absorber agua. Inversamente, mientras mayor sea el potencial hídrico de una célula, menor será la capacidad del tejido o célula de suministrar agua a otro cuerpo más seco (Rosas, 2002).

Según Bewley y Black (1985), el potencial hídrico puede expresarse en términos de presión o energía y puede expresarse en diferentes unidades como: el Bar, medida frecuentemente utilizada (1 bar = 10^3 dinas·cm², 10^2 J·Kg⁻¹ ó 0.987 atm y -1MPa equivale a -10 Bar).

El efecto del estrés hídrico en la supervivencia de plantas suculentas puede estar determinado por la cantidad de agua almacenada en los tejidos desarrollados durante la primera etapa de crecimiento. Esta sobrevivencia es favorecida por la forma esferoidal, ya que reduce el área superficial por unidad de volumen y en consecuencia, la pérdida de agua. En temporadas de lluvias frecuentes y constantes, convenientes para el establecimiento, las plántulas crecen hasta una talla suficiente en la cual el agua almacenada no sea agotada por la transpiración cuticular durante la temporada de sequía (Jordan y Nobel, 1982 citado en Rosas, 2002).

Debergh *et al.* (1981) evaluaron el potencial hídrico en medio constituido por los macroelementos del medio MS y los microelementos del medio Nitsch's y Nitsch's solidificado con Bacto agar Difco en diferentes concentraciones (0.6, 0.8, 1.1 y 1.5%) para evitar el problema de la hiperhidratación. Observaron que con niveles bajos de agar (0.6%) el índice de hiperhidratación fue de 75-100%, mientras que usando niveles de 1.1, 1.5 y 2% se nulificó la hiperhidratación. Se mostraron diferencias entre el potencial hídrico de medio solidificado con diferentes concentraciones de agar, obteniendo valores desde -1.2 y -1.8 bar, disminuyendo el potencial hídrico al aumentar las concentraciones de agar.

Ghashghaie *et al.* (1991) realizaron una investigación acerca del efecto de la concentración del agar en el estatus de agua y crecimiento de plantas de rosa cultivadas *in vitro*. Utilizando medio de cultivo MS solidificado con agar Touzart y Matignon a diferentes concentraciones (0, 4, 5.5, 6, 7.5, 8, 9 y 15g L⁻¹). En los resultados obtenidos se observó que el potencial hídrico del medio se redujo linealmente al aumentar las concentraciones de agar, el cual fue de -0.5 MPa para medio líquido y -0.7 MPa para medio solidificado con 15g L⁻¹ y la fuerza del gel incrementó linealmente desde cero conforme las concentraciones de agar incrementaron desde 5 hasta 10g L⁻¹. En concentraciones bajas de agar, donde el potencial hídrico del medio gelificado fue alto, sólo se obtuvo pocos brotes útiles, siendo significativamente mayor el número de brotes útiles en un nivel de agar moderado (7.5g L⁻¹), lo cual según los autores puede ser explicado por la acción antagonista de las citocininas y el agua en la elongación de los brotes.

5. Pigmentos fotosintéticos.

En las hojas de las plantas se encuentran presentes cuatro pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b*, xantofilas y carotenos, los dos primeros son los que se encuentran en mayor cantidad y son responsables del color verde de las plantas, siendo la cantidad de clorofila *a* tres veces la de la clorofila *b* (Salisbury y Ross, 1994), las xantofilas son de color amarillo y los carotenos que son los que se encuentran en menor proporción, de color naranja (Rojas, 1959).

Los pigmentos clorofílicos son con toda seguridad los pigmentos biológicos más abundantes en la tierra y deben su color verde a su capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar, transmitiendo los demás colores cuya mezcla apreciamos en diversos tonos de verde. Bajo condiciones naturales la fotosíntesis está influenciada y a menudo limitada por diversos factores internos y externos: concentración de CO₂, concentración de O₂, temperatura, circulación del aire, estado hídrico, luz, exceso o carencia de nutrimentos, entre otros. La absorción, depende en

gran medida de la concentración de clorofila y de otros pigmentos accesorios (Salisbury y Ross, 1994).

Los carotenos son constituyentes integrales de la membrana de los tilacoides y están asociados usualmente con la antena y el centro de reacciones de proteínas de los pigmentos, la luz absorbida por los carotenos es transferida a la clorofila para la fotosíntesis y gracias a este rol son llamados pigmentos accesorios. Las bandas de absorción en los 400 a 500 nm es la región que da a los carotenos su color anaranjado (Taiz y Zeiger, 2002).

La clorofila *a* y *b* son solubles en alcohol, éter, acetona, cloroformo y benzol, aunque la clorofila *b* es menos soluble que la *a*. Junto con la clorofila, las plantas sintetizan xantofilas y carotenos. La función de estos pigmentos es muy discutida; se ha interpretado como citocromos, como pantallas de luz o bien como participantes activos en la fotosíntesis, junto con la clorofila (Rojas, 1959). Otro papel importante que presentan los carotenos, es el de proteger a las clorofilas contra la destrucción oxidativa por el oxígeno cuando los niveles de irradiación son elevados (Salisbury y Ross, 1992).

En plántulas cultivadas en condiciones *in vitro*, la clorofila *a* y *b* absorben muy poco de la luz verde y verde-amarilla de 500 y 600 nm y ambas absorben intensamente las longitudes de violeta, azul, anaranjado y rojo, mientras que el β -caroteno y la luteína sólo absorben longitudes de onda violeta y azul; reflejando y transmitiendo colores verde, amarillo, anaranjado y rojo que son percibidos por el ojo humano como color amarillo (Salisbury y Ross, 1992).

Reil y Berger (1997) valoraron la variación de clorofila y aceites esenciales en cultivos celulares fotomixotróficos de *Coleonema album*. Se evaluó el efecto del color de la luz, fotoperiodo, agente gelificante y fitoefectores en el crecimiento y acumulación de productos secundarios. Se utilizaron hojas y ramas de siete meses de edad para inducir la formación de callo, utilizando como agente gelificante agar Oxoid y Gelrite

Kelco. Se determinó la suma de clorofila *a* y *b* espectrofotométricamente en 652 nm en un extracto de acetona al 80% usando 5g de peso fresco. Los resultados indicaron que al utilizar 3 y 6g L⁻¹ de agar hubo un mayor índice de crecimiento, mientras que éste disminuyó con el uso de 9 y 12 g L⁻¹ del agente gelificante. Hubo un incremento en la acumulación de clorofila en células cultivadas en agar desde 90 hasta 120 mg Kg⁻¹ y en Gelrite, la acumulación aumentó desde 170 hasta 250 mg Kg⁻¹. Al utilizar 12g L⁻¹ de agar en el medio, los monoterpenos totales fueron de 5 mg Kg⁻¹ y en Gelrite de 73 mg L⁻¹

Premkumar *et al.* (2001) evaluaron los efectos de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización en el contenido de Rubisco, proteínas solubles en la hoja, pigmentos fotosintéticos y el contenido de carbono y nitrógeno en las hojas de plantas de aguacate, olivo, fresa y roble. Para medir la concentración de clorofila en las hojas se obtuvo el extracto con acetona al 80%. La concentración de clorofila por unidad de masa fue significativamente mayor en todas las plantas *in vitro* que en las que crecían en invernadero, en roble se presentaron los niveles más altos de clorofila *a* y *b* (3.5 y 1.1 mg L⁻¹), siendo la fresa la de niveles más bajos de clorofila *a* (1.3 mg L⁻¹) y *b* (0.6 mg L⁻¹), mientras que en el contenido de caroteno, el nivel más alto se presentó en aguacate (1.6 mg L⁻¹) y el más bajo se registró en fresa (0.7 mg L⁻¹)

6. Generalidades de las cactáceas

Las cactáceas son un grupo de plantas que comprende aproximadamente 2000 especies, procedentes de América y se distribuyen en lugares de climas desérticos o muy secos y en zonas subtropicales y tropicales húmedas encontrándose desde Canadá hasta la Patagonia (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Esta familia ocupa el quinto lugar en diversidad, alrededor de 55 géneros y 850 especies en México, en donde se encuentra el centro de diversificación más importante de cactáceas con un elevado índice de endemismos (Mandujano *et al.*, 2002).

Este grupo de plantas tiene ciertas semejanzas estructurales y bioquímicas con todas las familias que están en el orden Centrospermae o Coryophyllales, en especial con la familia Didieraceae, que es endémica de Madagascar, que presenta aréolas espinosas espiraladas, granos de polen del mismo patrón y flores unisexuales con betalaínas, por lo que es probable que ambas familias tuvieron un ancestro en común, cuando África y América eran un mismo continente y evolucionaron después independientemente, al quedar separados los continentes (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

Las cactáceas juegan un papel muy importante en los sistemas áridos y semiáridos de México, pero además representan un recurso natural de enorme importancia para satisfacer las necesidades de muchas personas. Muchos de sus frutos y tallos (cladodios) son alimentos principales en la dieta de los mexicanos. Estas plantas también se usan como forraje, ornamento y fuente de obtención de sustancias químicas de interés médico y farmacológico (CITES, 2001).

En los últimos tiempos las cactáceas se han visto amenazadas principalmente debido al gran valor ornamental que representan, ya que están sujetas a la colecta indiscriminada y también a la destrucción de su hábitat, es por ello que ha sido necesario implementar diferentes técnicas para facilitar su estudio y conservación, tales como el cultivo de tejidos vegetales. Gracias a estas técnicas, muchas especies de cactáceas han podido ser micropropagadas exitosamente y de esta manera conservadas, ya que se ha observado que en el caso particular de las cactáceas, las plántulas derivadas del cultivo *in vitro*, crecen con mayor rapidez y producen un número considerable de nuevos brotes (Malda *et al.*, 1999).

Se han realizado diversos trabajos de micropropagación con cactáceas, como con *Mammillaria elongata* (Johnson y Emimo, 1979), *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon, 1984), *Mammillaria carmenae*, *Mammillaria prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus spachianus* (Vyskot, 1984), *Leuchtenbergia principis* (Starling, 1985), *Mammillaria san-angelensis* (Martínez-Vazquez y Rubluo, 1989),

Ariocarpus retusus (Stuppy y Nagl, 1992 y Olguín, 1994), *Cereus peruvianus* (Machado y Prioli, 1996), *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1998), Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) realizaron la micropropagación de 21 especies de cactáceas mexicanas pertenecientes a los siguientes géneros: *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*. También se ha realizado el cultivo *in vitro* de *Carnegiea gigantea* (Baker y Marin, 1999), *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima* (Malda *et al.*, 1999), *Coryphanta elephantidens* (Singh, 1999), *Astrophytum myriostigma* (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 1999), *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis thurberi* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002). *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002), *Turbinicarpus laui* (Sántos-Díaz *et al.*, 2003), *Myrtillocactus geometrizans* (Gómez *et al.*, 2006) *Echinocactus grusonii* (Rodríguez, 2006), *Mammillaria schiedeana* (Soria, 2006), *Cephalocereus senilis* (Tapia, 2006), *Mammillaria coahuilensis* (Flores, 2007), *Astrophytum ornatum* (Mendoza, 2007).

7. *Echinocactus platyacanthus*

El género *Echinocactus* se distribuye exclusivamente en la región denominada Megamexico (Rzedowski, 1991, citado en Eguiarte, 1999) ya que las seis especies que contiene el género (*E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *E. polycephalus*, *E. parryi*, *E. horizonthalonius* y *E. texensis*) se encuentran en México, localizando algunas al suroeste de EUA. *Echinocactus platyacanthus* fue descrita por primera vez por Link y Otto en 1827 (Jiménez, 2002).

Echinocactus platyacanthus (Anexo I) conocida comúnmente como "biznaga dulce", debido a que su tallo es empleado para la elaboración del dulce de acitrón, siendo este el principal uso que se le da a los tallos de esta planta, tiene una importancia especial en zonas semiáridas, ya que se utiliza como alimento para animales y para el humano, al igual que tiene gran valor ornamental. Los frutos maduros sirven como alimento para el ganado caprino, mientras que las semillas son consumidas por la

gente de la región. También se sabe que toda la lana que se encuentra en el ápice de la planta se utilizaba anteriormente como relleno para cojines (Eguiarte, 1999). De igual forma es conocida como biznaga gigante, esto es debido a que puede alcanzar un tamaño de hasta 2m de altura y de 40 a 80cm de diámetro. Una característica de esta especie es que en su ápice que es hundido se presenta una gran cantidad de tricomas y en conjunto se ven como lana amarillenta en forma circular o elíptica. Sus costillas son gruesas y su número aumenta con la edad llegando a ser hasta 60 el número en las plantas adultas. Las flores que presenta son de color amarillo intenso y diurnas (Eguiarte, 1999; Hernández, 2007).

Se reconocen tres formas geográficas distintas de *Echinocactus platyacanthus*, las cuales se encuentran separadas por el Eje Volcánico en dos zonas geográficas: una es la de Tehuacán, Puebla, donde crecen los ejemplares denominados por Rose *Echinocactus grandis*, y la otra es en el desierto Chihuahuense, en donde crecen la forma *platyacanthus*, distribuida en los valles intermontanos y barrancas profundas de los estados de Hidalgo y Querétaro, y la forma *visnaga*, distribuida en el altiplano en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León y SW de Tamaulipas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Guzmán *et al.* (2003) menciona que *E. platyacanthus* se encuentra también en Oaxaca.

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) tiene considerada a *Echinocactus platyacanthus* dentro del Apéndice II y la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) la clasifica como especie sujeta a protección especial, es decir, que es una especie sujeta a limitaciones en su aprovechamiento por tener poblaciones reducidas o una distribución geográfica restringida (SEMARNAT, 2002).

8. Germinación *in vitro* y *ex vitro* del género *Echinocactus*

En el género *Echinocactus* se han desarrollado metodologías para su germinación *in vitro* para la obtención de plántulas (Tabla 6).

Tabla 6. Trabajos de germinación con miembros del genero *Echinocactus*

Especie	Medio de cultivo	Mejor tratamiento	Resultados	Referencia
<i>Echinocactus grandis</i>	MS	5 y 10 minutos en H ₂ SO ₄ + 24 horas en KNO ₃	100% de germinación	Nava-Esparza y Chávez-Ávila, 1982
<i>E. platyacanthus</i>	MS 100 y 50% agua-agar, 10 g L ⁻¹ agar bacteriológico	escarificación con ácidos fuertes durante 1 hora	<i>ex vitro</i> 90% de germinación	Rosas, 2002
		agua-agar	<i>in vitro</i> 84% de germinación.	
<i>E. grusonii</i>	MS 100 y 50% 8 g L ⁻¹ de agar bacteriológico Agua-agar	MS 50% Agua-agar	94% 95% de germinación	Rodríguez, 2006
		MS 100%	74% de germinación	

En los trabajos anteriormente señalados se ha empleado medio de cultivo MS al 100 y 50% de sus componentes así como agua con agar ambos gelificados con agar bacteriológico (Bioxon). Los resultados muestran que hay una mejor germinación en agua con agar, seguido de MS 50% y finalmente MS 100%, debido a la disponibilidad de agua en el medio de cultivo, ya que al haber más sales minerales el movimiento del agua es menor y la toma de esta por la semilla es más lenta.

La diferencia en el potencial hídrico de la semilla y el suelo es uno de los factores que determina la viabilidad y tasa de flujo de agua a la semilla, inicialmente la diferencia en potencial entre la semilla seca y el suelo húmedo es muy grande debido al alto potencial mátrico del saco seminal, pared celular y componentes de almacenamiento del primero. Pero como el contenido de humedad de la semilla incrementa durante la imbibición y las matrices son hidratadas, el potencial hídrico de la semilla incrementa y el del sustrato cercano disminuye (Bewley y Black, 1985).

III. JUSTIFICACIÓN.

El agente gelificante es un componente importante dentro del cultivo de tejidos vegetales y de los más caros. No son inertes fisiológicamente, causando variaciones nutricionales en el medio de cultivo que se ven reflejadas en alteraciones fisiológicas y morfológicas en los cultivos.

Debido a lo anterior, es muy importante realizar estudios fisiológicos que permitan evaluar los efectos que se manifiestan en las plántulas germinadas *in vitro* de *Echinocactus platyacanthus* para ayudar a optimizar el uso de este compuesto y obtener plantas con las menores alteraciones.

.

IV. OBJETIVOS

1. General.

Analizar los efectos fisiológicos en plántulas de *Echinocactus platyacanthus* germinadas *in vitro* en medio MS 50% solidificado con diferentes agentes gelificantes.

2. Particulares.

- Determinar el potencial hídrico del medio de cultivo solidificado con cuatro agentes gelificantes.
- Realizar la extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* germinadas en medio de cultivo MS 50% solidificado con cuatro diferentes agentes gelificantes.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Elaboración de medio de cultivo con cuatro agentes gelificantes.

Se elaboró medio de cultivo MS al 50% (Anexo II) de todos sus componentes incluyendo la sacarosa, se ajustó el pH a 5.7-5.8 y posteriormente se adicionó el agente gelificante en las siguientes proporciones: Gelrite Gellan Gum (Sigma) 3g L⁻¹, Agar Agar (Sigma) 6g L⁻¹, Difco agar (Bacto) 8g L⁻¹ y agar bacteriológico (Bioxon) 8g L⁻¹. El medio de cultivo se vertió en frascos de Gerber (30 ml en cada uno), para posteriormente ser esterilizado en autoclave a 1.5Kg cm².

2. Medición del potencial hídrico.

Una vez solidificado el medio con los diferentes agentes gelificantes, con ayuda de una espátula, se colocó una muestra de cada medio en charolas de plástico de forma circular de la cámara psicométrica (WP4 Dewpoint PotentiaMeter, Decagon Devices Inc.), de 40mm de diámetro por 12mm de profundidad. Después la charola se introdujo en la cámara y se efectuaron las mediciones del potencial hídrico.

Se tomaron ocho frascos de cada medio MS 50% gelificado con las tres marcas de agar y Gelrite, de cada frasco se obtuvieron seis muestras (Figura 1), para dar un total de 48 mediciones para cada tipo de medio, en la medición de cada seis muestras pertenecientes a un frasco, se eliminó la cifra mayor y la menor, por lo que en total quedaron 32 cifras, de las cuales se obtuvo un promedio y se realizó una gráfica comparativa.

De la misma manera se midió el potencial hídrico de medio de cultivo MS 50% sembrado con las semillas e incubado durante tres meses. Al concluir el tiempo correspondiente las plántulas fueron retiradas para evaluar los pigmentos fotosintéticos y se midió el potencial hídrico del medio de cultivo.

3. Cultivo *in vitro*.

Se utilizaron semillas de *Echinocactus platyacanthus* colectadas en la localidad de Buena Vista, en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo para realizar los ensayos de germinación y obtener plántulas para las evaluaciones morfológicas y fisiológicas.

Para su establecimiento *in vitro* las semillas se escarificaron y desinfectaron de la siguiente manera: primero se llevó a cabo la escarificación de las semillas en H₂SO₄ concentrado durante 15 segundos, seguido las semillas se colocaron en 50 ml de agua destilada adicionada con tres gotas de detergente líquido comercial Dawn durante 15 minutos, después se transfirieron a 50 ml de agua destilada, con tres gotas de Microdyn durante 15 minutos, posteriormente se trasladaron a 50 ml de alcohol al 70% durante 2 minutos para luego pasarlos a una solución de cloro comercial (6% de cloro activo) al 30% (v/v) durante 30 minutos. Todo el proceso de desinfección se llevó a cabo en constante agitación. Finalmente, se llevaron a cabo tres enjuagues con agua destilada esterilizada dentro de la campana de flujo laminar, cada enjuague duró aproximadamente un minuto.

Se sembraron tres lotes de 30 semillas en cada marca de agar y Gelrite utilizando medio de cultivo Murashige y Skoog al 50% de sus componentes, colocando cinco semillas en cada frasco (Figura 1), al haber finalizado la siembra se etiquetaron los frascos y fueron sellados con Egapack.

La incubación de las semillas se llevó a cabo en condiciones controladas, con un fotoperiodo de 8 horas oscuridad, 16 luz; temperatura de 26°C +/- 1°C e intensidad luminosa de 28.24 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

El registro de la germinación se realizó diariamente, hasta que germinó la totalidad de las semillas.

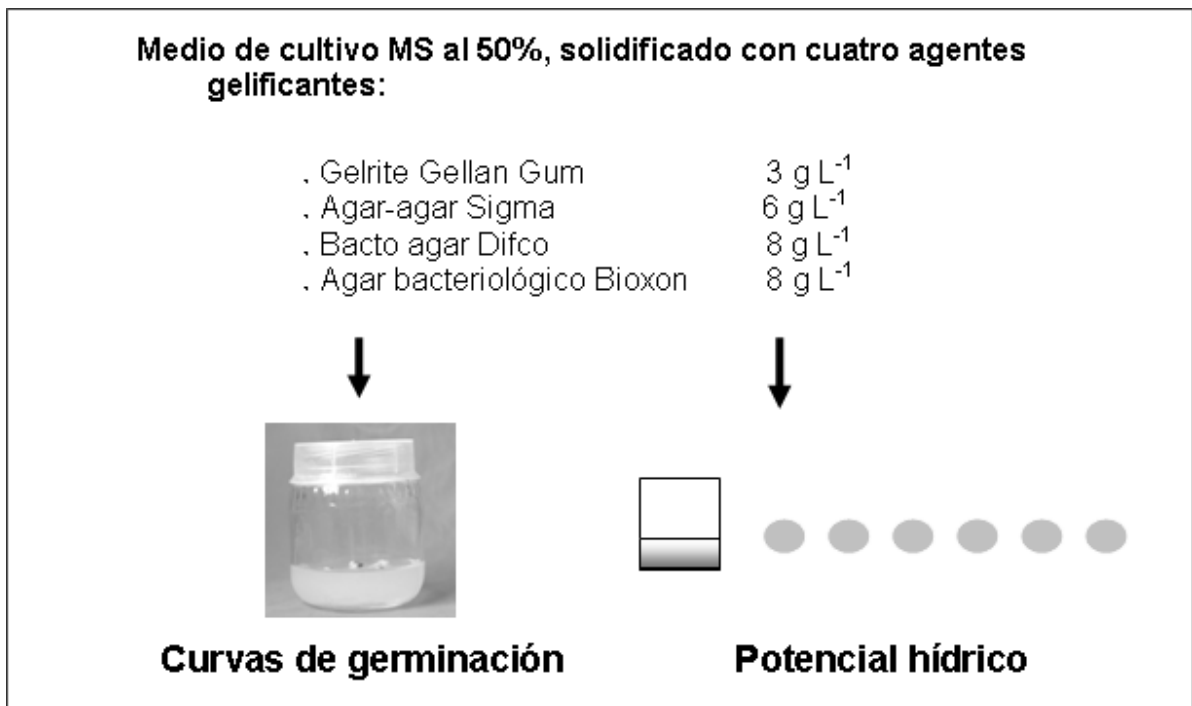


Figura 1. Se muestra un esquema general del método que se siguió para la obtención de los resultados de germinación y medición de potencial hídrico.

4. Cultivo *ex vitro* para grupo control.

Para la siembra de semillas de *Echinocactus platyacanthus ex vitro* como grupo control, se utilizó una mezcla de tierra negra-tezontle en proporción 1:1, la cual fue esterilizada en una autoclave durante a 1.5Kg cm² 25 minutos.

Para su siembra en suelo, se remojaron 50 semillas durante 24 horas en agua destilada a 50°C, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se sembraron en la mezcla mencionada. La incubación de las semillas se llevó a cabo de igual forma que las semillas sembradas *in vitro*, realizando un riego una vez por semana.

5. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Se utilizaron plántulas de tres meses de edad procedentes de los medios solidificados con los diferentes agentes gelificantes, de cada muestra se pesó 1 gr, se maceró el tejido por separado en un mortero (previamente enfriado en un congelador), adicionando pequeños volúmenes de acetona al 80% durante el proceso, no excediendo los 10 mL, lo que se obtuvo de la trituración se colocó en un vial cubierto con papel aluminio para evitar la degradación de la clorofila por la acción de la luz, para después vaciar en tubos Eppendorff y centrifugar a 2000 rpm durante seis minutos. Después de este proceso, se extrajo el sobrenadante y se midió la absorbancia a 663 nm, 645 nm y 440 nm. Se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia utilizando acetona al 80% como blanco (Figura 2). Se realizaron 30 lecturas para cada muestra procedente de los agentes gelificantes así como de el grupo control.

Para calcular el contenido de pigmentos tomando en cuenta el peso fresco se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Machinney en 1941 (Rodés-García y Collazo-Ortega, 2006), modificada de acuerdo al volumen final del extracto de pigmentos:

$$\% \text{ de pigmentos} = C (\text{peso de la muestra/volumen del extracto (9 mL)})/\text{Peso}$$

donde C es la concentración de pigmentos en mg L^{-1} obtenida a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Ca (mg L}^{-1}\text{)} &= (12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})) \\ \text{Cb (mg L}^{-1}\text{)} &= (22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})) \\ \text{C a+b (mg L}^{-1}\text{)} &= (20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})) \\ \text{Cc (mg L}^{-1}\text{)} &= (4.695 (A_{440}) - 0.268 (\text{C a+b})) \end{aligned}$$

donde C_a = Concentración de clorofila *a*; C_b = Concentración de clorofila *b*; C_{a+b} = Concentración total de clorofila; C_c = Concentración de carotenos.

Los datos de potencial hídrico y cuantificación de pigmentos fotosintéticos fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS versión 10.0.

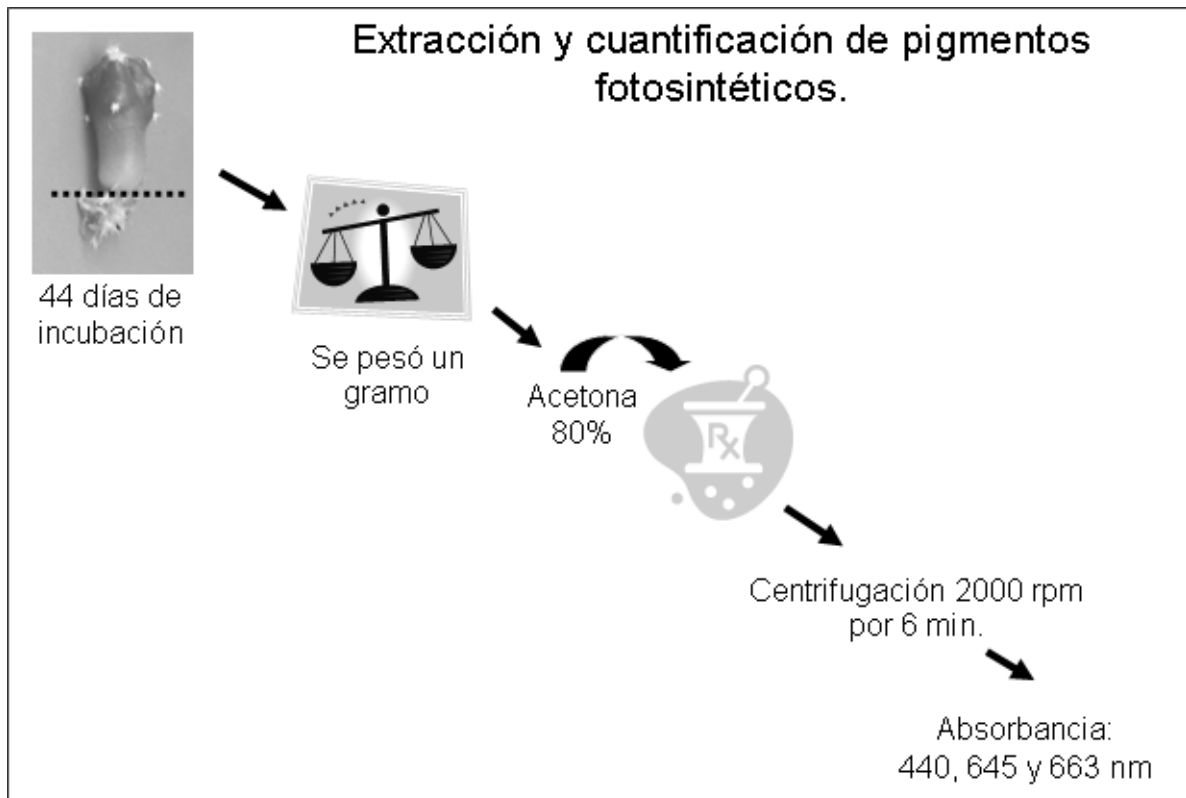


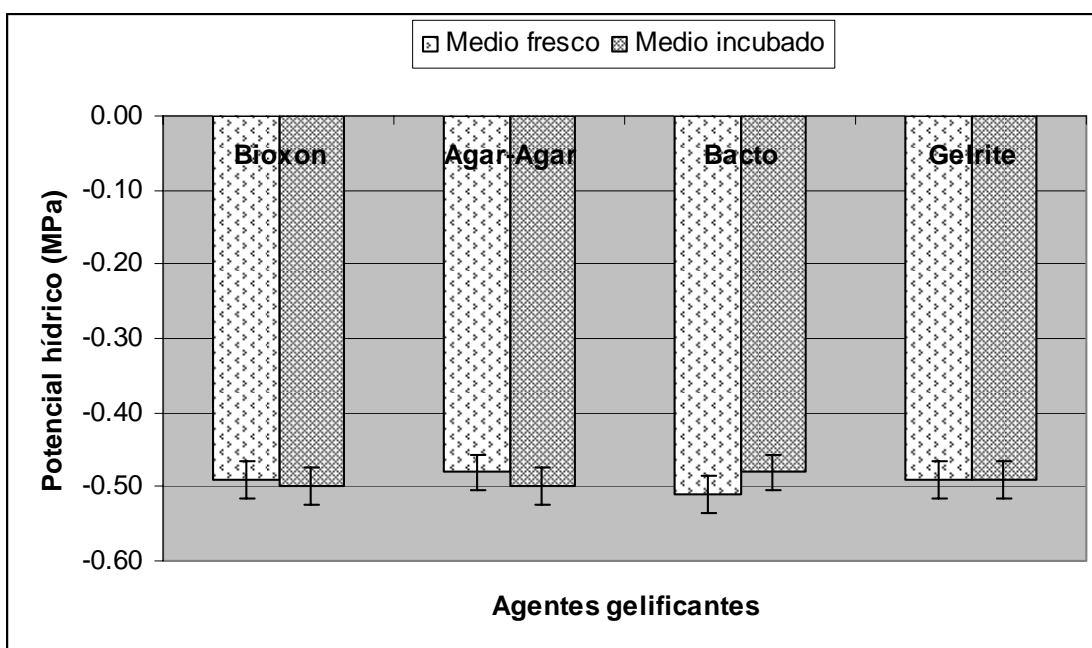
Figura 2. Representación del método seguido para la extracción de pigmentos fotosintéticos

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Medición del potencial hídrico.

De acuerdo a las mediciones tomadas en la cámara psicométrica, Agar-agar tiene mayor potencial hídrico con -0.48 MPa, seguido de Gelrite y agar Bioxon con -0.49 MPa en ambos casos y el potencial hídrico más bajo lo presentó Bacto agar Difco con -0.51 MPa; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F= 0.544$; $P< 0.05$).

Los resultados obtenidos del potencial hídrico en medio de cultivo con tres meses de incubación, mostraron en Gelrite y Bacto agar Difco un potencial hídrico de -0.48 MPa; mientras que para el caso de agar Bioxon y Agar-agar el potencial hídrico fue de -0.50 MPa (Gráfica 1), en este caso tampoco fueron encontradas diferencias significativas ($F= 0.361$, $P< 0.05$).



Gráfica 1. Potencial hídrico de los cuatro agentes gelificantes utilizados para gelificar el medio de cultivo al 50%, fresco e incubado por tres meses.

El potencial hídrico en el medio de cultivo gelificado con los cuatro agentes gelificantes se modificó a lo largo de los tres meses de incubación Agar-agar y Bioxon disminuyeron de -0.48 a -0.50 MPa y de -0.49 a -0.50 MPa respectivamente, con Bacto agar Difco se observó un aumento en el potencial hídrico de -0.51 a -0.48 MPa y solamente en el medio solidificado con Gelrite el potencial hídrico se mantuvo sin cambios (-0.49 MPa). La diferencia en el potencial inicial y final significa que hay menos agua en el medio, los solutos se concentran en éste y el movimiento de nutrimentos es más lento. Aunque los cambios en el potencial hídrico del medio de cultivo incubado durante tres meses no fueron muy grandes, no se puede suponer que de éste sea la principal causa de las diferencias morfológicas y fisiológicas que existen entre las plántulas.

Debergh *et al.* (1981) encontraron que el potencial hídrico en medio de cultivo Murashige y Skoog cambió de acuerdo a la concentración adicionada de Bacto agar Difco y a la fuente de carbono, aumentando éste conforme se aumentó la concentración de agar, al usar 11 y 15 g L⁻¹ del agente gelificante se obtuvo un potencial hídrico de -1.21 bar, mientras que al adicionar agar (6g L⁻¹) en combinación de 29 mM manosa como fuente de carbono se obtuvo un potencial hídrico de -1.81 bar y el menor fue de -2.9 bar al usar 58mM de sacarosa, concluyendo que el agar es responsable del componente mátrico del potencial hídrico del medio de cultivo.

Ghashghaie *et al.* (1991) encontraron que en medio de cultivo MS líquido, el potencial hídrico fue de -0.5 MPa, mientras que para medio solidificado con 15g L⁻¹ de agar, fue de -0.7 MPa, observándose un incremento.

Puede ser entonces que aunque las diferencias en el potencial hídrico de medio de cultivo gelificado con cuatro agentes gelificantes diferentes no sean muy grandes, esto influya en la germinación de semillas y en el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* observados en este trabajo.

Rosas (2002) determinó que para proporcionar un estrés osmótico a plántulas de *E. platyacanthus* y *Polaskia chichipe*, en medio de cultivo MS al 50% de sus componentes, gelificado con 10g L⁻¹ de agar bacteriológico Bioxon, éste debía ser de -1.5 MPa, de tal manera que al hacer una comparación con el potencial hídrico obtenido en este trabajo, se puede decir que las condiciones hídricas presentes en las plántulas de *Echinocactus platyacanthus* pueden ser buenas, e incluso un poco elevadas, provocando fenómenos como la hiperhidratación que se presentó en plántulas cultivadas en medio solidificado con Gelrite.

Al analizar la curva de germinación de *Echinocactus platyacanthus* en medio de cultivo MS al 50% de sus componentes, las semillas que germinaron en su totalidad fueron las de medio solidificado con Gelrite, que es el que presenta un alto potencial hídrico (-0.48 MPa), aunque no es el mayor, ya que Agar-agar muestra un potencial hídrico de -0.50 MPa, germinando 99% de las semillas y a pesar de que Bioxon mostró el mismo potencial hídrico que Gelrite, su porcentaje de germinación fue únicamente de 86%, pero hay que tomar en cuenta que también la fuerza del gel puede influir en la liberación de agua al medio de cultivo y ello puede verse reflejado en la germinación de las semillas y la morfología de las plántulas, ya que ésta limita la movilidad de los solutos en el medio, lo que provoca que las plántulas no asimilen bien ciertos nutrimentos y se ve reflejado en su morfología. Nairn *et al.* (1995) concluyeron que la fuerza del gel por sí sola no fue un factor influyente en el crecimiento o hiperhidratación de *Pinus radiata*, ya que al usar Gelrite en lugar de agar en niveles que mantuvieran la misma fuerza del gel, hubo un marcado incremento en la elongación e hiperhidratación.

Diferentes marcas o concentraciones de agentes gelificantes afectan de diferentes formas la conductividad y el contenido de sales contaminantes, pero no se ha encontrado una correlación con el crecimiento. Se ha mostrado que las concentraciones de agar modifican drásticamente la asimilación de iones presentes en el medio y de citocininas, puede suponerse que la disponibilidad de estos dos elementos en el medio de cultivo no es independiente de la disponibilidad del agua.

Se asume que las relaciones hídricas y el crecimiento de las plantas *in vitro* están muy relacionadas al estatus de agua del medio de cultivo. Sólo unos pocos trabajos se han realizado acerca del estatus de agua en plantas cultivadas *in vitro*. La disponibilidad de agua en el gel, como en suelo depende de su potencial hídrico y su conductividad hidráulica (Ghashghaie *et al.*, 1991).

Beruto *et al.* (1999a) concluyeron que se puede esperar una disponibilidad diferente de agua y nutrientes en geles formados por diferentes marcas de agar debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas y como una consecuencia el crecimiento de tejidos *in vitro* puede ser afectado. En el mismo año Beruto *et al.* (1999b) determinaron que al analizar la relación entre las propiedades del gel y la multiplicación de brotes de *Ranunculus*, la disponibilidad de sales del medio de cultivo y la liberación del líquido sobre presión parecen ser responsables para determinar el cambio biológico del material *in vitro*.

Si bien el potencial hídrico es un factor determinante en la liberación de nutrientes para las plántulas y el contenido de solutos tiene mucho que ver, tomando en cuenta que los agentes gelificantes tienen una cantidad variable de éstos. Se puede señalar que los agentes gelificantes asociados a sus propiedades fisicoquímicas también tienen una influencia importante en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de las plántulas de *Echinocactus platyacanthus*.

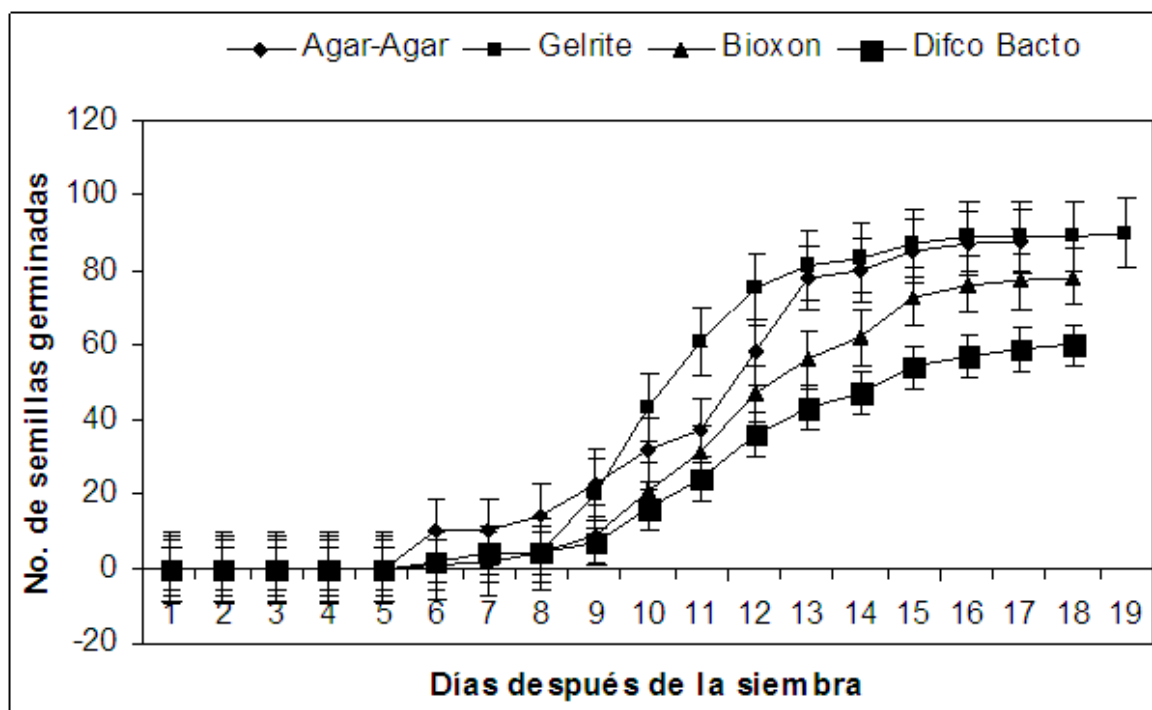
2. Cultivo *in vitro*.

Se obtuvo la curva de germinación para cada uno de los tres lotes de semillas sembrados en los respectivos agentes gelificantes, se realizó un promedio, mostrando diferencias en tiempos de germinación, tanto inicio como fin y número de semillas germinadas.

a. Germinación.

Las semillas de *Echinocactus platyacanthus* tienen una forma arriñonada, la testa presenta una ornamentación celular y el color es café oscuro brillante (Rosas, 2006).

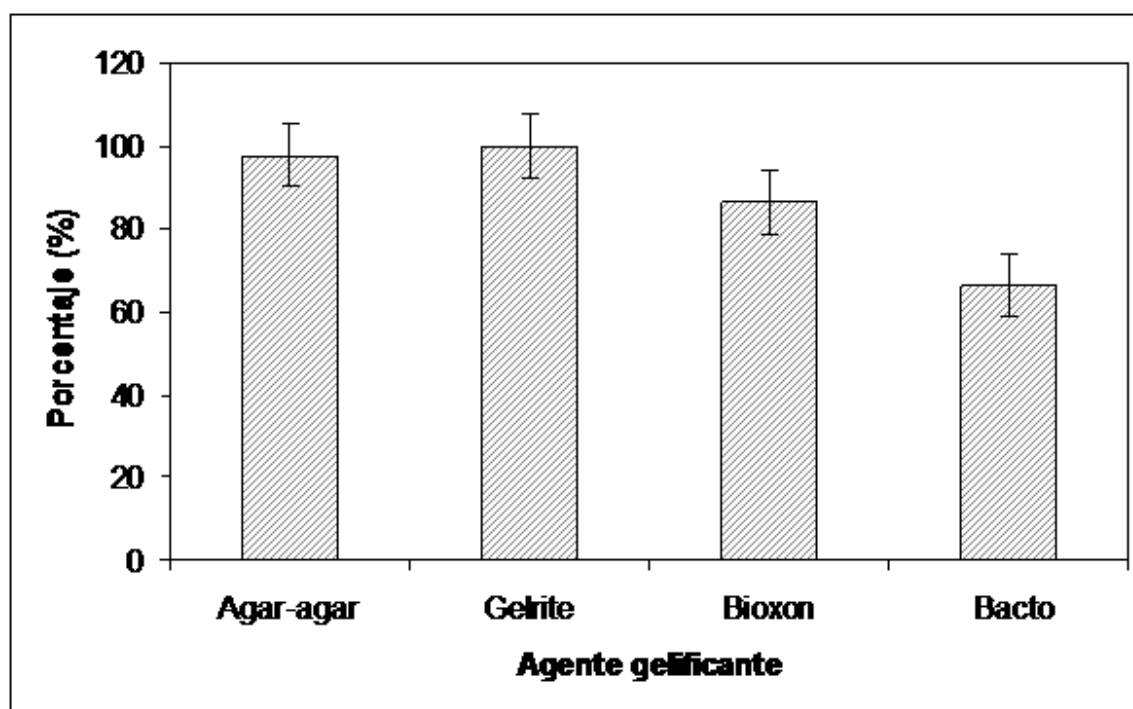
La germinación de las semillas de *E. platyacanthus* en los diferentes medios empleados inició al quinto día. Se observó que de las semillas sembradas en los diferentes medios germinó la totalidad de ellas entre los 16 y 18 días de incubación; en medio de cultivo con Gelrite tardaron 18 días en germinar (90 semillas), en medio con Agar-Agar 16 días (88 semillas), en medio gelificado con Bacto agar Difco y agar Bioxon, los tiempos para terminar de germinar fueron de 17 días con 60 y 78 semillas germinadas, respectivamente (Gráfica 2.). Obteniendo para Agar-agar (99%), Gelrite (97.7%), seguido de Bioxon con (86.6%) y Difco Bacto con (66.6%) (Gráfica 3).



Gráfica 2. Curvas promedio de germinación de semillas de *Echinocactus platyacanthus* en medio MS 50% gelificado con cuatro agentes gelificantes.

Se observaron diferencias significativas ($F=1.084$, $P<0.05$) entre el número de semillas germinadas en medio de cultivo solidificado con Bacto agar Difco y las

germinadas en los otros agentes gelificantes, entre los que no se encontraron diferencias significativas ($F=0.385$, $P<0.05$).



Gráfica 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Echinocactus platyacanthus* en medio MS50% gelificado con cuatro agentes gelificantes

Bewley y Black (1985), señalan que la germinación comienza con la asimilación de agua por parte de la semilla y termina cuando el embrión comienza a crecer, lo cual se hace evidente con la emergencia de la radícula y por ello, en el proceso de germinación de *Echinocactus platyacanthus* se consideró este criterio. Se observó que la semilla se hinchó y posteriormente se fracturó la testa en la zona lateral y dorsal, continuando hasta la zona apical de la semilla, parte por la cuál emerge la radícula y consecutivamente, la plántula inicia su crecimiento, primero aumentando su talla, después emergen sus primeras espinas en la parte apical entre los cotiledones y finalmente sus cotiledones son reabsorbidos y desaparecen. Según Bregman y Bougman (1983), la germinación de *Echinocactus palmeri*, que es una de las sinonimias de *Echinocactus platyacanthus* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991), se lleva a cabo al ser empujado el opérculo antes de la aparición del embrión, pero también menciona que la forma de germinación en el género *Echinocactus* puede ser

de ambas formas, como se menciona para *E. palmeri* y como se observó en este trabajo.

En el presente estudio el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en Gelrite y no en agar bacteriológico que es el que se ha usado otros trabajos, se propone como un buen agente gelificante en la elaboración de medio de cultivo MS al 50% de sus componentes para la germinación de semillas de *Echinocactus platyacanthus*, o en su defecto también se puede usar Agar-agar que obtuvo un alto porcentaje de germinación y puede funcionar en otras especies de cactáceas para optimizar las semillas que en muchas especies son escasas.

La tabla 7, muestra diferentes estudios relacionados con la propagación *in vitro* de cactáceas, donde se exponen los diferentes porcentajes de germinación que alcanzan las distintas especies al ser sembradas en medio MS con el 100 o 50% de sus sales, así como en agua-agar. Se puede observar que en algunos casos los más altos porcentajes de germinación se obtuvieron en agua-agar en *Echinocactus platyacanthus* y *Polaskia chichipe* con 84 y 90%, respectivamente en comparación con medio MS 50% con 80 y 84% (Rosas, 2002) al igual que con *Echinocactus grusonii* en donde se observó claramente que el agua-agar fue el más favorable con 95%, seguido de MS 50% (94%) y MS 100% (74%) (Rodríguez, 2006), eso se debe en gran medida a que el medio de agua-agar no presenta solutos disueltos, lo que hace que el potencial hídrico sea mayor y por lo tanto las semillas tengan mayor disponibilidad de agua, pero no proporciona los nutrientes suficientes necesarios para el óptimo crecimiento de las plántulas.

Ésta condición no es para todos los casos ya que se ha reportado que el agua-agar no siempre genera altos porcentajes de germinación y que la semilla requiere de disponer de nutrimentos para completar su proceso, como se observa en *Cephalocereus senilis* en donde el agua-agar arrojó porcentajes de germinación muy bajos (6%) y el mayor porcentaje (98%) se obtuvo con MS 100% (Tapia, 2006).

Tabla 7. Comparación de la germinación de diferentes especies de cactáceas *in vitro*

Especie	Agente gelificante	Medio de cultivo	Porcentaje de germinación	Referencia
<i>Echinocactus grandis</i>	No se menciona	MS	20 semillas	Nava-Esparza y Chávez-Ávila, 1982.
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Agar	MS	53	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989
<i>Mammillaria candida</i>	Phytigel 3.5 g L ⁻¹	MS 100% MS 50% SH Papel filtro	93 95 86 80	Elías-Rocha <i>et al.</i> , 1998
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Agar bacteriológico 10 g L ⁻¹	MS 100% MS 50% Agua-agar	No se menciona 80 84	Rosas, 2002
<i>Polaska chichipe</i>		MS 100% MS 50% Agua-agar	No se menciona 84 90	
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Phytigel 2 g L ⁻¹	MS + 15 g L ⁻¹ de sacarosa y 7.5 mg L ⁻¹ de GA ₃	87 igual que en suelo	Gómez-Juárez, 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	Agar bacteriológico Bioxon 8 g L ⁻¹	MS 100% MS 50% Agua-Agar	74 94 95	Rodríguez, 2006
<i>Mammillaria schiedeana</i>	Agar bacteriológico Bioxon 8 g L ⁻¹	MS 50% más carbón activado (1 g L ⁻¹)	32, 71, 76	Soria, 2006
<i>Cephalocereus senilis</i>	Agar bacteriológico 8 g L ⁻¹	MS 100% MS 50% Agua-agar	98 22 6	Tapia, 2006
<i>Astrophytum ornatum</i>	Agar bacteriológico Bioxon 8 g L ⁻¹	MS 100%	77.7	Mendoza, 2007
		MS 50%	82.2	
		Agua-Agar	75.5	

b. Características morfológicas de las plántulas sembradas en los diferentes agentes gelificantes

Se observaron diferencias morfológicas en las plántulas desarrolladas en los diferentes tratamientos (Figura 3), siendo más considerables las diferencias de las plántulas cultivadas en medio de cultivo gelificado con Gelrite.

Se notaron diferencias en el desarrollo y proporción del hipocótilo y epicótilo, color de las espinas, tamaño total de las plántulas, considerando el ancho y el largo, posición de las aréolas y tamaño de las raíces.

En las plántulas cultivadas en Bacto agar Difco y en Bioxon el tamaño del epicótilo ocupa las tres cuartas partes de la plántula, en el hipocótilo las aréolas están separadas entre sí y se presentan en la región lateral y apical con pequeños tricomas. Mientras que en aquellas germinadas en Agar-agar, el epicótilo es el que más se desarrolló y ocupa casi la totalidad de la plántula; las aréolas están presentes en la parte apical con presencia de tricomas.

Con Gelrite el epicótilo ocupa la mitad de la plántula y en él las aréolas están presentes tanto en la parte apical como en la lateral del epicótilo, en las que hay presencia abundante de tricomas e incluso ya comienzan a formarse las costillas.

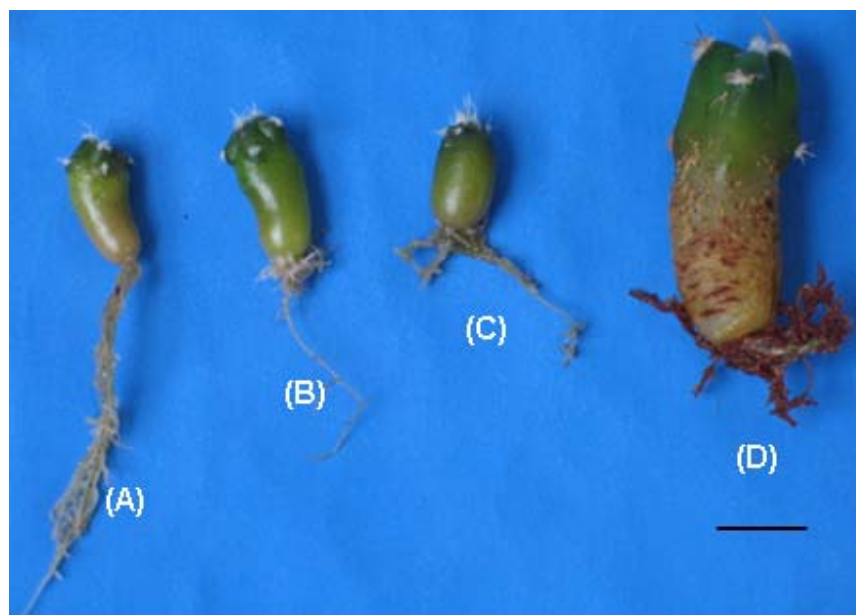


Figura 3. Aspecto de las plántulas de *Echinocactus platyacanthus* creciendo en medio MS50% adicionado con los agentes gelificantes. Plántulas germinadas en agar Bioxon (A), Bacto agar Difco (B), Agar-agar (C) y Gelrite (D) a los tres meses de edad. Barra= 1 cm

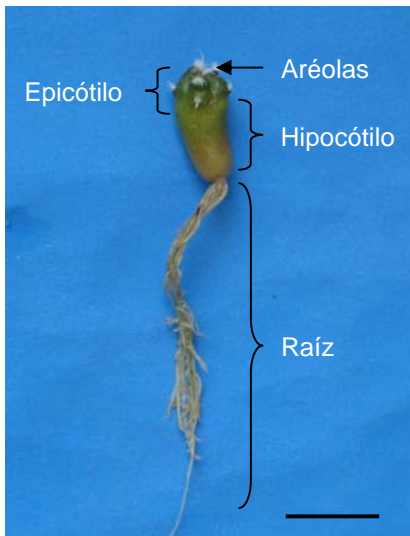


Fig 4. Plántula de *E. platyacanthus* en MS50% con agar Bioxon.
Barra = 1 cm

En las plántulas germinadas en medio gelificado con agar Bioxon, se observa un mayor desarrollo del hipocótilo que el epicótilo, en el cual se presentan aréolas en la región apical y lateral, con espinas y algunos tricomas, la raíz principal con un buen desarrollo midiendo en promedio 32.39 mm. La altura promedio de las plántulas fue de 8.21 mm y 4.52 mm de ancho (Figura 4).

Las plántulas de Agar-agar alcanzan una altura de 10.1mm y 5.03mm de ancho en promedio, puede observarse que tienen el hipocótilo redondo y en el epicótilo, las aréolas están ubicadas en el ápice, presentan espinas blancas con una gran cantidad de tricomas. No se desarrolló una raíz alargada y principal, sino varias raíces secundarias delgadas con una longitud promedio de 19.42mm (Figura 5).

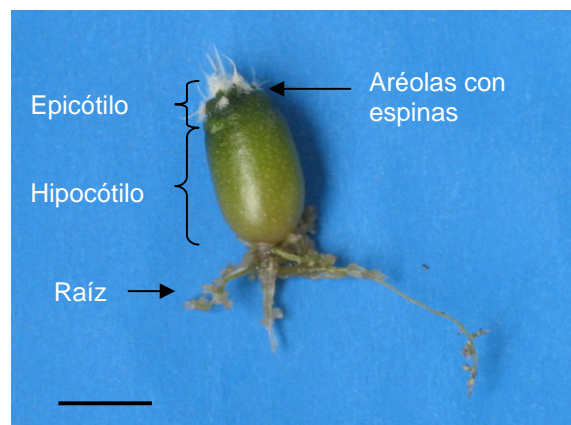


Fig. 5 Plántula de *E. platyacanthus* en MS50% con Agar-agar. Barra = 1 cm

Aquellas plántulas germinadas en medio de cultivo gelificado con Bacto agar Difco, alcanzaron una altura promedio de 9.55mm de largo y 5.16mm de ancho, se desarrolló más el epicótilo y las aréolas que se presentaron en la zona apical y lateral están más separadas entre sí con espinas blancas y pocos tricomas, no se desarrolla una raíz principal, sino que son varias cerca de la zona basal de la plántula, en promedio alcanzaron una longitud de 18.55 mm (Figura 6).

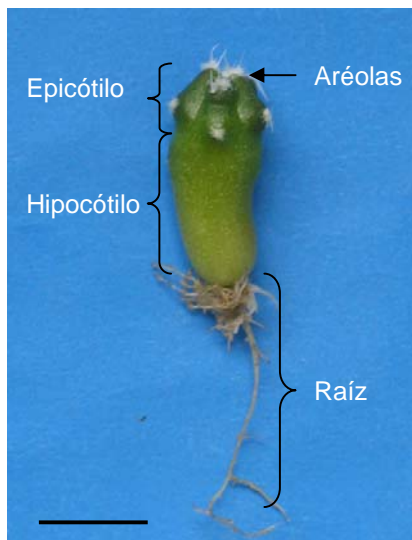


Fig. 6 Plántula de *E. platyacanthus* en MS50% con Bacto agar Difco. Barra = 1 cm

En las plántulas germinadas en medio de cultivo gelificado con Gelrite, se puede observar un hipocótilo muy alargado y más delgado que el epicótilo, en este último ya se puede ver la forma de tubérculos, que posteriormente serán las costillas que la planta adquiere a una mayor edad, el epicótilo al estar más alargado, tiene aréolas más separadas entre sí, ocupando las zonas apical y lateral del mismo, se ve el desarrollo de espinas. En promedio las plántulas presentan una altura de 13.77mm y 6.85 mm de ancho. Se presentó el desarrollo de numerosas raíces secundarias que en promedio dieron una longitud de 22.08mm (Figura 7).

Después de los dos meses de incubación, el medio solidificado con éste agente gelificante comienza a volverse líquido, las plántulas que se encuentran en éste, presentan síntomas de hiperhidratación y a tener lesiones en la parte que tiene contacto con el medio de cultivo. En todas las plántulas, el tejido se tornó translucido y en algunos casos se formó un tejido parecido a callo en el lugar de contacto con el medio de cultivo (Figura 8).

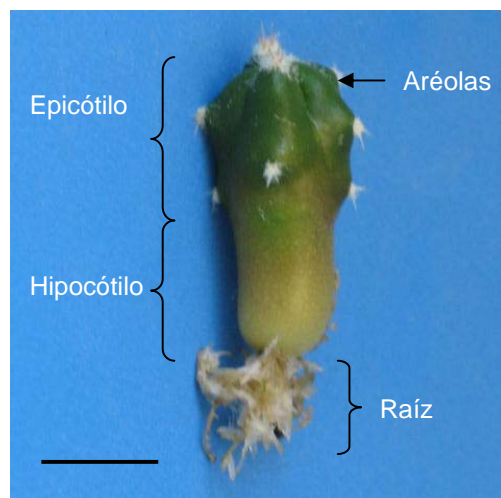


Fig. 7 Plántula de *E. platyacanthus* en MS50% con Gelrite. Barra = 1 cm

Se puede observar una diferencia en la talla alcanzada y en el desarrollo de las plántulas y raíces al ser expuestas en los diferentes tipos de agentes gelificantes (Tabla 8), en donde a pesar que en Gelrite alcanzan mayores tallas estas pueden no ser favorables por las anomalías morfológicas presentes como la hiperhidratación, que finalmente no servirán como fuente de explantes, en caso de requerirlo así. Se encontraron diferencias significativas en la altura de plántulas con

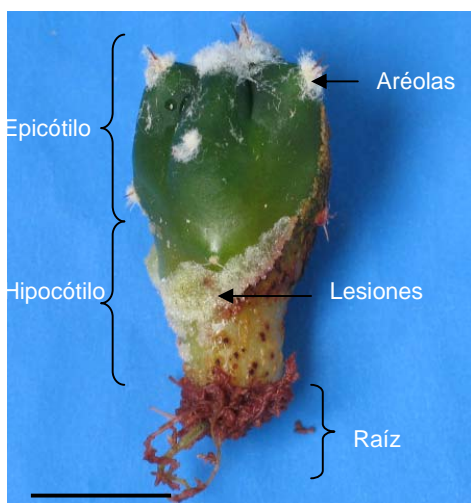


Fig. 8 Plántula de *E. platyacanthus* en MS50% con Gelrite después de dos meses de incubación. Barra = 1 cm

Gelrite ($F=5.24290$, $P<0.05$), así como en el ancho ($F=6.845$, $P<0.05$), mientras que en el tamaño de la raíz, las diferencias significativas se observaron en plántulas creciendo en medio solidificado con agar Bioxon ($F=38.92529$, $P< 0.05$).

Tabla 8. Tamaño promedio del largo de la raíz, altura y ancho de las plántulas de *Echinocactus platyacanthus* con tres meses de edad creciendo en medio MS 50%, solidificado con cuatro agentes gelificantes

	Gelrite	A-A	Bacto agar Difco	Bioxon
	(mm)			
Alto	13.77a	10.1b	9.55b	8.21b
Ancho	6.85a	5.03b	5.16b	4.52b
Raíz	22.08a	19.42a	18.55a	32.39b

Letras distintas indican diferencias significativas a nivel $P< 0.05$ según prueba de Tukey

En otros trabajos donde se evalúa el efecto de diferentes agentes gelificantes, al igual que en este trabajo, se observan diferencias en la morfología de las plántulas de acuerdo al agente gelificante utilizado, así como su concentración: Williams y Taji (1987) demostraron que al usar Gelrite hubo mayor sobrevivencia de plantas leñosas australianas después de 27 semanas de cultivo que al utilizar agar. Pasqualetto *et al.* (1988) encontraron que al utilizar Gelrite (1.5 g L^{-1}) como agente gelificante ocasionó hiperhidratación en dos cultivares de manzana, contrario a lo ocurrido cuando se usó Bacto agar Difco (7 g L^{-1}). Gulsen y Dumanoglu (1991) determinaron que el uso de Bacto agar Difco (5 g L^{-1}) fue el óptimo para obtener el mayor número de brotes por explante (14.5), al igual que el mayor grosor y largo de brotes de rosa (*Cydonia*

oblonga). Chacón *et al.* (2000) determinaron que el uso de agar disminuyó considerablemente la incidencia de síntomas de hiperhidratación, contrario a lo encontrado en Phytigel, aunque las plántulas hiperhidratadas de *Discorea alata* y *D. trifida* no mostraron menor tasa de sobrevivencia al trasplante a invernadero, sin embargo, no mencionan la marca de agar utilizada.

En éste trabajo, se observó que plántulas creciendo en medio solidificado con Gelrite presentaron raíces cortas y escasas, mientras que en otros trabajos, como es el caso de Tsay *et al.* (2006) observaron que brotes de *Scrophularia yoshimurae* produjeron mayor número de raíces, formando una red compacta, al utilizar Gelrite (3.25g L⁻¹) como agente gelificante.

La tabla 9, muestra una lista de agentes gelificantes que son usados para solidificar el medio de cultivo, se observa que difieren en procedencia, concentración usada, temperatura de gelificación y en algunos casos requieren de la presencia de ciertos cationes para que ocurra la solidificación.

Los datos observados en la tabla 9 permiten decir que de acuerdo con los precios que se presentan para los agentes gelificados utilizados en éste trabajo, Agar-agar es una buena opción hablando económicamente ya que es más barato que Bacto agar Difco y se utiliza una menor cantidad (6-12g L⁻¹) de agente gelificante y además muestra un alto porcentaje de germinación y un buen desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus*, en comparación de Gelrite que tiene prácticamente el mismo precio que Agar-agar y se usa en pocas cantidades (1.2-2.5g L⁻¹) también muestra un alto porcentaje de germinación, pero las plántulas creciendo en éste exhiben síntomas de hiperhidratación.

Tabla 9. Agentes gelificantes utilizados en el cultivo de tejidos vegetales.

Agente gelificante	Descripción y usos	Temperatura de gelificación (°C)	Concentración recomendada por el fabricante (g L ⁻¹)	Precio/500 g (Pesos mexicanos)
Agar	Trabajo microbiológico	32-39	6-12	1200.00
bacteriológico				
Bioxon				
Agar-Agar	Probado microbiológicamente y en cultivo de tejidos vegetales	32-35	6-12	1500.00
Agargel	Mezcla de agar y Phytigel, produce un gel semiclaro, desarrollado para controlar la vitrificación.	26-28	3.5-5.0	1284.00
Agarosa	Es un hidocoloide galactano aislado desde el agar. Produce geles de alta claridad	26-30	6-10	11928.00
Alginato	Usado como soporte de células inmovilizadas en suspensión, forma gel en presencia de ciertos cationes como calcio. Se extrae de algas pardas	37°C	17-40	420.00
Bacto agar	Las impurezas, pigmentos y sales han sido reducidos al mínimo, es optimizado por un contenido benéfico de magnesio y calcio.	35	8-15	1884.00
Difco				
Carrágeno	Polisacárido extraído de algunas especies de algas rojas.	No se encontró	6-10	1212.00

(Datos según el productor)

Continúa **Tabla 9.**

Agente gelificante	Descripción y usos	Temperatura de gelificación (°C)	Concentración recomendada por el fabricante (g L ⁻¹)	Precio/500 g (Pesos mexicanos)
Gelrite	Hidrocoloide que forma geles rígidos, quebradizos y transparentes en presencia de sales solubles. Polisacárido compuesto de ácido urónico, ramnosa y glucosa, producido por <i>Pseudomonas elodea</i> .	30-45	1.2-2.5	1476.00
Guar gum	Es Polisacárido hecho de azúcares de galactosa y manosa, es un espesante económico.	No definido	No definido	564.00
Phytigel	Produce gel de color claro, con alta fuerza del gel, requiere la presencia de cationes para gelificar	27-31	1.5-2.5	2027.00
Transferegel	Gel portador de Hydroxyethylcelulosa para la transferencia de embriones somáticos y de otros propágulos en etapas <i>in vitro</i> a suelo. También usado en pruebas pregerminativas	No definido	15-20	623.30

(Datos según el productor)

3. Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

La tabla 10 muestra el contenido de pigmentos fotosintéticos (mg L⁻¹) encontrados en plántulas sembradas en medio de cultivo MS 50%, solidificado con cuatro agentes gelificantes, al igual que en el grupo testigo. La cuantificación de clorofila muestra que la clorofila *b* está presente en mayor proporción que la clorofila *a*. En plántulas sembradas en medio gelificado con Bacto agar Difco se obtuvo 7.37 mg L⁻¹ de

clorofila *a*, mientras que en las plántulas sembradas en medio de cultivo en Agar-agar (7.1 mg L⁻¹) y en agar Bioxon (6.62 mg L⁻¹). En las plántulas sembradas en medio gelificado con Gelrite y en suelo, la cantidad de clorofila *a* fue de 5.23 mg L⁻¹ y 6.81 mg L⁻¹, respectivamente. Mientras que en el caso de los carotenos se registraron datos negativos, con excepción de los del testigo (0.29 mg L⁻¹). Se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* (F=5.17614, P< 0.05) en plántulas en medio de cultivo solidificado con Gelrite y las de suelo con 5.23 y 6.81 mg L⁻¹, respectivamente; al igual que en contenido de clorofila *b* (F= 24.36209, P< 0.05) con 7.94 y 9.78 mg L⁻¹ y el contenido total de clorofila con 13.19 y 16.59 mg L⁻¹ (F=27.31585, P< 0.05), así como en el contenido de carotenos (-1.03 y 0.29 mg L⁻¹) (F= 30.24281, P< 0.05).

Tabla 10. Contenido de pigmentos fotosintéticos de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* sembradas en medio MS 50% solidificado con cuatro agentes gelificantes.

	Bioxon	A-A	Bacto	Gelrite	Tierra
	mg L ⁻¹				
Ca	6.62a	7.1a	7.37a	5.23b	6.81b
Cb	11.29a	11.8a	11.69a	7.94b	9.78b
C a+b	17.76a	18.8a	18.77a	13.19b	16.59b
Cc	-1.71a	-1.85a	-2.3a	-1.03b	0.29c

Letras distintas indican diferencias significativas a nivel P< 0.05 según prueba de Tukey.

Como se puede ver en la tabla 11, el porcentaje de pigmentos es similar en plántulas sembradas en medio de cultivo solidificado con Agar-agar, agar Bioxon y Bacto agar Difco, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos (F= 0.427, P< 0.05); los porcentajes más altos de clorofila *a*, *b* y total en plántulas *in vitro* se registraron en aquellas sembradas en medio de cultivo solidificado con Bacto agar Difco (0.81, 1.29 y 2.06% respectivamente), seguido de Agar-agar (0.78, 1.3 y 2.07%) y Bioxon (0.73, 1.24 y 1.95%), es de notarse que el porcentaje de carotenos en plántulas *in vitro* se registró en valores negativos. El mayor porcentaje de carotenos en plántulas sembradas en estos tres agentes gelificantes fue observado en agar Bioxon, con -0.19%, seguido de Agar-agar (-0.2%) y Bacto (-0.25%).

Los porcentajes de clorofila *a*, *b* y total registrados en plántulas sembradas en Gelrite y las del grupo control (*ex vitro*) fueron similares entre ellos; el porcentaje total de clorofila fue de 1.45% en plántulas en Gelrite y de 1.5% en las del grupo control, mostrando diferencias significativas solamente en el porcentaje de carotenos, donde para gelrite fue de -0.11% y para las del grupo control fue de 0.03%. Hubieron diferencias significativamente menores en los porcentajes de clorofila *a* ($F=5.12076$, $P<0.05$), *b* ($F=7.28160$, $P<0.05$), total ($F=15.72902$, $P<0.05$) y carotenos ($F=30.24281$, $P<0.05$) en plántulas creciendo en Gelrite y las de suelo ($F=18.83533$, $P<0.05$).

El mayor porcentaje de clorofila total se encontró en plántulas sembradas *in vitro*, contrariamente al contenido de carotenos, donde se apreció que el porcentaje fue mayor en plántulas del grupo control. El porcentaje de clorofila *b* tanto en plántulas *in vitro* como en las sembradas *ex vitro* fue el mayor, seguido de clorofila *a* y carotenos: según Salisbury y Ross (1994), el contenido de clorofila *a* en condiciones naturales es tres veces mayor al de la clorofila *b*.

Tabla 11. Porcentaje de pigmentos fotosintéticos de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* sembradas en medio MS 50% solidificado con cuatro agentes gelificantes.

	Bioxon	A-A	Bacto	Gelrite	Tierra
	(%)				
Ca	0.73a	0.78a	0.81a	0.58b	0.61b
Cb	1.24a	1.3a	1.29a	0.87b	0.89b
C a+b	1.95a	2.07a	2.06a	1.45b	1.5b
Cc	-0.19a	-0.2a	-0.25a	-0.11b	0.03c

Letras distintas indican diferencias significativas a nivel $P<0.05$ según prueba de Tukey

Reil y Berger (1997) encontraron que la acumulación de clorofila se incrementó en células de *Coleonema album* creciendo en agar Oxoid desde 90 a 120 mg Kg⁻¹, mientras que al utilizar Gelrite, la acumulación fue de 175 a 250 mg Kg⁻¹, encontrando el mismo patrón de acumulación para monoterpenos. Lo que indica que hubo una mayor acumulación de clorofila al utilizar Gelrite como agente gelificante, contrario a lo encontrado en éste trabajo, donde se encontraron los mayores porcentajes de pigmentos al utilizar diferentes marcas de Agar.

Premkumar *et al.* (2001) obtuvieron concentraciones significativamente mayores de pigmentos fotosintéticos en plantas de fresa, roble, aguacate y olivo cultivados *in vitro* en medio de cultivo Murashige y Skoog solidificado con Agar-agar Sigma (7 g L^{-1}), siendo mayores las concentraciones de clorofila *a*, seguidas de los carotenos y la clorofila *b*, obteniendo hasta 3.5 mg L^{-1} en el contenido de clorofila *a* y 1.1 mg L^{-1} de clorofila *b* en roble y 0.8 mg L^{-1} de carotenos en roble y aguacate. Muchos estudios de micropropagación mostraron un aumento en los niveles de clorofila en hojas creciendo *in vitro*, lo cual puede ser explicado por la presencia de carbohidratos exógenos o citocininas exógenas también. Los autores concluyeron que en condiciones *in vitro* hay un decremento en el contenido de Rubisco en la mayoría de las especies analizadas, se ha confirmado que ésta disminución está relacionada con alteraciones en el nivel de nitrógeno o del nivel de compuestos fotosintéticos.

Martínez (2007) encontró que en plántulas de *Echinocactus grusonii* regeneradas *in vitro* con diferentes tratamientos hormonales (K y 2iP 1, 2 y 3 mg L^{-1} en ambos casos) y dos medios de cultivo (MS 100% y MS 50%), los mayores porcentajes de pigmentos se encontraron en plántulas *in vitro*, la clorofila *a* se presentó en mayor porcentaje que los otros pigmentos, en contraste con éste trabajo donde la clorofila *b* se presentó en mayor porcentaje. Al utilizar kinetina como hormona para la producción de brotes, el mayor porcentaje de clorofila total se registró en los brotes provenientes del tratamiento K 1 mg L^{-1} en MS 50% (2.861%) y en MS 100% (2.41%), la proporción de clorofilas fue diferente en cada caso, ya que, mientras en 2iP 1 mg L^{-1} en MS 50% el porcentaje de clorofila *a* (0.94%) fue menor que el de *b* (1.15%), en 2iP 1 mg L^{-1} MS 100%, el porcentaje de clorofila *a* (1.54%) fue significativamente mayor al porcentaje de *b* (0.47%).

Se ha propuesto a los carotenos como posibles precursores de la clorofila, ya que existen pruebas experimentales para dar una respuesta afirmativa. Plántulas que crecen en la oscuridad forman carotenoides, pero no clorofila. En las plántulas de avena que han crecido en la oscuridad y son llevadas a la luz, la cantidad de carotenos declina mientras se forma la clorofila (Salisbury y Ross, 1994). Esta podría

ser la causa por la cual en los resultados obtenidos en este trabajo la cantidad de carotenos es mucho menor que la clorofila *a* y *b* y por supuesto, la clorofila total.

VII. CONCLUSIONES.

El potencial hídrico del Agar-agar, Gelrite y agar Bioxon se registró entre los -0.48 y -0.49 MPa y del Bacto agar Difco de -0.51 MPa no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, tanto en medio fresco como el almacenado durante tres meses.

El Agar-agar, Gelrite y Bioxon tienen mayor capacidad de ceder agua que Bacto agar Difco lo cual se vio reflejado en los porcentajes de germinación obtenidos en semillas de *Echinocactus platyacanthus*, mostrando en el medio gelificado con Agar-agar (99%), seguido de Gelrite (97%), agar Bioxon (86%) y finalmente Bacto agar Difco (66%).

Sin embargo las plántulas provenientes de medio gelificado con Agar-agar poseen un epicótilo reducido y las aréolas muy juntas; y las provenientes de medio gelificado con Gelrite alcanzaron la mayor talla y un favorable desarrollo del epicótilo donde se observaron las aréolas separadas entre sí, obteniendo así plántulas que serán una buena fuente de explantes

Por lo que se recomienda el uso de Gelrite (3 g L⁻¹) para solidificar medio de cultivo Murashige Skoog al 50% de sus componentes solamente para la germinación de semillas y etapas tempranas del desarrollo de las plántulas de *Echinocactus platyacanthus*, debido a que posteriormente (dos meses) el medio se torna líquido y las plántulas se hiperhidratan; probablemente la naturaleza química de Gelrite y el potencial hídrico (-0.49 MPa), pueden ser las causas de las alteraciones morfológicas mostradas en plántulas de *Echinocactus platyacanthus*.

El agar bacteriológico se emplea de forma rutinaria en los trabajos de cultivo de tejidos, su costo es el menor de los agares empleados en este trabajo, su potencial hídrico es similar al del Gelrite, aunque el porcentaje de germinación alcanzado fue del 86% y el desarrollo de las plántulas es similar al de los otros agares, excepto al Gelrite, por lo que sigue siendo una buena opción para melificar el medio.

El porcentaje de pigmentos fotosintéticos en medio de cultivo gelificado con agar Bioxon, Agar-agar y Bacto agar Difco fue mayor que en Gelrite y el grupo control, mientras que el contenido de carotenos fue menor que el de clorofila *a* y *b* en todos los agentes gelificantes y el grupo control.

Es recomendable que en los trabajos de cultivo de tejidos vegetales se mencione tanto el tipo de agente gelificante, las concentraciones utilizadas y las marcas de los mismos.

Este estudio abre una perspectiva para la realización de experimentos sobre el efecto que ejercen los agentes gelificantes en el crecimiento y desarrollo de plántulas de cactáceas cultivadas *in vitro*.

Literatura citada.

- Amer, J. 1982. **Influence of agar Concentration on *in vitro* Shoot Proliferation of *Malus* sp. 'Almely' and *Pyrus communis* 'Seckel'**. Soc. Hort. Sci. 107: 657-660.
- Ault, J. R. y Blackmon, W. J. 1984. ***In vitro* propagation of *Ariocarpus acanthodes* (Cactaceae)**. HortScience. 22: 126-127
- Babbar, S. B., Jain, R. y Walia, N. 2005. **Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media**. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 41: 258-261.
- Baker, W. P. y Marin, L. E. 1999. **Successful cloning of the Saguaro (*Carnegiea gigantea*, Cactaceae)**. J. Arizona-Nevada Acad Sci.. 31: 96-100.
- Beruto, M., Beruto, D. y Debergh, P. 1999a. **Influence of agar on *in vitro* cultures: Physicochemical properties of agar and agar gelled medio**. *in vitro* Cell. In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant. 35: 137-143.
- Beruto M, Curir, P. y Debergh P. 1999b. **Influence of agar on *in vitro* cultures: II Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands**. In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant. 35: 94-101.
- Bewley, J. D. y Black, M. 1985. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum, New York, N. Y. 367 pp.
- Bonga, J. M. y Von Anderkas, P. 1992. ***In vitro* cultures of trees. Forestry Sciences**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 236 pp.
- Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991. **Las cactáceas de México, Vol. II**. UNAM, México, D.F. 404 pp.
- Bravo-Hollis, H. y Scheinvar, L. 1999. **El interesante mundo de las Cactáceas**. Fondo de Cultura Económica, México. 233 pp.
- Bregman, R. y Bouman, F. 1983. **Seed germination in Cactaceae**. Botan. J. Linn. Soc. 86: 357-374.

- Chacón, A. G., Saborio F., Gómez L., Torres S. y Valverde R. 2000. **El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y Ñame (*Dioscorea alata*).** Agron. Costarricense. 24: 57-64.
- CITES. 2001. **Comercio de cactus mexicanos. Venta en internet.** Undécima reunión del Comité de Flora Langwaki, Malasia del 3-7 de septiembre de 2001.
- Debergh, P., Harbaoui, Y. y Lemeur, R. 1981. **Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential.** Physiol. Plant. 53: 181-187.
- Debergh, P. C. 1983. **Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium.** Physiol. Plant. 59: 270-276.
- Debergh, P. C., Altken-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 Organ Cult. 30: 135-140.
- Devlin, R., M. 1980. **Fisiología Vegetal.** Ediciones Omega S. A. Barcelona, 517 pp.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1995. **Experiments in Plant Tissue Culture.** Cambridge University Press, New York, 256 pp.
- Eguiarte F., L. E. 1999. **Análisis de la distribución y estructura de las poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto, en el Valle de Zapotitlán, Puebla.** Informe final del Proyecto L009. UNAM
- Elías-Rocha, M. A., Santos-Díaz, M. L. y Arredondo-Gómez, A. 1998. **Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques.** Haseltonia. 6: 96-101.
- Flores, R. D. Y. 2007. **Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie amenazada del estado de Coahuila.** Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F. 61 pp.

- Fontúrbel, F. 2002. **Micropropagación de un cultivo perenne**. El portal de la biología y ciencias de la salud. <http://www.biologia.org/revista/pdfs/47.pdf>
- Ghashghaie, J. Grenckmann, F. y Saugier, B. 1991. **Effects of concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro***. *Physiol. Plant.* 82: 73-78.
- Godínez A. H. O. 1991. **Propagación de cactáceas por semilla: Una experiencia para su cultivo y conservación**. Tesis de Licenciatura. Biólogo. UNAM. México, 39 pp.
- Gómez, J. J. L., Morales, J. E., Lechuga, C. J. A. y Cruz, S. F. 2006. **Reproducción *in vitro* del garambullo, *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console**. *Cact. Suc. Mex.* 51: 36-45.
- Gorinova, N., Atanasov, A., Alexandrova, K., Velkova, R. y Kasachka, A. 1993. **Comparison of agar and microcrystal cellulose as agelling agents for *in vitro* culture of *Nicotiana tabacum* stem explants**. *Biol. Plantarum.* 35: 217-221.
- Gulsen, Y. y Dumanoglu, H. 1991. **The effect of sucrosa, agar and pH on shoot multiplication and quality in quince a micropropagation**. *Acta Hortic.* 289: 115-116.
- Guzmán, U., Arias, S. y Dávila. P. 2003. **Catálogo de Cactáceas Mexicanas**. CONABIO-UNAM, México, 325 pp.
- Hartmann, H. T., Kestler, D. E., Davies, F. y Geneve, R. L. 2002. **Plant propagation principles and practices**. Prentice Hall, USA, 880 pp.
- Henderson, W. E. y Kinnersley, A. M. 1988. **Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture**. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15: 17-22.
- Hernández A. C. A. 2007. **Germinación de cinco poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto (Cactaceae)**. Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 78 pp.
- Jain, N. y Babbar, S. B. 2002. **Gum katira—a cheap gelling agent for plant tissue culture media**. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 71: 223-229.

- Jiménez G. 1998. **Generalidades del Cultivo *in vitro***. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.), Propagación y mejora Genética de plantas por biotecnología (p. 13-22), Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Jiménez, S. C. 2002. ***Echinocactus platyacanthus* Link et Otto. (Cactaceae)**. Cact. Suc. Mex. 47.
- Johnson, J. L. y Emينو, E. R. 1979. ***In vitro* propagation of *Mammillaria elongata***. HortScience. 14: 605-606.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gillès, M. F. y Gaspar, Th. 1984. **Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro***. Physiol. Plant. 61: 69-74.
- Krikorian, A. D. 1985. **Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación**. En: Roca, W. M. (Ed.), El cultivo de tejidos en la agricultura p. 41-71.
- Ladyman, J. A. R. y Girard, B. 1992. **Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources**. HortScience. 27: 164-165.
- Machado, M. F. P. S. y Prioli, A. J. 1996. **Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation**. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. 32: 199-203.
- Malda, G. Suzán, H. y Backhaus, R. 1999. ***In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism**. Scientia Hort. 81: 71-87.
- Mandujano, M. C., Golubov, J. y Reyes, J. 2002. **Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar**. Biodiversitas. 6: 4-7.
- Marga, F., Verbet, L. y Morvan, H. 1997. **Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity**. Plant Cell Tissue Organ Cult. 49: 1-5.

- Martínez, R. A. Y. 2007. **Evaluación fisiológica de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae), especie amenazada de extinción.** Tesis Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. 74 pp.
- Martínez-Vázquez, O. y Rubluo, A. 1989. ***In-vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada.** J. HortScience. 64: 99-105
- Mendoza, M. G. 2007. **Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción.** Tesis Licenciatura. Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 87 pp.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nairn, B. J., Furneaux, R. H. y Stevenson, T. T. 1995. **Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiate pine.** Plant Cell Tissue Organ Cult. 43: 1–11.
- Nava-Esparza, V., C. y Chávez-Ávila, V. M. 1982. **Cultivo de cactáceas en medios asépticos.** Cact. Suc. Mex. 27: 17-23
- Olgún, S. L. P. 1994. **Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scieidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción.** Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de ciencias, UNAM, México, D. F. 85 pp.
- Owen, H. R., Wengerd, D. y Miller, R. 1991. **Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method.** Plant Cell Reports. 10: 583-586.
- Pasqualetto, P. L., Zimmerman, R. H. y Fordham, I. 1988. **The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*.** Plant Cell Tissue Organ Cult. 14: 31-40.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M. E., Dávila-Figueroa, C. A. y Villalobos-Amador, E. 2002. ***In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran desert.** HortScience. 37: 693-696.

- Pérez-Molphe-Balch, E. M., Pérez-Reyes, E., Villalobos-Amador, E., Morones-Ruiz, R. y Lizalde-Viramontes, H. J. 1998. **Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation**. In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant. 34: 131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E. M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G. y Ochoa-Alejo, N. 1999. **Introducción al cultivo de tejidos vegetales**. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 179 pp.
- Premkumar, A., Mercado, J. A. y Quesada, M. A. 2001. **Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio**. J. Plant Physiol. 158: 835-840.
- Podwyszynska, M. y Olszewski, T. 1995. **Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena**. Scientia Hort. 64: 77-84.
- Reil, G. y Berger, R. G. 1997. **Variation of chlorophyll and essential oils in photomixotrophic cell cultures of *Coleonema album* (Thunb.)**. J. Plant Physiol. 150:160-166 pp.
- Rodés-García, R. y Collazo-Ortega, M. 2006. **Manual de prácticas de fotosíntesis**. Las prensas de Ciencias. México, D. F. 159 pp.
- Rodríguez, G. M. 2006. **Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción**. Tesis Licenciatura. Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 78 pp.
- Rojas, G. M. 1959. **Principios de Fisiología Vegetal**. Imprenta Universitaria, UNAM, México, D. F. 234 pp.
- Romany, G., Matheus, J., Gerstl, A., Rueda, R. y Santana, M. A. 2006. **Almidón modificado de Yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales**. Interciencia. 31: 686-689.
- Rosas, L. U. Y. 2002. **Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico**. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM. 109 pp.

- Salisbury, F. y Ross, C. 1992. **Fisiología Vegetal**. Grupo editorial Iberoamérica, México, 759 pp.
- Salisbury, F. y Ross, C. 1994. **Fisiología Vegetal**. Iberoamericana, México, 165 pp.
- Santos-Díaz, M. S., Méndez-Ontiveros, R., Arredondo-Gómez, A. y Santos-Díaz, M. L. 2003. **Clonal propagation of *Turbinicarpus laui* Glass and Foster, a cactus threatened with extinction**. *Bradleya*. 21: 7-12.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001, **Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambios-Lista de especies en riesgo**. *Diario Oficial de la Federación*. 6 de marzo 2002. 1-85 pp.
- Sigma. 2006. **Bioquímicos, Reactivos y Kits para Investigación en Ciencias de la Vida**. Sigma-Aldrich. 2488 pp.
- Singh, B. B. 1999. **Regeneration of *Coryphanta elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants**. *Scientia Hort*. 81: 337-344.
- Singha, S. 1982. **Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almely' and *Pyrus communis* 'Seckel'**. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 657-660.
- Singha, S. y Townsend, E. C. 1985. **Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars**. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 407-411.
- Singha, S., Townsed, E. C. y Oberly, G. H. 1990. **Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro***. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23:135-142.
- Soria, C. D. 2006. **Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztlán, Hidalgo**. Tesis de Licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz. 74 pp.

- Starling, R. 1985. ***In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis***. Cact. Suc. J. 57: 114-115.
- Stuppy, W. y Nagl, W. 1992. **Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. via somatic embryogenesis**. Bradleya. 10: 85-88.
- Szabados, L., Núñez, N. M., Tello, L. M., Mafla, G., Roa, J. y Roca, W. M. 1993. **Los agentes gelinizantes en el cultivo de tejidos**. En: Roca, W. M. y Mroginski, L. A (Eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Fundamentos y aplicaciones (p. 79-93), Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Tapia, C. D. M. 2006. **Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie en peligro de extinción**. Tesis Licenciatura. Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73 pp.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. **Plant Physiology**. Sinauer Associates. Massachusetts, 690 pp.
- Tsay, H-S., Lee C-Y., Agrawal, C. A. y Basker, S. 2006. **Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*-a medicinal plant**. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 42: 445-449.
- Villavicencio-Gutiérrez, E. E., Villegas-Monter, A., Arellano-Ostoa, G. y Vargas-Hernández, J. 1999. **Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem.** Cact. Suc. Mex. 44: 49-57.
- Vyskot, B. 1984. **Clonal propagation of cacto through axillary buds *in vitro***. J. Hort. Sci. 53: 449-452.
- Williams, R. R. y Taji, A. M. 1987. **Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* cultures of Australian woody plant species**. Plant Cell Tissue Organ Cult. 11: 151-156.
- Williams, R. R. y Taji, A. M. 1991. **Effects of temperature, gel concentration and cytokininis on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures**. Plant Cell Tissue Organ Cult. 26: 1-6.

Zimmerman, R. H., Bhardwaj, S. V. y Fordham, I. M. 1995. **Use of starch-gelled medium for tissue culture of some crops**, Plant Cell Tissue Organ Cult. 43: 207-213.

Anexo I. Descripción de la especie *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto realizada por Bravo Hollis y Sánchez Mejorada (1991).

“biznaga dulce”

Tallo globoso, subgloboso, gruesamente columnar hasta toneliforme, y muy grande, los ejemplares adultos de 20 cm a 2 m de altura y cerca de 40 a 80 cm de diámetro, de color verde oscuro a algo glauco, presentando, en las formas jóvenes, bandas horizontales de color rojizo purpúreo; ápice hundido, llevando abundante lana amarillenta que forma una amplia zona lanosa circular o más o menos elíptica. *Costillas* gruesas y duras, cuyo número aumenta con la edad, de 5 a 8 en las formas juveniles hasta alrededor de 60 en las formas columnares viejas, con vértice agudo, con la base más o menos ancha y los surcos intercostales profundos: *Aréolas*, en los ejemplares jóvenes, distantes entre sí de 1 a 3 cm; en los ejemplares adultos, contiguas o confluentes, circulares hasta elípticas, de unos 12 mm de diámetro, las del ápice con abundante lana amarillenta, las restantes más o menos glabras. *Espiración* variable en relación con la edad de la planta; todas las espinas grandes y gruesas, subuladas o más o menos aplanadas, estriadas transversalmente, al principio amarillentas hasta con tintes rojizos, después más o menos castañas y al final negruzcas. *Espinas radiales*, en los ejemplares jóvenes, 8 a 10, dispuestas cuatro arriba y cuatro debajo de la aréola, de 3 a 4 cm de longitud, frecuentemente una superior y una inferior dirigidas hacia arriba y hacia abajo, las demás largas, rectas, una que otra, a veces, un poco ganchuda, horizontales y laterales, con el tiempo se reducen en número hasta desaparecer. *Espinas centrales* 4, dispuestas en cruz, a veces por reducción 3 hasta 1, de 5 a 10 cm de longitud, la inferior y a veces la superior generalmente más largas, más o menos aplanadas y con base algo engrosada, rectas o algo curvas, estriadas transversalmente, las dos laterales más o menos horizontales, la inferior dirigida hacia abajo, la superior porrecta, con el tiempo se atrofian pudiendo reducirse a una sola. *Flores* numerosas emergiendo entre la lana del ápice, diurnas, abriéndose ampliamente, de unos 5 a 7 cm de diámetro, de color amarillo intenso; pericapelo y región receptacular indiferenciados, formando un todo

obcónico, de paredes gruesas; la región pericarpelar de alrededor de 2 cm de longitud y 1.2cm de diámetro, provista de numerosas escamas angostamente lineares y largamente acuminadas, con extremidad escariosa, de 7 a 12mm de longitud, con abundantes pelos axilares sedosos, de 3 a 4cm de longitud, de color blanco amarillento; región receptacular muy corta, de paredes gruesas, las dos terceras partes inferiores con escamas semejantes a las del pericarpelo, el tercio superior con numerosas escamas angostamente triangulares, de cerca de 15 mm de longitud, coriáceas acuminadas, con lana axilar, en transición con los segmentos exteriores del perianto numerosos, anchamente oblancheolados, coriáceos, de alrededor de 1.5 cm de longitud, acuminados, con el margen dentado; segmentos interiores del perianto también numerosos, espatulados, con el ápice apiculado o dentado y el margen dentado, de color amarillo intenso, cavidad del ovario ovoide, de 6 mm de diámetro, con óvulos numerosos provistos de funículos ramificados; nectario en torno de la base del estilo, de cerca de 1 cm de longitud; estambres muy numerosos; filamentos amarillos, anteras de color amarillo cromo; estilo grueso, de 3 a 3.5cm de longitud, amarillento, estriado longitudinalmente, lóbulos del estigma 10 a 12, de unos 8mm de longitud, amarillos. *Fruto* seco, largamente oblongo, de 5 a 7cm de longitud, amarillento, con escamas numerosas, angostamente lineares, escariosas, con lana y pelos axilares que cubren la pared del fruto; conserva adherido los restos secos del perianto. *Semillas* de alrededor de 2.5mm de longitud; testa negra, brillante, con ornamentación celular; hilo basal central, micrópilo pequeño, próximo al hilo.

Estas plantas crecen lentamente y pasan muchos años (cerca de un siglo) para adquirir su forma columnar o de tonel, pudiendo alcanzar hasta 3m de altura y a pesar varias toneladas; florecen muy pronto, desde sus estados juveniles globosos, de 8 costillas. A partir de estas formas juveniles con pocas costillas, cuyas aréolas llevan hasta unas 10 espinas radiales y 4 centrales, la espiración va cambiando lentamente por reducción, conforme va creciendo la planta hasta permanecer solo las 4 espinas centrales que a su vez pueden disminuir hasta quedar solo una.

Dichos cambios, no apreciados por los taxónomos, dieron origen a que fueran descritas como especies distintas diversos estados del desarrollo, lo que condujo a problemas de nomenclatura.

Anexo II. Formulación del medio de cultivo

Murashige y Skoog (1962)

Macronutrientes	MS100% g L ⁻¹	MS 50% g L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1.65	0.825
KNO ₃	1.90	0.95
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	0.185
KH ₂ PO ₄	0.017	0.085
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.44	0.22
Micronutrientes		
KI	0.00083	0.000415
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
MnSO ₄ * H ₂ O	0.0169	0.00845
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	0.0043
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025	0.000125
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025	0.0000125
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025	0.0000125
Solución de Hierro-EDTA		
NaEDTA	0.0373	0.01865
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.0278	0.0139
Vitaminas		
Ácido nicotínico	0.0005	0.00025
Piroxidina-HCl	0.0005	0.00025
Tiamina-HCl	0.0001	0.00005

	MS100% g L ⁻¹	MS 50% g L ⁻¹
Aminoácidos		
Inositol	0.10	0.05
Glicina	0.002	0.001
Sacarosa		
	30	15
Agar y Gelrite		
Agar-agar	6	6
Agar Bioxon	8	8
Bacto agar Difco	8	8
Gelrite gellan gum	3	3