



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FRUTICULTURA**

## **Morfología, germinación, micropropagación y análisis cromosómico de cuatro especies de cactáceas para su conservación**

Sinai Mariana Manzo Rodríguez

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

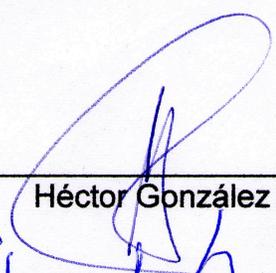
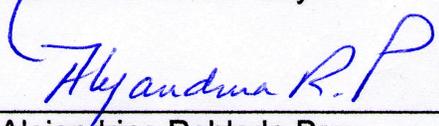
2015

La presente tesis titulada: Morfología, germinación, micropropagación y análisis cromosómico de cuatro especies de cactáceas para su conservación. Realizada por el alumno: Sinai Mariana Manzo Rodríguez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____ Héctor González Rosas
ASESOR	 _____ Edmundo García Moya
ASESOR	 _____ Alejandrina Robledo Paz
ASESOR	 _____ Tarsicio Corona Torres
ASESOR	 _____ Vicente Esponosa Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio del 2015

## RESUMEN GENERAL

### Morfología, germinación, micropropagación y análisis cromosómico de cuatro especies de cactáceas para su conservación

Sinai Mariana Manzo Rodríguez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

Las cactáceas tienen características biológicas que las hacen únicas y además por los servicios que ofrece al hombre como alimento, medicina, industrial, ambiental y ornamental. Sin embargo, tiene un gran número de especies en riesgo principalmente por las actividades antropogénica. Por lo que es fundamental el estudio y el manejo de esta familia al estudiar la morfología, viabilidad y germinación de sus semillas, micropropagación y estudio cromosómico de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Echinocactus grusonii* Hildm., *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm) y *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) J.M. Coult. El área y el perímetro del embrión y la semilla se midieron y se caracterizaron. Se evaluó la viabilidad y la germinación de las semillas en diferentes tratamientos, el índice de velocidad germinativa (IVG) y su influencia en el vigor de las plántulas. Los tratamientos para la micropropagación fueron citoquininas con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (K), 6-bencilaminopurina (BA) y adenina N-isopentenil (2ip), solos o en combinación con la auxina ácido naftaleno acético (ANA) con diferentes dosis y el control (medio MS sin reguladores). El estudio cromosómico se realizó con ápices de la raíz de plántulas, las cuales se pre-trataron con frío y colchicina, fijadas en Carnoy, la tinción fue con Feulgen y orceína propiónica y después se observaron en un microscopio Leitz Wetzlar. Los resultados muestran diferencias entre las especies en el color, la estructura de la semilla, el área y el perímetro de semillas y embriones. Las semillas de *E. platyacanthus* fueron las más grande y pesadas. *E. platyacanthus* mostró el mayor porcentaje de viabilidad (87.5%). *F. pilosus* tuvo la mayor germinación con tierra de monte-tezontle sin escarificación (98%) y un IVG de 4.03 semillas d<sup>-1</sup>. Mientras las semillas de *E. grusonii* con escarificación, con 100% de germinación fue el mejor en tierra de monte-tezontle y en arena y con un IVG de 8.3 y 8.1 s d<sup>-1</sup>, respectivamente. En la micropropagación la mejor citocinina fue 2iP. El mejor tratamiento fue *E. platyacanthus* con 1.0 2iP:0.1 ANA (mg L<sup>-1</sup>) con un promedio de 5.6 brotes por explante. El enraizamiento fue mejor con MS sin reguladores (90%). Las plántulas enraizadas en MS sin reguladores se aclimataron al 80%. *E. grusonii* es diploide y tuvo cromosomas uniformes, pequeños metacéntricos.

Palabras clave: viabilidad, reguladores de crecimiento y peso volumétrico.

## GENERAL ABSTRACT

Cacti have biological characteristics that make them unique mainly for its great variety of uses as food, medicine, industrial, environmental and ornamental value. However, it has a large number of species at risk mainly due to anthropogenic activities. So it is essential to study and learn the management of this family studying factors like morphology, viability and seed germination, micropropagation and chromosomal study on *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Echinocactus grusonii* Hildm., *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm) and *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) JM Coult. The area and perimeter of the embryo and seed were measured and characterized. Viability and germination of seeds in different treatments, germination rate index (IVG) and their influence on seedling vigor was evaluated. Treatments for micropropagation were cytokinins 1.0 mg L<sup>-1</sup> kinetin (K), 6-benzylaminopurine (BA) and N-isopentenyl adenine (2iP), alone or in combination with auxin naphthalene acetic acid (NAA) using different dose and a control (MS medium without regulators). The chromosomal study was conducted in root tips of seedlings, which were pretreated with cold and colchicine, fixed in Carnoy, staining with Feulgen and orcein propionic and then observed under a microscope Leitz Wetzlar. The results show differences between species in color, structure of the seed, area and perimeter of seeds and embryos. *E. platyacanthus* seeds were larger and heavier. *E. platyacanthus* showed the highest percentage of viability (87.5%). *F. pilosus* had the highest germination using forest-tezontle's soil without scarification (98%) and IVG of 4.03 seeds d<sup>-1</sup>. Meanwhile seeds of *E. grusonii* with scarification, with 100% germination, was the best in forest soil-tezontle and sand with IVG of 8.3 and 8.1 s d<sup>-1</sup>, respectively. Best cytokinin micropropagation substance was 2iP. Best treatment was 2iP on *E. platyacanthus* with 1.0: 0.1 ANA (mg L<sup>-1</sup>) with an average of 5.6 buds per explant. Rooting effect was better with MS without regulators (90%). Seedlings rooted in MS without regulators were acclimated to 80%. *E. grusonii* was diploid chromosomes and had uniforms, small metacentric.

Keywords: viability, growth regulators and volumetric weight.

## DEDICATORIA

A **Dios** por su infinito amor y ponerme siempre en mi camino personas maravillosas.

Con amor a mi hija **Mariana Estivaliz Martínez Manzo** por ser mi motivación y pilar.

Con amor y gratitud a mi esposo **Ulises Castro Valderrama**, a mi padre **Alejandro Manzo González**, a mi madre **Lucia Rodríguez Islas**, a mis hermanas **Quetzalli Susana** e **Itze Alejandra** y mi **familia** por su infinito apoyo en todos los aspectos de mí vida durante mí doctorado.

A mis **amigos** y en especial **Jorge Valdez Carrasco** por su ayuda incondicional

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por financiar los estudios de postgrado, a mí consejero: **Dr. Héctor González Rosas** y asesores: **Dr. Edmundo García Moya, Dra. Alejandrina Robledo Paz, Dr. Tarsicio Corona Torres** y **Dr. Vicente Espinosa Hernández** por el importante e incondicional apoyo otorgado.

A **MC Adrián Livera Hernández, MC Jorge Valdez Carrasco, Biólogo Gabriel Olalde Parra, Biólogo Marcial García Pineda, Ma. de los Ángeles Bernal Alarcón** y **Dr. Manuel Livera Hernández** por su apoyo en mi investigación.

A todo el **personal de la biblioteca** por el apoyo otorgado.

A **todas las personas y amigos** que me ayudaron durante mi doctorado.

**PARA TODOS INFINITAS GRACIAS.**

## CONTENIDO

	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>4</b>
<b>III. HIPÓTESIS GENERALES</b>	<b>5</b>
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Familia Cactaceae</b>	<b>6</b>
<b>4.2. Viabilidad en cactáceas</b>	<b>9</b>
<b>4.3. Germinación en cactáceas</b>	<b>12</b>
4.3.1. Germinación <i>ex vitro</i>	<b>13</b>
4.3.2. Germinación <i>in vitro</i>	<b>14</b>
<b>4.4. Micropropagación en cactáceas</b>	<b>15</b>
<b>4.5. Análisis cromosómico en cactáceas</b>	<b>16</b>
<b>V. LITERATURA CITADA</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I. VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS</b>	<b>24</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>24</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>25</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>26</b>
<b>1.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
1.2.1. Material vegetal	<b>29</b>
1.2.2. Descripción morfológica externa e interna de la semilla y partes de las plántulas	<b>29</b>
1.2.3. Caracterización física de la semilla	<b>30</b>
<b>1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
1.3.1. Descripción morfológica externa e interna de la semilla y partes de las plántulas	<b>31</b>
1.3.2. Caracterización física de la semilla	<b>40</b>
1.3.2.1. Peso de 1000 semillas	<b>40</b>

1.3.2.2. Peso volumétrico	41
<b>1.4. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>1.5. LITERATURA CITADA</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO II. VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE CUATRO CACTÁCEAS EN PROTECCIÓN ESPECIAL Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN</b>	<b>48</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>48</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>49</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>50</b>
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>52</b>
2.2.1. Material vegetal	52
2.2.2. Prueba de viabilidad	52
2.2.3. Germinación	52
<b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
2.3.1. Viabilidad	54
2.3.2. Germinación	57
2.3.3. Índice de velocidad germinativa (IVG)	61
2.3.4. Escarificación en <i>E. platyacanthus</i> y <i>E. grusonii</i>	62
<b>2.4. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>2.5. LITERATURA CITADA</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO III. MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS AMENAZADAS</b>	<b>69</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>69</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>70</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>71</b>
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>73</b>
3.2.1. Material vegetal	73
3.2.2. Establecimiento e inducción de brotes	73
3.2.3. Enraizamiento	73
3.2.4. Aclimatación	74
<b>3.3. RESULTADOS</b>	<b>75</b>

3.3.1.	Formación de brotes	75
3.3.2.	Formación de raíz	77
3.3.3.	Plántulas aclimatadas	78
<b>3.4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
3.4.1.	Formación de brotes	80
3.4.2.	Formación de raíz	82
3.4.3.	Plántulas aclimatadas	83
<b>3.5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>3.6.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO IV. NÚMERO CROMOSÓMICO DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS EN RIESGO</b>		<b>87</b>
<b>RESUMEN</b>		<b>87</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>88</b>
<b>4.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>89</b>
<b>4.2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>91</b>
4.2.1.	Material vegetal	91
4.2.2.	Determinación del número de cromosomas	91
<b>4.3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
4.3.1.	Número cromosómico	93
4.3.2.	Morfología de los cromosomas	94
<b>4.4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>4.5.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>		<b>99</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO I. VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS

Cuadro 1.1. Prueba de medias de Tukey en los embriones de <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> , <i>F. pilosus</i> y <i>L. williamsii</i>	39
Cuadro 1.2. Desviación estándar en los embriones de <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> , <i>F. pilosus</i> y <i>L. williamsii</i>	39
Cuadro 1.3. Prueba de medias de Tukey en semillas de <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> , <i>F. pilosus</i> y <i>L. williamsii</i>	40
Cuadro 1.4. Desviación estándar en semillas de <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> , <i>F. pilosus</i> y <i>L. williamsii</i>	40
Cuadro 1.5. Análisis de varianza para el peso de 1000 semillas de las especies <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> y <i>F. pilosus</i>	41
Cuadro 1.6. Peso volumétrico de las semillas de <i>E. grusonii</i> , <i>E. platyacanthus</i> , <i>F. pilosus</i> y <i>L. williamsii</i>	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I. VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS

- Figura 1.1. Morfología de la semilla y plántula de *E. grusonii*. La escala es de 1 mm **35**
- Figura 1.2. Morfología de la semilla y plántula de *E. platyacanthus*. En la letra F se pueden observar las raicillas en la raíz principal. La escala está a 1 mm **36**
- Figura 1.3. Morfología de la semilla y plántula de *F. pilosus*. La escala es de 1 mm **37**
- Figura 1.4. Morfología de la semilla y plántula de *L. williamsii*. La escala está a 1 mm **38**

### CAPÍTULO II. VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE CUATRO CACTÁCEAS EN PROTECCIÓN ESPECIAL Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

- Figura 2.1. Porcentaje de viabilidad en cuatro especies de cactáceas en cloruro de tetrazolio con una concentración de 0.1% (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ) **54**
- Figura 2.2. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 0,1% en *E. platyacanthus* (A), *E. grusonii* (B), *F. pilosus* (C) y *L. williamsii* (D). Escala de 1 mm **55**
- Figura 2.3. Porcentaje de viabilidad en tres especies de cactáceas en cloruro de tetrazolio a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0% (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ) en tratamientos **56**
- Figura 2.4. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 0,5% en *E. grusonii* (A), *E. platyacanthus* (B) y *F. pilosus*(C) **57**
- Figura 2.5. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 1,0% en *E. grusonii* (A), *E. platyacanthus* (B) y *F. pilosus*(C) **57**

Figura 2.6. Porcentaje de germinación con los diferentes tratamientos en las cuatro especies (Tukey, $\alpha < 0,05$ ). TM-T: tierra de monte-tezontle, C-T: Compost-tezontle, A: arena y medio MS: medio Murashige & Skooge	<b>58</b>
Figura 2.7. Plántulas de <i>E. grusonii</i> MS 100%(A), 50%(E), 0% (I) <i>E. platyacanthus</i> MS 100% (B), 50% (F), 0% (J), <i>F. pilosus</i> MS 100% (C), 50% (G), 0% (K) y <i>L. williamsii</i> MS 100% (D), 50% (H), 0% (L). En la letra K la escala de 1 mm, mientras que en las demás son 5 mm. Medio MS: medio Murashige & Skooge	<b>61</b>
Figura 2.8. Plántulas en <i>E. grusonii</i> sustrato tierra de monte (A), arena (E) compost <i>E. platyacanthus</i> tierra de monte (B), arena (F), compost (J), <i>F. pilosus</i> tierra de monte (C), arena (G), compost (K) y <i>L. williamsii</i> tierra de monte (D), arena (H), compost (L). La escala es de 5 mm	<b>61</b>
Figura 2.9. Índice de Velocidad Germinativa (IVG) con los diferentes tratamientos en las cuatro especies. TM-T: tierra de monte-tezontle, C-T: Compost-tezontle, A: arena y medio MS: medio Murashige & Skooge	<b>62</b>
Figura 2.10. Porcentaje de germinación con los diferentes tratamientos de escarificación en <i>E. platyacanthus</i> y <i>E. grusonii</i> (Tukey $\alpha < 0.05$ )	<b>63</b>
Figura 2.11. Índice de Velocidad Germinativa (IVG) con los diferentes tratamientos de escarificación en <i>E. platyacanthus</i> y <i>E. grusonii</i>	<b>64</b>

### **CAPÍTULO III. MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS AMENAZADAS**

Figura 3.1. Tipo y color de callo-brotes con y sin hiperhidratación (A) <i>E. platyacanthus</i> , (B) <i>F. pilosus</i> y (C) <i>E. grusonii</i> (escala a 1 cm)	<b>75</b>
Figura 3.2. Promedio (desviación estándar) del número de brotes por explante de <i>E. platyacanthus</i> , <i>E. grusonii</i> y <i>F. pilosus</i> , con sus tratamientos, prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ )	<b>76</b>

Figura 3.3. Porcentajes de enraizamiento y prueba de medias en <i>E. platyacanthus</i> , <i>E. grusonii</i> y <i>F. pilosus</i> con y sin AIB. Prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ )	<b>77</b>
Figura 3.4. Formación de raíz con MS (A-B-C) y AIB (D-E-F) en <i>F. pilosus</i> (A-D), <i>E. grusonii</i> (B-E) y <i>E. platyacanthus</i> (C-F) (escala a 1 cm)	<b>77</b>
Figura 3.5. Porcentaje y prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).de plántulas aclimatadas en raizadas en diferentes tratamientos	<b>78</b>
Figura 3.6. Aclimatación en tierra de monte y tezontle de plántulas enraizadas en MS (A-B-C) y AIB (D-E-F) de <i>F. pilosus</i> (A-D), <i>E. grusonii</i> (B-E) y <i>E. platyacanthus</i> (C-F) (escala a 1 cm)	<b>79</b>

#### **CAPÍTULO IV. NÚMERO CROMOSÓMICO DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS EN RIESGO**

Figura 4.1. Cromosomas de ápices de raíz a 100x en <i>E. grusonii</i> en 2.0 h de colchicina	<b>94</b>
Figura 4.2. Cromosomas en profase tardía de ápices de raíz a 63x en <i>E. platyacanthus</i> en 24 h frío	<b>94</b>
Figura 4.3. Morfología de los cromosomas a 100x en <i>E. grusonii</i> con un pre-tratamiento en 2 h de colchicina	<b>95</b>

## I. INTRODUCCION GENERAL

La familia Cactaceae es endémica del continente americano, y abarca 300 géneros y un total de 2500 especies, se siguen descubriendo especies e inclusive géneros como *Geohintonia* Glass & W.A.Fitz Maur., *Cintia* Kníže & Říha y *Yavia* R.Kiesling & Piltz (Kunte y Šubík, 2004). México por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y clima es el país que alberga, la mayor cantidad de especies, con alrededor de 913 taxones (Bravo, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Kunte y Šubík, 2004; Jiménez, 2011). Las cactáceas, al ser consideradas endémicas, su área de distribución es restringida y muchas veces con la mínima alteración de su hábitat llegan a desaparecer. Aunado a que tienen características biológicas propias que las hace más sensibles, como es el lento crecimiento; baja propagación ya sea por semilla o vegetativa (hijuelos y esquejes), por lo que presentan un enorme riesgo, sobre todo en aquellos lugares con frecuentes eventos de disturbio como son: el desarrollo urbano, la expansión industrial, agrícola y ganadera, la introducción de especies exóticas, la construcción de caminos y carreteras (Alanís y Velazco, 2008; Hernández y Godínez, 1994; Hernández y Sánchez, 2002; Jiménez, 2011).

El 80% de las cactáceas en México son endémicas y un número considerable de estas se encuentran en alguna categoría de riesgo. Entre estas especies se encuentran: *E. platyacanthus* conocida como biznaga tonel grande, biznaga dulce o burra, que se distribuye en el centro y norte del país. Es una especie sobreexplotada, principalmente para la elaboración de dulce (acitrón) y como alimento para el ganado; *F. pilosus* llamada biznaga barril de lima, con presencia en Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, y Zacatecas. Se vende como planta de ornato, en época de sequía se utiliza como forraje, las flores y los frutos se consumen; *L. williamsii*, nombre común peyote, que se distribuye Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, y Zacatecas y EE. UU., Texas y Nuevo México, es usado en ceremonias religiosas y medicinal; por lo que las tres especies están en protección especial. *E. grusonii*,

nombrada como biznaga tonel dorada y asiento de suegra, se encuentra en Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí. Se considera planta de ornato y está en peligro de extinción; con base a NOM-059-ECOL-2010 (Arias *et al.*, 2005; Kunte y Šubík, 2004; SEMARNAT, 2010; Tropicos, 2013). Las cuatro especies son recolectadas indiscriminadamente para el comercio, como plantas de ornato, además, tres de ellas, son endémicas para México (Alanís y Velazco, 2008; Kunte y Šubík, 2004; Tropicos, 2013). Se encuentran en el apéndice II de CITES (CITES, 2012).

Para comprender los ciclos de vida, los procesos de germinación y el crecimiento de las cactáceas, es importante conocer la morfología y características físicas de las semillas y plántulas, así también en la identificación de grupos taxonómicos. Al haber pocos estudios es necesario realizar este tipo de trabajos en estas especies.

Dada la dificultad de conseguir material vegetativo y el obtener tejidos libres de patógenos, dificultando su manejo., la germinación es una opción viable para lograr mantener y preservar las especies de cactáceas. Sin embargo, la germinación es una de las etapas más vulnerables en el ciclo biológico de las plantas. Dado que cada especie tiene características específicas físicas y biológicas, que ocasionan comportamientos diferentes entre ellas conocer la capacidad de germinación de las semillas y desarrollar una planta normal, pues se sabe, por esta razón es necesario realizar pruebas que determinen el potencial que tienen las semillas en la germinación. Para determinar las probabilidades de sobrevivencia se requiere de pruebas como la viabilidad con tetrazolio, mediante la tinción del embrión para definir el porcentaje de germinación (ISTA, 2005; Moreno, 1984). Hasta donde se sabe, la prueba de viabilidad no se ha realizado en estas especies. La mayoría de los frutos en las cactáceas producen numerosas semillas, muy pocas son las que llegan a germinar y a desarrollarse para producir nuevas plantas.

Una opción para la conservación y propagación de cactáceas es la utilización de la germinación *in vitro* que entre sus ventajas es reducir el tiempo de germinación y

aumentar el número de semillas germinadas (Pérez *et al.*, 1998) respecto a la producida en condiciones naturales; puede solucionar casos de inhibición en la germinación, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto, reducir el tiempo y sincronizar la germinación, para valorar la eficiencia de esta técnica *in vitro* se puede comparar con el método convencional *ex vitro*.

Además, el uso del cultivo *in vitro* es importante para el rescate de especies con alguna categoría de riesgo, en este caso las cactáceas, que en México se encuentran en un alto número de especies endémicas. Sin embargo, una de las etapas esenciales para la micropropagación de cualquier especie es la obtención del cultivo aséptico, lo que se logrará implementando técnicas para eliminar todo patógeno del explante. Los procedimientos varían de acuerdo al tipo de explante y especie.

Otro aspecto importante que se debe de estudiar en esta familia es a nivel cromosómico en especial las diferencias cromosómicas que se pudieran presentar entre las especies, por lo que los cromosomas son un apoyo para saber el fenotipo. Pinkava *et al.* (1992) afirma que la comparación del número y morfología cromosómica frecuentemente da lugar a identificación de linajes evolutivos desconocidos. Además, cuando la taxa de diferentes niveles de ploidía se hibridan, se pueden encontrar ploidías intermedias en la progenie, por lo que los análisis cromosómicos son un valioso apoyo a las observaciones de los fenotipos. En la familia de las Cactáceas, el número básico es  $x=11$  y el número de cromosomas somáticos es en su mayoría  $2n=22$ . Se han realizado algunos estudios cromosómicos en *Turbincarpus vadezianus* (Möller) Glass & Foster obteniendo  $2n=2x=22$  (número básico  $x=11$ ). Para las Opuntioideae K. Schum., de acuerdo a Pinkava *et al.* (1985) el 63.3% de los taxa son poliploides; sin embargo, de una observación más detallada de los recuentos mostró que solo en el grupo de las especies de *Opuntia* de las series *streptacantha* Lem. y *ficus-indicae* (L.) Mill, existen octoploides ( $2n=88$ ). En pitahaya (*Hylocereus* spp. (A.Berger) Britton & Rose) los

cromosomas fueron observados en células de ápices radicales, teniendo un número cromosómico de  $2n=2X=22$  (Grimaldo-Juárez, 2001).

Al considerar los aspectos señalados anteriormente, en la presente investigación se plantearon los objetivos e hipótesis siguientes:

## II. OBJETIVOS

1. Caracterizar la semilla de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*, para identificar las diferencias entre estas especies.
2. Determinar el protocolo de la desinfección de la semilla.
3. Evaluar la viabilidad de las semillas en *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.
4. Conocer porcentaje, homogeneidad y velocidad de germinación en diferentes sustratos.
5. Determinar el efecto de los nutrimentos minerales en la germinación *in vitro*.
6. Establecer el protocolo, para evaluar el efecto de los reguladores del crecimiento en las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* en las cuatro especies.
7. Conocer el efecto de las auxinas en la formación de raíz en los brotes.
8. Evaluar la aclimatación de los brotes enraizados *in vitro* en MS y en MS con AIB.
9. Identificar los cromosomas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* para describir y comparar las características cromosómicas (longitud, morfología, número, relación de brazos) De cada una de las especies.

### III. HIPÓTESIS

1. La caracterización de las semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* permitirá establecer diferencias entre éstas.
2. La semillas estarán libres de patógenos.
3. Las concentraciones elevadas de cloruro de tetrazolio reducirán el tiempo de tinción en las semillas.
4. La técnica *in vitro* es una herramienta que favorecerá el mayor porcentaje de germinación.
5. Las diferentes concentraciones de los nutrimentos minerales del medio de cultivo Murashige y Skoog influirán en el porcentaje y velocidad de germinación.
6. La mayor concentración de citocininas y menor concentración de auxinas estimulará la formación de brotes.
7. La presencia de auxinas inducirá la formación de raíz.
8. La mejor aclimatación de los brotes enraizados será en MS con AIB.
9. La morfología y el número de cromosomas, es igual en las cuatro especies.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Familia Cactaceae

Las cactáceas son un grupo de plantas muy característico que se pueden encontrar en diferentes zonas climáticas desde el cálido al árido (Naffter, 2002). La familia Cactaceae es endémica del continente americano, se distribuye desde Peace River en el norte de Canadá hasta la Patagonia en Argentina; desde el nivel del mar hasta 5100 msnm en Perú. Se encuentran principalmente en zonas áridas y semiáridas, subtropicales y tropicales húmedas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002).

Las cactáceas son valiosas por la gran diversidad de formas que tienen, y además se considera que dentro del grupo de plantas con flores que hay en América es el más diverso (Naffter, 2002). Arias (2007) menciona que es fácil conocer esta familia, pero cuando se trata de identificar géneros y especies es más complicado. Todas las especies son plantas perennes pero el hábito de crecimiento puede variar en arborescentes, arbustivos, trepador o epifito. Además, sus tallos son fotosintéticos, generalmente suculentos, cilíndricos, globosos o aplanados, también puede ser simples o ramificados, la superficie del tallo puede ser lisa, tener podarios (tubérculos) o costillas. Una característica distintiva de esta familia son las areolas, un tipo de braquiblasto o pequeña rama con varios meristemas cubierta de tricomas, que son las yemas de las cactáceas, si son vegetativas emergen espinas y a veces hojas y si son reproductivas brotan las flores. Se puede observar en algunas especies diferencias como en *Melocactus* que tiene cefalio (inflorescencia), puede haber tricomas y cerdas largas. Por estas razones, se describirán a continuación solo las especies utilizadas en este trabajo.

***Echinocactus platyacanthus***. Gómez (2001) y Kunte y Šubik (2004) mencionan que se pueden encontrar variantes en esta especie. Tallo globoso que con los años pasa a columnar, desde 50 a 200 cm de altura y de 40 a 80 cm de diámetro con epidermis color verde oscuro. Ápice hundido con lana amarillenta. Costillas gruesas

y duras cuyo número aumenta con los años desde 5 a 8 en fase juvenil hasta 60 con formas columnares en plantas de 100 años. Areolas circulares a elípticas. Espinas variables según la edad de la planta, pero todas largas y gruesas, subuladas y, al principio, amarillas hasta con tintes rojizos, después de color castaño y pasan finalmente a negruzcas, las radiales de 8 a 10 desde 3 a 4 cm de longitud, con los años se reducen hasta desaparecer, las centrales son cuatro en forma de cruz, a veces solo 3 hasta 1, desde 5 a 10 cm de longitud. Flores numerosas entre la lana del ápice, de 5 a 7 cm de color amarillo. Fruto seco oblongo, amarillento, porta escamas, lana y pelos. Semillas negras, se pueden conservar por mucho tiempo. Se encuentra en los estados de Hidalgo, Querétaro, Puebla, Guanajuato, San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Zacatecas. Se reproduce por semillas con proceso fácil y crecimiento lento. Se cultivan a pleno sol en compuesto humífero con buen drenaje, con riegos en primavera y verano. Sin riegos en invierno. Resiste temperaturas de alrededor de -8°C.

***Echinocactus grusonii.*** Según Gómez (2001) es una Cactácea globosa con el tiempo algo cilíndrico hasta de 130 cm de altura por 80 a 100 cm de diámetro con epidermis de color verde claro. Ápice con lana amarilla. Costillas de 21 a 37, delgadas y altas. Areolas grandes y alargadas. Espinas amarillo oro, las radiales de 8 a 10, subuladas, de 3 cm de longitud. Espina central de 4 a 7 cm de longitud. Flores pequeñas campanuladas de 5 cm de diámetro con pétalos lanceolados de color amarillo cadmio con brillo sedoso, tardan muchas décadas en aparecer. Fruto oblongo hasta esférico de 1.2 a 2 cm de diámetro cubierto de lana y escamas. Semillas de 1.5 mm de longitud de color castaño, se pueden conservar por mucho tiempo. Hábitat: se encuentra cerca de los 2000 m de altitud en suelos pedregosos entre arbustos y hierbas en Querétaro, San Luis Potosí e Hidalgo. Se produce por semilla con proceso fácil y crecimiento mediano. Se cultiva a pleno sol en suelos con buen drenaje, con riegos abundantes en primavera y verano. Resiste temperaturas de alrededor de 5°C.

***Ferocactus pilosus***. Kunte y Šubik (2004) se refieren como una especie de las más voluminosas del género; puede alcanzar alturas de más de 2 m y un diámetro de medio metro. En vida silvestre forma agrupaciones arracimadas de gran número de ejemplares de unos 30 cm de diámetro. Con espinas rojas, gruesas y leñosas que emergen junto con las espinas blancas y vellosas de las areolas elípticas y relativamente grandes. Las flores miden 4 cm de longitud, su color oscila entre el amarillo oscuro y el rojo anaranjado y producen frutos de sabor muy agrio, escamosos, que pueden contener hasta 1000 semillas en su interior. Se distribuye de San Luis Potosí y Durango hasta Nuevo León y Coahuila. Se reproduce únicamente por semilla y se facilita su cultivo.

***Lophophora williamsii***. Gómez (2001) y Bravo-Hollis y Scheinvar (2002) mencionan que es una planta globosa algo cespitosa con el ápice hundido de unos 6 cm de altura por 12 cm de diámetro en época de lluvias, pero en época de estiaje se hunde por la pérdida de agua. Raíz napiforme. Epidermis de color verde-azulada, debido a una capa cerosa que la protege. Costillas bien definidas de altura variable formando tubérculos más o menos altos. Areolas circulares con pelos blancos y sedosos. Las flores brotan de la parte central de la planta, flores de 2,5 cm de diámetro de color rosa pálido, tiene forma campanulada y florece de forma continua durante todo el verano. Frutos claviformes blancos con semillas negras. Se distribuye ampliamente desde México hasta Estados Unidos. Se reproduce por semilla y se multiplican por hijuelos con proceso fácil en ambos casos y crecimiento mediano. Se cultiva en un sustrato estándar al sol o media sombra, regando moderadamente durante primavera y verano. Si la planta está seca, soporta heladas cortas de hasta los 3°C.

Estas especies tienen varios usos que van desde el espiritual hasta planta ornamental, por lo que esto hace mayor su demanda que junto a la sensibilidad de estas especies ha provocado su reducción en sus hábitats naturales (Bravo 1978). Además, la falta de conocimiento por parte de la población e inclusive el poco conocimiento a nivel académico aunado a otras actividades antropógenas como el

crecimiento urbano, apertura de espacios para la ganadería y la agricultura (Arias *et al.*, 2005; Jiménez, 2011). Arredondo (2010) menciona que la propagación de las cactáceas es incipiente al compararla con otros países como Japón, Alemania, Inglaterra, Holanda y Brasil. Según Nobel (2011) a consecuencia del cambio climático que está enfrentando el planeta, las cactáceas van hacer las plantas del futuro por sus características fisiológicas, su tolerancia a la sequía y altas temperaturas. Por lo que es necesario hacer trabajos en estas especies, con el fin de generar más información especialmente en estudios morfológicos que servirán a la taxonomía vegetal, la cual no debe basarse exclusivamente en el adulto, sino también debe incluir las fases juveniles (Millanez *et al.*, 2008), promoviendo su propagación para su conservación y satisfacer los mercados y así poder reducir su extracción ilegal y destrucción de sus hábitats (Giusti *et al.*, 2002).

#### **4.2. Viabilidad en cactáceas**

Para poder obtener semillas con características de alta calidad y mayor número de plantas normales es necesario realizar una serie de análisis como la prueba de viabilidad.

Esta prueba es la indicada para conocer la viabilidad de semillas que presentan latencia, o una velocidad de germinación muy baja. Esta prueba utiliza el tetrazolio y presenta la ventaja de poder realizarse rápidamente y no requiere de equipamiento especial (Pérez y Pita, 2001). La prueba bioquímica de viabilidad, tiene como propósito mostrar que una semilla es viable por su actividad y así pueda expresar su potencial de producir una plántula normal, así mismo revela semilla no viable o con baja viabilidad al observar deficiencias y/o anomalías.

ISTA (2005) y Craviotto (2007) mencionan que los objetivos de la Prueba Topográfica por Tetrazolio son:

1. Realizar una estimación rápida de la viabilidad de las semillas y de aquellas que presentan latencia.
2. Valorar la viabilidad de semillas con un alto porcentaje de latencia.
3. Detectar la presencia de varios tipos de daños de procesamiento y cosecha (daño por calor, mecánico, por insectos).

El ensayo se basa en que una vez que los diferentes tejidos de la semilla se han hidratado, en el embrión se activan rutas metabólicas (Pérez y Pita, 2001). El principio de esta prueba es la utilización de una solución incolora llamada sal cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio como un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas. Una vez embebida la solución de tetrazolio por las semillas, en las células vivas se lleva a cabo la reacción química de óxido-reducción en donde participan las enzimas deshidrogenasas que están en los tejidos vivos. Durante esta reacción, los protones hidrógenos que se liberan en la respiración reducen al tetrazolio a formazan. El formazan es una sustancia estable, no difusible, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas (áreas de color rojo o rosado según la concentración empleada de la sal), de las zonas muertas (de color blanco) (Pita, 2001; ISTA, 2005; Pérez y Craviotto, 2007). Las concentraciones utilizadas de tetrazolio en diversos trabajos varían de 0.1 a 1% y debe hacerse en la obscuridad porque es sensible a la luz que pueden afectar los resultados (Cota, 1985).

El color que toma la semilla es un factor importante para determinar la viabilidad de la semilla, pero también se deben de tomar en cuenta otros factores para una mejor interpretación y clasificación de estas como: homogeneidad del color, turgencia de los tejidos; naturaleza de los daños, localización de los daños, extensión y profundidad de los daños (ISTA, 2005; Craviotto, 2007).

La viabilidad medida con el Tetrazolio es una característica única y distintiva de una semilla latente. La viabilidad es claramente independiente de una prueba de germinación. Pero están estrechamente relacionadas por lo que no habrá diferencias

significativas entre estas, solamente en algunos casos como lo expresan ISTA (2005) y Craviotto (2007):

1. Las semillas sin latentes, sin estar duras o se ha tratado apropiadamente con tratamientos de ruptura de latencia y no hay semillas duras.
2. Sin infecciones o se han desinfectado apropiadamente.
3. Sin estar pulverizadas en el campo, sin recubiertas durante el procesamiento o al no ser fumigadas con productos químicos dañinos durante el almacenamiento.
4. No han rebrotado.
5. Al no deteriorarse durante la prueba de germinación en su duración normal.
6. Han germinado bajo condiciones óptimas.

Son pocos los trabajos realizados para determinar la viabilidad en las semillas de cactáceas pero hay algunos informes como Suarez (2011) en *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose (pitahaya amarilla) quien obtuvo tinción en todos sus embriones con las concentraciones de 0.5, 0.75 y 1.0% de tetrazolio, mientras con las concentraciones de 0.1 y 0.25% tuvo una tinción tenue a una temperatura de 40°C. León de la Luz y Domínguez (1991) sometieron semillas de *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson & Horak bajo tres tratamientos: el primero, semillas excretadas por el ave “carpintero de Gila”, el segundo fueron lavadas con agua y el tercer tratamiento las semillas se obtuvieron directamente del fruto. Estos autores usaron una concentración de 1% de tetrazolio y obtuvieron 85, 90 y 0% de semillas viables, respectivamente. Cota (1985) en *Ferocactus latispinus* (Haw.) B.R. & Rose realizó la prueba de viabilidad con una concentración de 0.1% y obtuvo un 70% de semillas viables. Masini *et al.* (2014) obtuvieron un 73.3% de semillas viables de *Maihuenia patagónica* (Phil.) Britton & Rose y 66.7% de semillas viables en *Maihueniopsis darwinii* (Hensl.) F. Ritter var. *hickenii* (Britton & Rose) con 1.0% de tetrazolio.

### 4.3. Germinación en cactáceas

Existen dos formas de propagar las cactáceas, el más utilizado es la propagación de tipo asexual que de manera convencional se utilizan esquejes, brotes e injertos por lo que es un clon de la planta madre, con la finalidad de conservar las especies pero tiene una desventaja al no obtener variación genética. También está la de tipo sexual, que son las semillas por lo que si hay variación genética y es la más adecuada para su conservación. Gómez (2001) menciona que en *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* solo se pueden propagar a partir de semilla por lo que la etapa más importante es la germinación en estas especies.

Las semillas de las cactáceas son generalmente pequeñas, pero en especies más primitivas llegan a medir hasta medio centímetro. Tienen formas diversas desde globosas a reniformes con coloraciones que van de negro a crema. Están integradas por el embrión, cubiertas protectoras y a veces tienen restos de sustancias nutritivas. El embrión puede tener cotiledones grandes o pequeños, esto depende si la especie es más primitiva. Dentro de las cubiertas la más externa, es la testa la cual es gruesa y esta provista de diferentes estructuras o formaciones que actúan como dispersores ya sea porque se adhieran a una superficie o rueden en superficies o grietas. La gravedad, la lluvia, el viento o algunos animales las transportan a lugares donde podrán germinar. La germinación es difícil en su medio natural y a pesar de que los frutos generalmente producen muchas semillas, son pocas las que germinan (Bravo, 1978; Rojas-Arechiga y Vázquez-Yanes, 2000; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002). Pérez-González *et al.* (2015) menciona que hay especies de cactáceas con vivíparidad facultativa (las semillas germinan dentro del fruto) esto puede ser inducido por cambios ambientales inesperados.

Otra forma de propagación es la técnica del cultivo de tejidos vegetales o *in vitro* para obtener mayor número de plantas en menor tiempo, espacio y libres de organismos fitopatógenos. Con el cultivo *in vitro* se puede sembrar cualquier órgano,

tejido y célula que esté viva, como son las areolas y usar las semillas de las cactáceas.

En algunas especies de la familia Cactaceae la semilla puede presentar latencia. (Rojas-Arechiga y Vázquez-Yanes, 2000) mencionan que la latencia en plantas es un proceso en el que las actividades fisiológicas cesan, incluso cuando las condiciones son adecuadas para la germinación y es importante para la supervivencia de la planta, principalmente cuando las condiciones ambientales no son adecuadas.

En la naturaleza cuando la semilla es arrastrada (por el viento o la lluvia) o comidas por algún animal como las aves, pequeños mamíferos, reptiles, murciélagos o insectos están pasando por un proceso de escarificación que ayuda en su germinación. Por esta razón, la escarificación es una técnica que ayuda a que las semillas con latencia germinen sincronizadas y más rápido y con un mayor número de semillas germinadas en comparación con aquellas sin escarificación (Rojas-Arechiga y Vázquez-Yanes, 2000).

En cactáceas se han hecho trabajos con relación a la escarificación de las semillas. Hay especies que germinan rápidamente después de que se siembre la semilla y también semillas que retrasen la germinación por meses o años, por lo que podrían tener latencia. Bravo (1978) menciona que en la testa de las semillas hay presencia de taninos y estos le confieren a la semilla más dureza, además y al tener ceras son impermeables al agua lo que ocasiona la latencia.

#### **4.3.1. Germinación *ex vitro***

La germinación en las cactáceas al utilizar sustratos es importante porque la mayoría de los productores los utiliza, pero para que puedan ser analizados se deben controlar los factores (temperatura, humedad y la iluminación) y así se puedan reducir riesgos en las semillas con las características que éstas tengan. Los

sustratos son importantes para los estudios de germinación y normalmente se recomiendan aquellos que deben ser porosos y tener un buen drenaje, esto sirve para la ventilación y secado del sustrato al evitar la pudrición por exceso de agua. Un punto importante para en el uso de sustratos es que deban ser materiales que se pueden encontrar en la zona, porque es más fácil conseguirlos y el costo es menor (ASYCS, 2010). Además deben ser esterilizados para reducir ataque de fitopatógenos que se puedan encontrar en estos (Salas-Cruz *et al.*, 2011).

Se han realizado algunos trabajos en las cactáceas para mejorar el porcentaje de germinación al usar sustratos. Álvarez y Montaña (1997) en *Cephalocereus chrysacanthus* (Weber) Britton & Rose, *Cephalocereus hoppenstedtii* (Weber) Schumann, *Ferocactus latispinus* (Haworth) Britton & Rose, *Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Riccobono y *Wilcoxia viperina* (Weber) Britton & Rose no encontrando diferencias en la germinación de semillas previamente tratadas bajo dos condiciones con suelos de la zona del Valle de Tehuacan. Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg y *E. platyacanthus* reportaron alto porcentaje de germinación para ambas especies en suelo-tepojal. Sánchez-Soto *et al.* (2010) usaron suelo de la isla de Mazocahui (Sinaloa, Méx.) para la germinación de *Mammillaria mazatlanensis* K. Shum. ex Gürke, *Stenocereus alamosensis* (J.M.Coul.) A.C.Gibson y K.E.Horak y *Stenocereus thurberi* subsp. *thurberi* (Engelm.) Buxb. y lograron entre el 85 al 90% en los tratamientos utilizados.

#### **4.3.2. Germinación *in vitro***

El uso de técnicas como el cultivo *in vitro* en principio ayudan a la obtención de plántulas libres de patógenos, además favorece la germinación al poder obtener mayor número de semillas germinadas en menor tiempo, con sincronía y en menor espacio. Además que a partir del cultivo de tejidos se puede hacer un banco de germoplasma con el cual se pueda trabajar con diversos fines (Nava-Esparza y Yañez, 1984). En las cactáceas el medio de cultivo utilizado es el Murashige y Skoog (1962) por ser un medio nutrimentalmente completo (Manzo, 2010).

En la familia cactáceas hay trabajos que se enfoquen en la germinación en cactáceas a partir del cultivo *in vitro*. Elías-Rocha *et al.* (1998) en *Mammillaria candida* (Scheidw.) Buxb. con los medios MS al 50 y 100% de MS sin escarificación, la germinación fue mejor con el medio MS al 100%. De Medeiros *et al.* (2006) en *Notocactus magnificus* (Ritter) Krainz con un medio MS al 100%, en donde alteraron la temperatura con una cámara Gerbox obtuvieron 26% de germinación. Así mismo, hay trabajos en cultivo *in vitro* en semillas con escarificación como Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en *P. chichipe* y *E. platyacanthus* realizaron diferentes tratamiento de escarificación obteniendo para *P. chichipe* sin escarificación el mayor porcentaje de germinación y con *E. platyacanthus* tuvieron un mayor porcentaje de germinación con los ácidos (clorhídrico y sulfúrico) en medio de cultivo sin MS. Quispe *et al.* (2010) en *Echinopsis pentlandii* (W.J. Hooker) S-D ex A Dietrich, *E. bridgesii* S-D y *E. lageniformis* (Förster) H. Friedrich & G.D. Rowley. Otro sustrato usado y reportado fue el papel filtro usado para la germinación en los trabajos de Mendez (2007) con *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose y Ayala *et al.* (2004) en *Stenocereus beneckeii* (Ehrenb.) Buxb.

#### **4.4. Micropropagación en cactáceas**

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una técnica de propagación masiva de plantas en condiciones asépticas. También la micropropagación tiene otros fines como son: a nivel fisiológico, genético, químico (en la extracción de compuestos), industrial, comercial. Se puede utilizar casi cualquier parte de la planta que este viva (Pierik, 1990; Retes-Pruneda, 2007).

La aplicación de esta técnica es apropiada en cactáceas porque son especies de lento crecimiento, y al estar la mayoría de ellas amenazadas se debe acelerar su multiplicación para obtener un mayor número de individuos y restablecer sus poblaciones (Nava-Esparza y Yañez, 1984).

Se mencionaran algunos trabajos realizados con esta técnica a partir de plántulas germinadas *in vitro*: Nava-Esparza y Yañez (1984) en *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. Martínez-Vazquez and Rublou (1989) en *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. Elías-Rocha *et al.* (1998) en *Mammillaria candida* (Scheidw.) Buxb. De Medeiros *et al.* (2006) en *Notocactus magnificus* (Ritter) Krainz.

Mientras otros investigadores trabajan con alguna parte de la planta traída de campo o bajo invernadero condiciones que hacen más difícil controlar la desinfección del explante sin dañarlo, además de ser un clon de la planta madre. Aliyu y Mustapha (2007) en *Opuntia ficus-indica*. Choreño-Tapia *et al.* (2002) en *C. selinis*. Ramirez-Malagon *et al.* (2007) en varias especies de *Mammillaria* Haw.

#### **4.5. Análisis cromosómico en cactáceas**

La familia Cactaceae tiene un número cromosómico básico de  $x=11$ , diploide ( $2n=22$ ) (Cota y Wallace, 1995). Pinkava *et al.* (1992), Cota y Philbrick (1994) consideran que los principales mecanismos de evolución han sido la hibridación y la apomixis, principalmente en *Opuntia*, *Mammillaria* y *Echinocereus*. Powell y Weedin (2001) mencionan que es importante conocer el número cromosómico dirigida a la evaluación de las poblaciones.

Los estudios detallados de los cariotipos en cactáceas que están disponibles son pocos. La falta de estudios se debe probablemente al tamaño de los cromosomas que son relativamente pequeños y la dificultad en la preparación de los tejidos y las células para analizarlos. El mucílago esta generalmente presente en el tejido, lo que dificulta la separación de las células y los cromosomas, con lo que su observación es muy difícil (Cota y Wallace, 1995; Larrea-Alcázar, 2007).

Powell y Weedin (2001) observaron el número cromosómico en *Ancistrocactus tobuschii* W. T Marshall ex Backeberg, *Coryphantha dancanii* (Hester) L. Benson, en varias especies de *Opuntia* Mill. y *Echinocereus* Engelm. Pinkava *et al.* (1992)

estudiaron en *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Brotton & Rose, *Coryphantha robbinsorum* (W. Earle) A. Zimmerman, *C. robertii* A. Berger, *C. vivípara* (Nutt.) Brotton & Rose, *Ferocactus cylindaceus* (Engelm.) Orc., *Lophocereus schottii* (Engelm.) Brotton & Rose, *Echinomastus erectocentrus* (J. Coulter) Brotton & Rose var. *erectocentrus*, *E. warnockii* (L: Benson) Glass & Foster, en varias especies de *Echinocereus* y *Opuntia*. Cota y Philbrick (1994) estudiaron varias especies de *Echinocereus*. Todos observaron diploides y principalmente poliploides en *Opuntia* y *Echinocereus*, mientras las demás especies fueron solo diploides.

## LITERATURA CITADA

- Alanís, F. G. J. y C. G. M. Velazco. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)* 11:5-11.
- Aliyu, B.S. and Y. Mustapha. 2007. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. *African Journal of Biotechnology*. 6(11): 1330-1331.
- Álvarez, A. M. G. y C. Montaña. 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacan: implicaciones para su conservación. *Acta Botanica Mexicana*. 40: 43-58.
- Arias, M. S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 109-115 pp.
- Arias, S., U. Guzmán, C. M. Mandujano, G. M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I (Una comparación entre los listados). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 50 (4): 101-125.
- Arias, M. S. 2007. Estudios sistemáticos en cactáceas columnares de América del Norte. Simposium de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el Estado de Hidalgo.
- Arredondo, G. A. 2002. Propagación y mantenimiento de cactáceas. INIFAP y SAGARPA. San Luis Potosí, México.
- Asociación Yucateca de Cactáceas y Suculentas (ASYCS). 2010. *Manual Básico para Cultivo de Cactáceas y Suculentas*. Mérida, Yucatán, México.
- Ayala, C. G., T. Terrazas, L. M. López y C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia*. 29(12): 692-697.
- Bravo, H. H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. 2<sup>da</sup>. ed. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F.  
<http://es.scribd.com/doc/72216730/Las-Cactaceas-de-Mexico-V1>. Fecha de consulta: 25-enero-2012.

- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 2002. El interesante mundo de las cactáceas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Choreño-Tapia, J. M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. Revista Chapingo Serie Horticultura. 8(2): 183-196.
- CITES, 2012. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/resources/especies.html>. Fecha de consulta: 25 de septiembre de 2012.
- Cota, J. H. and C. T. Philbrick. 1994. Chromosome number variation and polyploidy in the genus *Echinocereus* (Cactaceae). American Journal of Botany. 81(8): 1054-1062.
- Cota, J. H. and R. S. Wallace. 1995. Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. Caryologia. 48(2): 105-122.
- Cota, S. G. H. 1985. Morfología y pruebas de viabilidad con sales de tetrazolio en semillas de *Ferocactus latiospinus* (Haw.) Br. and Rose. Cactaceas y suculentas mexicanas. 30:51-55.
- Craviotto, R. M. 2007. Viabilidad. Análisis de Semillas, en búsqueda de un mejor simiente. Edición 1:4. [http://www.analisisdesemillas.com.ar//index.php?option=com\\_content&task=view&id=15&Itemid=31](http://www.analisisdesemillas.com.ar//index.php?option=com_content&task=view&id=15&Itemid=31). Fecha de consulta: 15-febrero-2015.
- De Medeiros, L. A., R. C. R. De Salvador, L. A. Gallo, E. O. De Tiago and M. E. S. P. Demattê. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84:165-169.
- Elías-Rocha, M. A., M. del S. Santos-Días and A. Arredondo-Gómez. 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. Haseltonia. 6: 96-101.
- Gómez, S. A. 2001. Enciclopedia ilustrada de los cactus y otras suculentas (descripción de especies, hábitat y cuidados de cultivo). Volumen I. Editorial Mundi-Prensa. España.

- Grimaldo-Juárez, O., A. García-Velázquez, J. Ortiz-Cereceres y L. M. Ruiz-Posadas. 2001. Características cariotípicas de seis genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7(2): 177-195.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 95: 319-332.
- Hernández, M. H. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26:33-52.
- Hernández, M. M. M. y E. M. Sánchez. 2002. Información de una nueva localidad de *Mammillaria mathildae* una propuesta para modificar su categoría legal de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 47:4-10.
- ISTA. 2005. International Seed Testing Assosarion. Internacional Rules for Seed Testing. Bassersdorf, CH-Switzerland. <http://www.seedtest.org/en/product---1-1082--203--13.html>. Fecha de consulta: 29-enero-2011.
- Jiménez, S. C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12:1-23.
- Kunte, L. y R. Šubik. 2004. La enciclopedia de los cactus. Editorial Libsa. Madrid, España.
- Larrea-Alcázar, A. 2007. Estudios citogenéticos en Cactaceae de Argentina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 4(3): 7-9.
- León de la Luz, J. L. y R. C. Domínguez. 1991. Evaluación de la reproducción por semilla de la pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) en Baja California Sur, México. *Acta Botánica Mexica*. 14:75-87.
- Manzano, E. 2008. Efecto de la luz y el agua en la germinación y fotosíntesis del cacto epífito *Rhipsalis baccifera* (J. S. Miller) Stearn del bosque nublado. Tesis de grado Maestro en Ciencias. Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Geología. Mizrahi, Y., A. Nerd and P. S. Nobel. 1997. Cacti as crops. *Horticultural Reviews*. 18: 291-320.
- Manzo, R. S. M. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis. Colegio de Postgraduados.

- Martínes-Vazquez, O. and A. Rublou. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorana. Journal of Horticulture Science. 64(1): 99-105.
- Masini, A. C. A., A. E. Rovere y G. I. Pirk. 2014. Requerimientos pregerminativos de *Maihuenia patagonica* y *Maihueniopsis darwinii*, cactáceas endémicas de Patagonia. Guyana Botanica. 71(2): 188-198.
- Mendez, E. 2007. Germination of *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose (Cactaceae). Journal of Arid Environments. 68: 678-682.
- Millanez, C. R. D., D. M. Oliveira and M. A. Moraes-Dallaqua. 2008. Semi-hypogeal germination in *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi (Fabaceae: Phaseoleae): seedling and sapling morphology. Brazilian Archives of Biology and Technology 51:353–359.
- Moreno, M. E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. Primera Edición.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 5:473-497.
- Naffter, R. 2002. Relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/ matK and trnL-trnF sequence. American Journal of Botany. 89: 312–326.
- Nava-Esparza, V. C. y L. L. Yáñez. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 29: 3-7.
- Nobel, S. P. 2011. Sabiduría del desierto, agaves y cactus: CO<sub>2</sub>, agua, cambio climático. Ed. Biblioteca Básica de Agricultura. Segunda Edición.
- Pérez, G. F. y J. M. V. Pita. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2112: 1-16.
- Pérez-González, S. B., A. Reyes-Olivas, E. García-Moya, A. Romero-Manzanares, J. R. García-Nava, G. A. Lugo-García y B. Sánchez-Soto. 2015. Almacenamiento de semillas y germinación de *Stenocereus thurberi*, una cactácea con viviparidad facultativa. Botanical Sciences. 93(2): 1-10.

- Pérez, M. B. E., E. A. Villalobos, E. R. Meza, L. Del R. R. Morones and H. J. L. S. Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 34: 131-135.
- Pierik, R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pinkava, D. J., M. A. Backer, B. D. Parfitt, M. W. Mohlenbrock and R. D. Worthington. 1985. Chromosome numbers in some cacti of North America V. *Systematic Botany*. 10 (4):471-483.
- Pinkava, D. J., B. D. Parfitt, M. A. Backer and R. D. Worthington. 1992. Chromosome numbers in some cacti of North America VI, with nomenclatural changes. *Madroño*. 39:98-113.
- Powell, A. M. and J. F. Weedon. 2001. Chromosome numbers in Chihuahuan Desert Cactaceae. III. Trans-Pecos Texas. *American Journal of Botany*. 88(3): 481-485.
- Quispe, N., G. Villegas, J. Uzquiano, B. Mamani, N. Villegas, V. Padilla, J. Quezada y E. García. 2010. Evaluación del estado poblacional y comportamiento germinativo *in situ* e *in vitro* de tres especies del género *Echinopsis* (Cactaceae) de la Provincia Murillo, La Paz-Bolivia. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 7(2): 8-10
- Ramirez-Malagon, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J. L. Berrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius and N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 43: 660-665.
- Retes-Pruneda, J. L., M. de L. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 81: 1-14.
- Rojas-Arechiga, M. and C. Vazquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review *Journal of Arid Environments*. 44: 85–104 at <http://www.idealibrary.com>. Fecha de consulta: 22-mayo-2015.
- Rosas-López, U. and M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and

*Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *Phyton*. pp 213-220.

Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo, A. J. Vlanecia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphanta retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 139-143.

Salas-Cruz, L. R., R. Foroughbackch-Pournabav, M. de L. Díaz-Jiménez, M. L. Cárdenas-Ávila y A. Flores-Valdés. 2011. Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 565-575.

Sánchez-Salas, J., J. Flores y E. Martínez-García. 2006. Efecto del tamaño de semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. *Interciencia*. 31: 371-375.

Sánchez-Soto, B., Á. Reyes-Olivas, E. García-Moya y T. Terrazas. 2010. Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del noroeste de México. *Interciencia*. 35(4): 299-305.

SEMARNAT, 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y de especificaciones para su inclusión, exclusión y cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación [en línea]. Consultado en [www.economia.gob.mx/work/normas/noms/2002/059ecol.pdf](http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/2002/059ecol.pdf) (revisado el 24 de noviembre de 2010).

Suárez R. R. S. 2011. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. Grado Maestra en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

Trópicos. 2013. <http://www.tropicos.org/Name/5104713?tab=specimens>. Fecha de consulta: 24-octubre-2013.

Wentworth, J. E. and J. R. Gornall. 1996. Cytogenetic evidence for autopolyploidy in *Parnasia palustris*. *New Phytologist*. 134:641-648.

# CAPÍTULO I. VARIACIÓN MORFOLÓGICA EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS

## RESUMEN

En México podemos encontrar alrededor de 913 especies de cactáceas de las cuales aproximadamente el 80% son endémicas. Las especies *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus pilosus* son endémicas para México, mientras *Lophophora williamsii* es localizada en México y Estados Unidos. Las especies *E. platyacanthus*, *F. pilosus*, *L. williamsii* podemos encontrarlas en la norma NOM-059-ECOL- 2010 en protección especial. Mientras que *E. grusonii* se encuentra en peligro de extinción. Existe poca información sobre las características morfológicas y físicas de las semillas y plántulas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue proporcionar información de las cuatro especies estudiadas que ayudarán a determinar las diferencias entre éstas y otras especies. El área y el perímetro del embrión y la semilla se midieron y se caracterizaron utilizando un análisis de imágenes. Los resultados muestran diferencias entre estas especies en el color, la estructura de la cubierta de la semilla, el área y el perímetro de la semilla y embriones. *E. platyacanthus* tiene el área y el perímetro del embrión más grande, el más alto peso volumétrico, y es la semilla más grande de estas especies.

Palabras clave: peso de mil semillas, peso volumétrico y testa.

## ABSTRACT

In Mexico there are approximately 913 species of Cactaceae, out of which around 80% are native. *Echinocactus grusonii*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus pilosus* are endemic to Mexico, while *Lophophora williamsii* is found in Mexico and the United States. *E. platyacanthus*, *F. pilosus*, *L. williamsii* are afforded special protection under regulation NOM-059-ECOL- 2010. Meanwhile, *E. grusonii* is an endangered species. Scarce information exists on the morphology and physical characteristics of seeds and seedling of *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* and *L. williamsii*. For this reason, the aim of this study was provide information on these issues in four species studied that will help determine differences between these and other species. The area and perimeter of the embryo and seed were measured and characterized using an analysis of images. Results show differences between these species in color, structure of the seed coat, area and perimeter of the seed and embryos. *E. platyacanthus* has the highest area and perimeter of the embryo, the highest volumetric weight, and the highest mean seed of these species.

Keywords: thousand seed weight, volumetric weight and head.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

En México podemos encontrar alrededor de 913 especies de la familia Cactaceae de las cuales aproximadamente el 80% son endémicas (Bravo, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Kunte y Šubík, 2004; Jiménez, 2011).

*E. platyacanthus* Link & Otto conocida como biznaga tonel grande, biznaga dulce o burra se distribuye en el centro y norte del país, a pesar de su amplia presencia, es una especie sobreexplotada, principalmente para la elaboración de dulce (acitrón) y como alimento para el ganado; *F. pilosus* Galeotti (Werderm) llamada biznaga barril de lima, biznaga cabuche o biznaga colorada, se distribuye en Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas, se vende como planta de ornato y las flores se consumen; *L. williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) J.M. Coult., nombre común peyote, se distribuye en México (Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, y Zacatecas) y EE. UU. (Texas y Nuevo Mexico), es usado en ceremonias religiosas y medicinal; por lo que están en protección especial; mientras *E. grusonii* Hildm., nombrada como biznaga tonel dorada y asiento de suegra, se distribuye desde Hidalgo hasta San Luis Potosí, se considera planta de ornato, está en peligro de extinción, en la NOM-059-ECOL-2010 (Arias *et al.*, 2005; Kunte y Šubík, 2004; SEMARNAT, 2010; Tropicos, 2011), son sobre recolectadas indiscriminadamente para el comercio de especies, como plantas de ornato, además, tres de ellas, son endémicas para México (Kunte y Šubík, 2004; Alanís y Velazco, 2008; Tropicos, 2011). Se encuentran en el apéndice II de CITES (CITES, 2009).

Las semillas son óvulos fecundados que mediante el proceso de germinación producen nuevas plantas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002). Según Engleman (1960) las características morfológicas de óvulos y semillas son útiles para la determinación de las relaciones taxonómicas.

Las semillas de las cactáceas se caracterizan por la diversidad de formas que varían de circulares, ovales, elíptica e incluso con formas irregulares, lo cual ha resultado de gran utilidad para distinguir géneros y especies, así poder obtener su clasificación, como es el caso de *Mammillaria* y *Coryphantha*. La primera tiene semilla más alargada, mientras que la segunda es más ancha (Barthlott y Hunt, 2000; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Powell y Weedin, 2004). Los embriones usualmente son curvados en las cactáceas, en subfamilia Opuntioideae tiene el embrión cotiledones gruesos y carnosos, mientras en Cactoideae tiene cotiledones reducidos (Barthlott y Hunt, 2000).

La testa de las semillas son de diversos colores variando desde negro al crema, pasando por tonalidades pardas, castañas o con tintes rojizos. La estructura de la testa donde puede ser lisa como en *Pereskia*, pero casi siempre esta provista de ornamentaciones que depende de la forma o accidentes de las membranas de las células de la capa externa, tales como engrosamiento o encogimientos, abombamientos o hundimientos que dan origen a estructuras reticuladas, corrugadas, faveoladas o tuberculadas. De estas formas y accidentes son características de determinados grupos taxonómicos (Bravo, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Powell y Weedin, 2004).

La variación en el tamaño de las semillas es un mecanismo importante en las plantas, puede afectar la germinación, la dispersión y probablemente puede afectar el establecimiento de las plántulas (Wulff, 1986). Generalmente, las semillas de cactáceas son pequeñas, de 1 a 2 mm de longitud, pero en las especies más primitivas, como *Nyctocereus*, llegan a medir medio centímetro (Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002; Powell y Weedin, 2004).

De acuerdo con Sánchez-Salas *et al.* (2006) y Ayala-Cordero (2004), el peso de la semilla está relacionada directamente con el tamaño. Asimismo, el peso afecta la germinación y las variaciones en el peso entre semillas de una misma especie reflejan capacidades biológicas diferentes (Flores y Jurado, 2011).

La morfología de las plántulas es importante en el estudio de la vegetación, o para comprender el ciclo de vida, los procesos de germinación y crecimiento de sus especies (Moreno, 1996). Las plántulas de *Ferocactus*, *Melocactus* y *Mammillaria* presentan cotiledones más pequeños, siendo toda la plántula globosa u ovoide (Bravo, 1978).

En general, es poca la información que existe sobre la morfología y características físicas de la semilla de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* y de las cactáceas. El estudio morfológico y físico de las semillas de estos taxones, proporcionará información de las semejanzas o diferencias estructurales-físicas entre ellas que permitan, el entendimiento, la comprensión de estos mediante el análisis de otros caracteres y el aporte que se pueda lograr en la realización de estudios filogenéticos y taxonómicos, al obtener características físicas favorables en las semillas son indicadores de calidad en la semilla. Por lo anterior, este estudio tiene como objetivo aportar información sobre la morfología y caracterización físicas de las semillas y plántulas estudiadas. Hipótesis: la caracterización de las semillas y plántulas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* permite establecer diferencias entre éstas y otra especies.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Material vegetal

La semilla de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* fue donada por la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala-Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y Centro Ecoturístico y de Educación Ambiental Sierra de Guadalupe. De 100 semillas completas fueron mezcladas y se tomaron 30 al azar. La descripción morfológica y la caracterización de las semillas y plántulas se realizaron en el laboratorio de semillas del programa de Genética del Colegio de Postgraduados.

### 1.2.2. Descripción morfológica externa e interna de la semilla y partes de las plántulas

El análisis de los caracteres externos e internos requirió una muestra de 30 semillas. Como caracteres morfológicos externos de la semilla se registraron forma, color, tamaño y estructura de la testa. Para identificar las estructuras internas se acondicionaron mediante remojo en agua destilada durante 48 h, para ablandar la testa. Las semillas fueron disectadas longitudinal y transversalmente. Se realizó la morfometría y la identificación de las partes que forman el embrión y las plántulas.

Para obtener las imágenes de las semillas y plántulas se usó un microscopio Tessovar de Carls Zeiss con cámara digital para microscopía PAXcam 3. Las imágenes digitales se editaron con el programa GIMP 2.8.4. La morfometría se hizo con el programa Image Tool versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002).

El largo, el área y el perímetro de la semilla y embrión fueron analizadas mediante un análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey) HSD ( $\alpha < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 1998).

### 1.2.3. Caracterización física de la semilla

Siguiendo los protocolos de ISTA (2005) y la FAO (2013) el peso de 1000 semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus* se estimó de la siguiente manera: ocho repeticiones de 100 semillas tomadas al azar y se calculó la media (mg), la varianza, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se tomó la decisión: Si el CV fuera igual o menor que 4.0, entonces se aceptaba y fue el valor utilizado para otras semillas que no son pastos, y por lo tanto se calculó el peso de 1000 semillas, el cual es equivalente a la media aritmética por diez.  $P1000S = \bar{X} \times 10$ .

Se evaluó el peso volumétrico (PV) de 800 semillas en *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, mientras en *L. williamsii* se utilizaron 250 semillas. Las semillas de las tres primeras especies se midieron con una probeta de 10 mL y con *L. williamsii* se utilizó una jeringa de 1 mL. Los pesos de las semillas se obtuvieron con una balanza analítica Ohaus®.

### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.3.1. Descripción morfológica externa e interna de la semilla y partes de la plántula.

Descripción morfológica externa e interna: *E. grusonii* presentó en la semilla una forma piriforme, testa de color castaño rojizo brillante; la estructura de la testa era lisa-reticulada (parecen escamas). Con la información que manejaron Barthlott y Hunt (2000) se pudo obtener que la semilla fue ampliamente ovalada, además de que la semilla tenía una configuración del micrópilo desunido y orientación oblicua. Las partes de la semilla fueron testa, hilo, micrópilo, embrión blanco curvo (cotiledones, radícula e hipocotilo), perispermo y cresta funicular (Figura 1.1). En las plántulas se identificaron cotiledones, meristemo apical, lanosidad, hipocotilo globoso, raíz primaria y las raíces secundarias. Las etapas de la emergencia de la plántula de la semilla se muestran en la Figura 1.1.

Los resultados obtenidos para tamaño de la semilla y embrión se muestran en los Cuadros 1.1 y 1.2.

La semilla de *E. platyacanthus* es piriforme de color negro brillante, la estructura de la testa lisa-reticulada (parecen escamas). Barthlott y Hunt (2000) mencionan que la semilla es ampliamente ovalada, el color va de negro a café brillante, además de que tiene la semilla una configuración del micrópilo desunido y orientación oblicua. En las semillas se identificaron la testa, hilo, micrópilo, embrión blanco curvo (cotiledones, radícula e hipocotilo), perispermo y cresta funicular. En las plántulas se reconocieron los cotiledones, meristemo apical, lanosidad (localizada en el ápice de la plántula), hipocotilo globoso, raíz primaria y las raíces secundarias. La Figura 1.2 muestra las etapas de aparición de la plántula de la semilla. Esta especie tenía raicillas en la raíz principal, una característica que García de Almeida *et al.* (2009) denominó como tricomas para *Cereus hildmannianus*.

El tamaño de las semillas y los embriones de *E. platyacanthus* fueron más grandes (semilla: longitud 2.44, área 3.09 y perímetro 7.11; para embrión: longitud 1.98, área 1.33 y perímetro 5.53 mm) que de las *E. grusonii*, *F. pilosus* y *L. williamsii* (Cuadro 1.1 y 1.2).

La semilla de *F. pilosus* fue piriforme, de color castaño oscuro. La testa rugosa faveolada (pequeños hundimientos). Las partes de la semilla fueron testa, hilo, micrópilo, embrión blanco curvo (cotiledones, radícula e hipocotilo), perispermo y cresta funicular. Las plántulas tenían cotiledones, meristemo apical, lanosidad, hipocotílo globoso, raíz primaria y las raíces secundarias. Las etapas de la emergencia de la plántula de la semilla se muestran en la Figura 1.3.

Los resultados obtenidos para tamaño de la semilla y el embrión se muestran en los cuadros 1.1 y 1.2.

La semilla de *L. williamsii* fue piriforme, testa de color castaño oscuro, como lo reportó Bravo (1978), pero Snicer (2009) reportó que la testa era negra. La testa rugosa faveolada-verrucosa. Barthlott y Hunt (2000) indicaron que la semilla era ampliamente ovalada, las gamas de color iban de negro a café mate (sin brillo), además de que la semilla tenía una configuración del micrópilo desunido y orientación basal. Las partes de la semilla fueron testa, hilo, micrópilo, embrión blanco ovoide (cotiledones, radícula e hipocotilo) y cresta funicular. Las plántulas con cotiledones, meristemo apical, lanosidad, hipocotílo globoso, raíz primaria y las raíces secundarias. Las etapas de la emergencia de la plántula de la semilla se muestran en la Figura 1.4. El tamaño de la semilla y el embrión fueron de menor tamaño en comparación con las otras especies evaluadas (Cuadro 1.1 y 1.2).

Bregman y Bouman (1983) mencionan que en general las semillas de las cactáceas se pueden encontrar variaciones entre ellas. Sin embargo, Barthlott y Hunt (2000) y Engleman (1960) observaron que las partes de las semillas en las especies utilizadas en sus trabajos fueron las mismas reportadas en las cuatro

especies de este trabajo (a excepción de la cresta funicular no mencionada por Barthlott y Hunt (2000)).

Con respecto a la forma de la semilla de *E. platyacanthus* y *L. williamsii* (Elizondo *et al.*, 1994; Rojas-Arechiga y Vazquez-Yanes, 2000) tenía una forma piriforme, coincidiendo con nuestra información para las cuatro especies (Figura 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4).

La testa se formó por la cutícula corrugada o lisa (depende de la especie), y dos tegumentos (Figuras 1.1, 1.2, 1.3, y 1.4 estaban juntos): el tegumento interno es una membrana delgada alrededor del embrión en el final del micropilo, y el tegumento externo (exotesta) es una pared gruesa con células taniníferas. Las mismas estructuras se presentan en la Cactaceae según reportaron Bregman y Bouman (1983).

El color de la cubierta de la semilla de las cuatro especies de este estudio fue diferente y existen posibles explicaciones. Según Bravo (1978), fue debido a la presencia de taninos en la testa de la semilla responsables para el grosor y color, incluyendo tonos más oscuros. Además, el cambio de color fue posiblemente inducida por la oxidación de los taninos (Bravo, 1978), así como había taninos que podrían contener flavonoides responsables de los colores rosa, escarlata, rojo, malva, violeta y azul en las plantas (Bravo, 1978; Latorre y Calderón, 1998; Peña, 2006) (Figuras 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4). Sin embargo, Martínez y Bárcenas (2008) informaron que los colores de la testa de la semilla en *Stenocactus* variaron de claro a oscuro (negro), y pensaron que era debido a la ausencia o presencia de taninos.

Las semillas de las cuatro cactáceas de este estudio presentaron algunas características en común como que el embrión ocupó toda la cavidad de la semilla, presencia de las cubiertas protectoras y, a veces, restos de sustancias nutritivas como el perispermo un tejido de almacenamiento formado a expensas de la nucela y se forma durante el desarrollo del embrión. En *L. williamsii* (Figura 1.4) fue

reabsorbido por el embrión como sucede generalmente en las semillas de otras especies (Bregman y Bouman, 1983) (Figure 1.4). Sin embargo, el perispermos no se adsorbió y estuvo cerca del micrópilo en las especies *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* (Figura 1.1, 1.2, y 1.3). Varios autores reportan que el tamaño de los cotiledones depende del género (Bravo, 1978; Bregman y Bouman, 1983; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002) por lo que entre más grande sean los cotiledones son especies más primitivas (Bravo 1978). En este estudio, los cotiledones fueron pequeños en todas especies.

La emergencia de la radícula, en las cuatro especies de este estudio, presentó el tipo tres que es la más común en la familia de las Cactaceae y consiste según Bregman y Bouman (1983) que antes de que aparezca el embrión, el opérculo se hace a un lado de la cresta funicular. Además, al emerger la radícula de la semilla en las especies *E. grusonii*, *F. pilosus* y *L. williamsii* se observaron raicillas que fueron más delgadas y pequeñas que en *E. platyacanthus*.

El hipocotilo de las cuatro especies fue verde con moteados blancos muy notorios en *L. williamsii*.

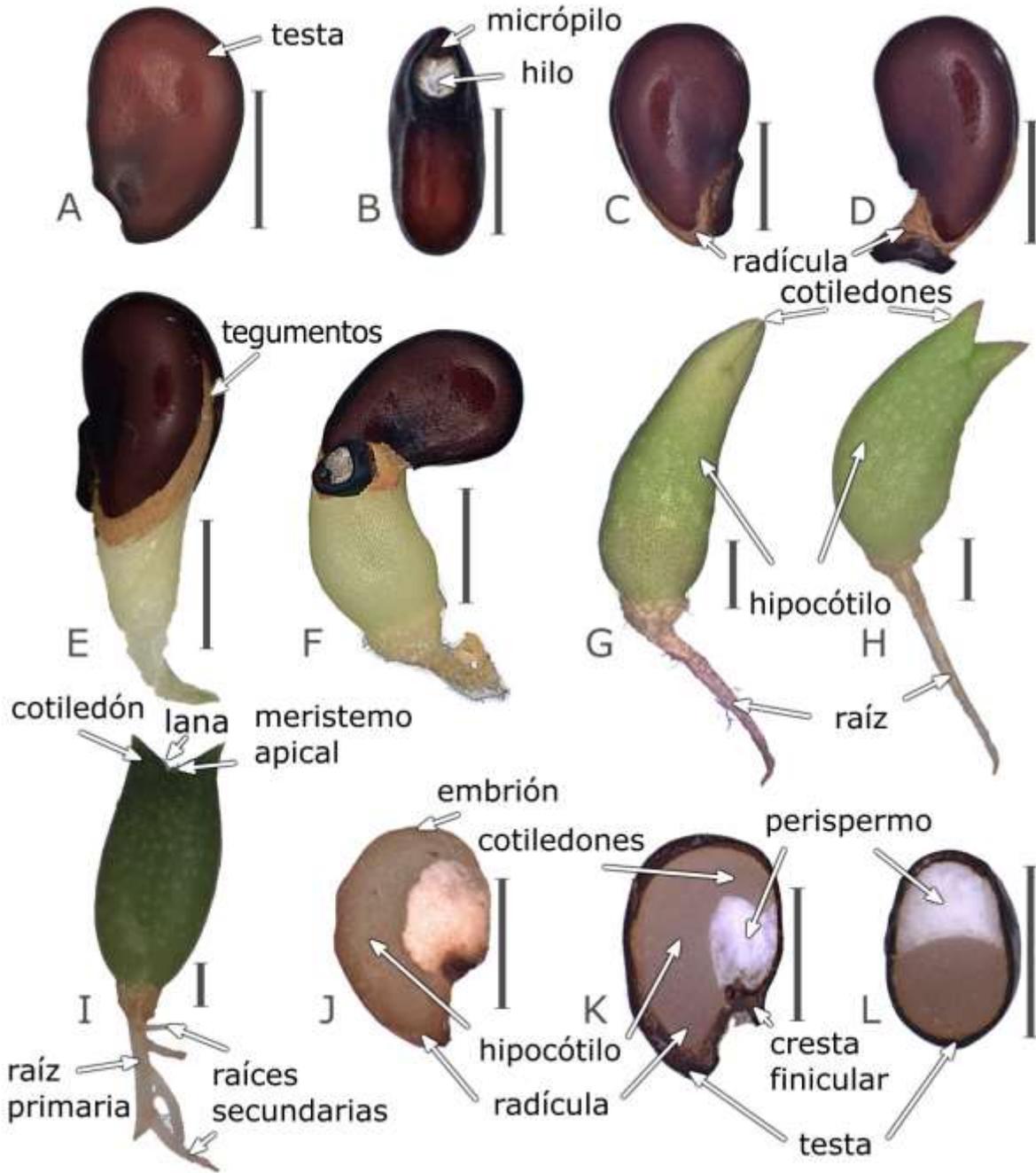
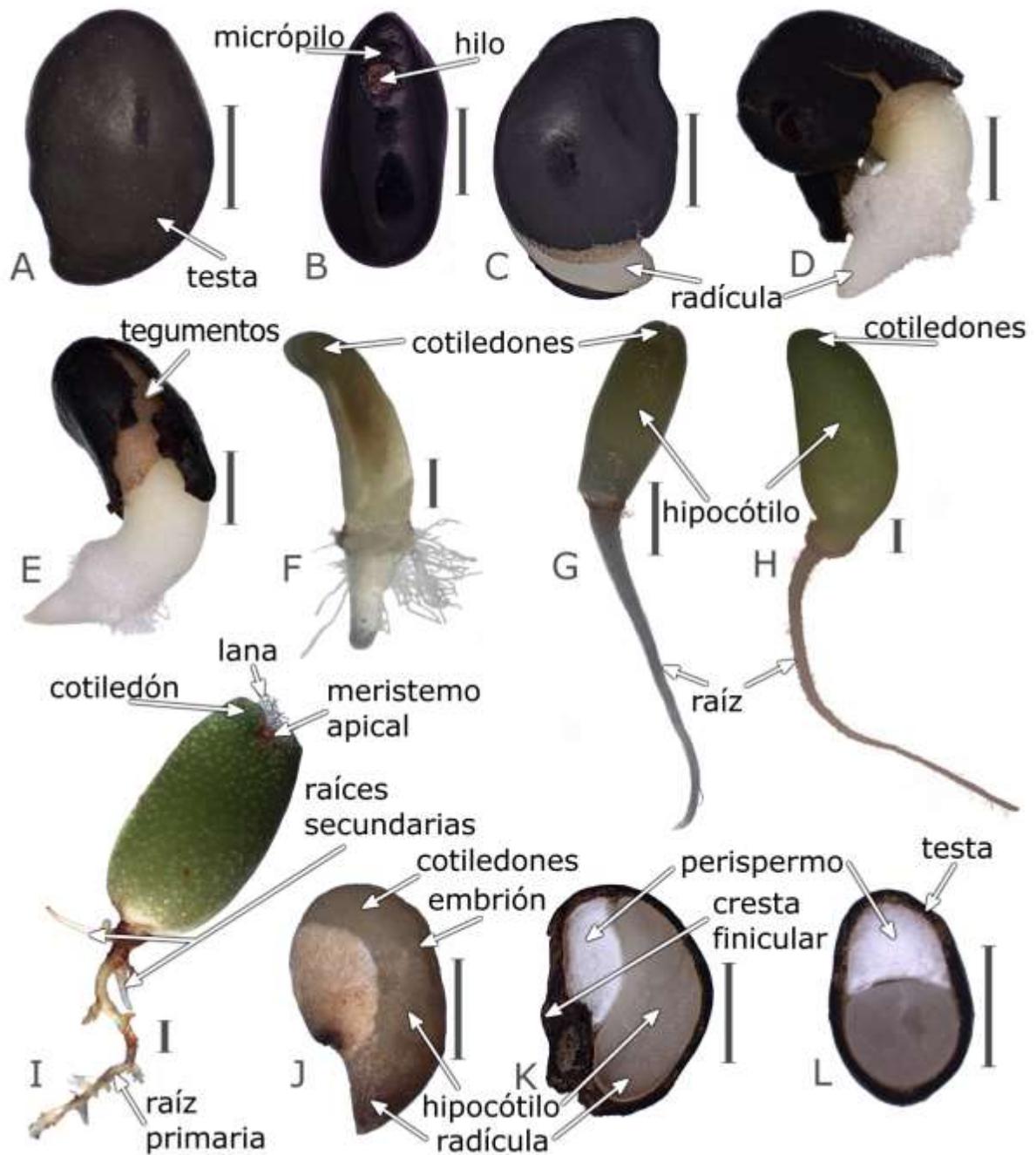
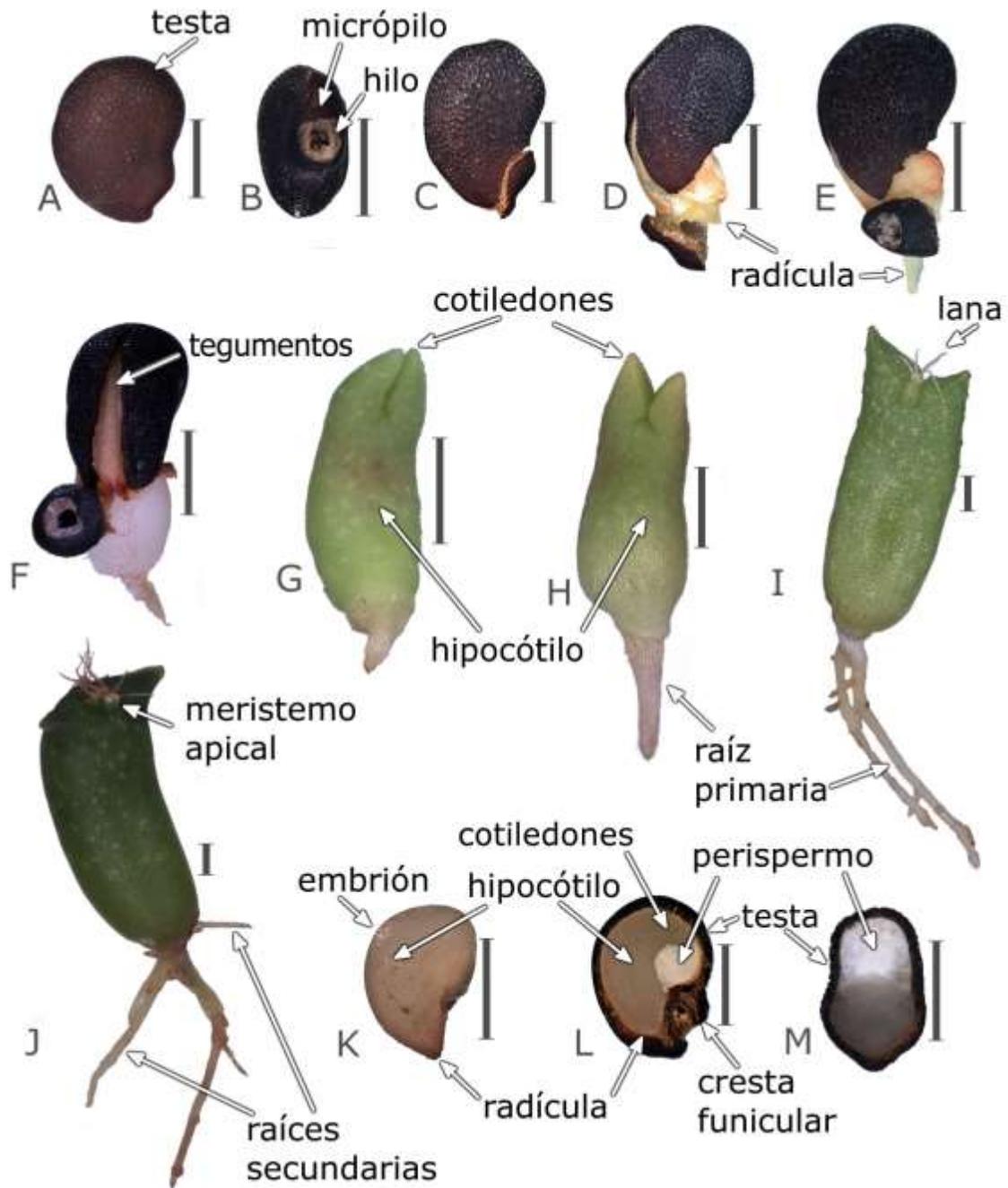


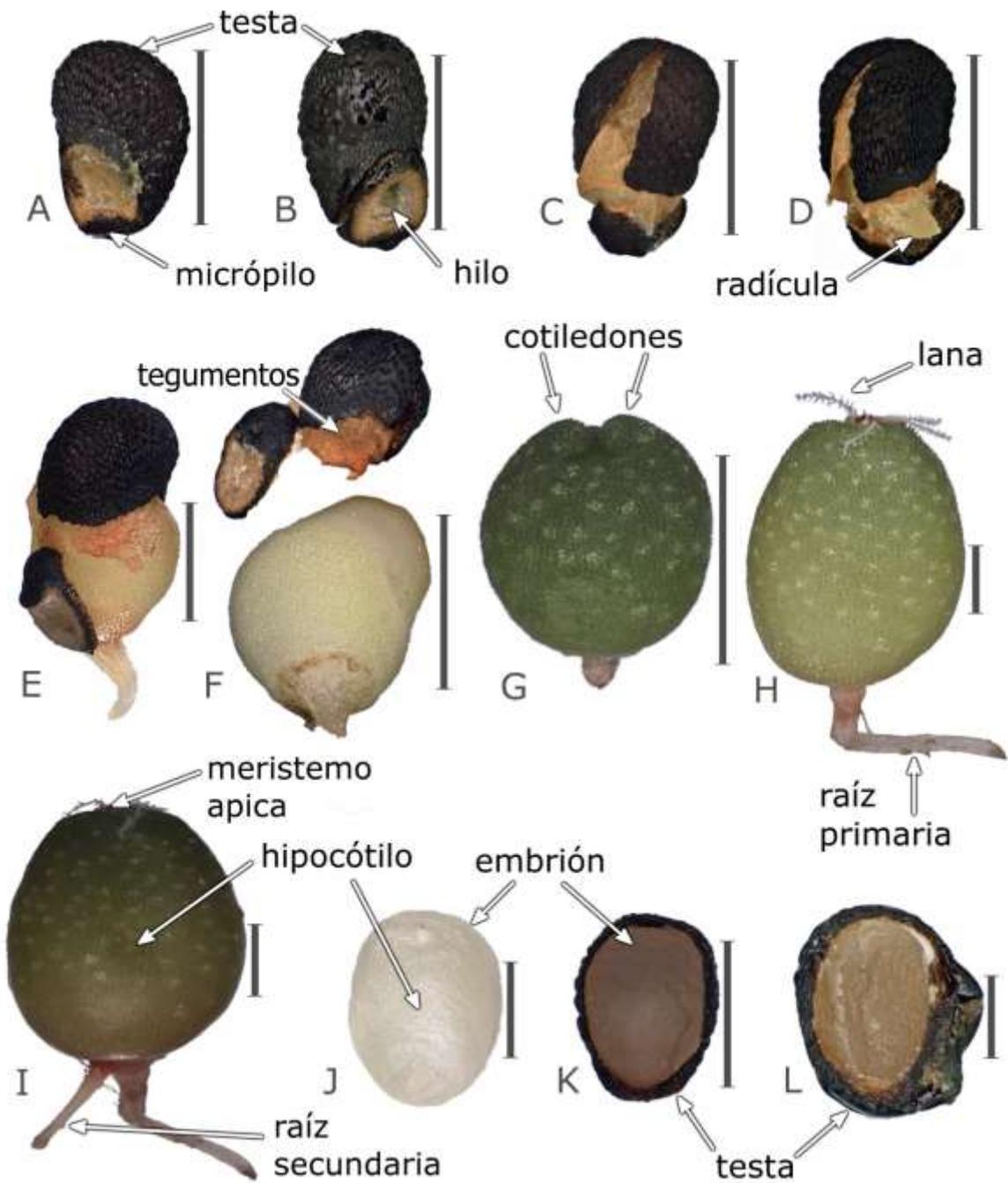
Figura 1.1. Morfología de la semilla y plántula de *E. grusonii*. La escala es de 1 mm.



**Figura 1.2.** Morfología de la semilla y plántula de *E. platyacanthus*. En la letra F se pueden observar las raicillas en la raíz principal. La escala está a 1 mm.



**Figura 1.3.** Morfología de la semilla y plántula de *F. pilosus*. La escala es de 1 mm.



**Figura 1.4.** Morfología de la semilla y plántula de *L. williamsii*. La escala está a 1 mm.

La longitud, el área y el perímetro de los embriones en las cuatro especies fueron diferentes. El perímetro en la semilla de *E. grusonii* y *L. williamsii* fue similar, y diferentes estadísticamente en el resto de los valores (Cuadro 1.1 y 1.3).

Las cuatro especies fueron según Barthlott y Hunt (2000), en términos de su longitud: *E. platyacanthus* semillas grandes, *E. grusonii* tenía semillas de tamaño mediano, *F. pilosus* también tenía semillas de tamaño mediano y *L. williamsii* semillas pequeñas.

**Cuadro 1.1.** Prueba de medias de Tukey en los embriones de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.

Especies	Variables		
	Longitud (mm)	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	1.98 a	1.32923 a	5.5346 a
<i>Ferocactus pilosus</i>	1.53 b	1.02692 b	4.8554 b
<i>Echinocactus grusonii</i>	1.48 c	0.81692 c	4.2723 c
<i>Lophophora williamsii</i>	0.96 d	0.52846 d	2.7592 d
DMS*	0.1326	0.1337	0.3457

\*Diferencia Mínima Significativa

**Cuadro 1.2.** Desviación estándar en los embriones de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.

Especies	Desviación estándar		
	Longitud (mm)	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	0.13	0.10	0.16
<i>Ferocactus pilosus</i>	0.09	0.13	0.32
<i>Echinocactus grusonii</i>	0.16	0.15	0.45
<i>Lophophora williamsii</i>	0.12	0.12	0.32

La prueba de Tukey en los embriones encontró diferencias significativas para todas las especies en las variables evaluadas (Cuadro 1.1). Por otro lado, la desviación estándar fue mayor en el perímetro en comparación con el área y la longitud en las cuatro especies de este trabajo (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.3.** Prueba de medias de Tukey en semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.

Especies	Variable					
	Longitud (mm)		Área (mm <sup>2</sup> )		Perímetro (mm)	
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	2.44	a	3.09091	a	7.1100	a
<i>Ferocactus pilosus</i>	1.79	b	1.49364	b	4.8327	b
<i>Echinocactus grusonii</i>	1.63	c	1.24182	c	4.0982	c
<i>Lophophora williamsii</i>	1.34	d	1.01455	d	3.9600	c
DMS*	0.1540		0.219		0.7276	

\*Diferencia Mínima Significativa

**Cuadro 1.4.** Desviación estándar en semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.

Especies	Desviación estándar			
	Variables	Longitud (mm)	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)
<i>Echinocactus platyacanthus</i>		0.15	0.36	0.72
<i>Ferocactus pilosus</i>		0.14	0.09	0.17
<i>Echinocactus grusonii</i>		0.13	0.06	0.15
<i>Lophophora williamsii</i>		0.11	0.09	0.22

Para la prueba de medias de Tukey, en las semillas se encontraron diferencias significativas para todas las especies en las variables evaluadas (Cuadro 1.3). La desviación estándar en la longitud no tuvo variación. En la variable área *E. platyacanthus* fue mayor que en las otras especies. Finalmente, en el perímetro tuvo mayor variación en las cuatro especies (Cuadro 1.4).

### 1.3.2. Caracterización física de la semilla

#### 1.3.2.1. Peso de 1000 semillas

El peso de 1000 semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus* mostró que el coeficiente de variación fue menor de 4.0 (Cuadro 1.5). Por lo tanto, el resultado de la prueba se aceptó según el protocolo de ISTA (2005) y la FAO (2013). *E. platyacanthus* tuvo el mayor peso de las semillas al compararlo con *E. grusonii* y *F. pilosus* (Cuadro 1.5). Suárez (2011) estimó el peso de 1000 semillas en *Selenicereus megalanthus* e *Hylocereus polyrhizus*. En *Selenicereus megalanthus* encontró 7.7 g donde el valor fue superior a las especies de este trabajo. Mientras

que para la especie *Hylocereus polyrhizus* obtuvo 2.4 g un valor menor a *E. platyacanthus* y mayor que *E. grusonii* y *F. pilosus* (Cuadro 1.5). Con *L. williamsii* no se realizó este cálculo al no tener el número de semillas necesarias.

**Cuadro 1.5.** Análisis de varianza para el peso de 1000 semillas de las especies *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*.

Especie	<i>E. grusonii</i>	<i>E. platyacanthus</i>	<i>F. pilosus</i>
Varianza	2.36	34.34	9.48
Desviación estándar	1.54	5.86	3.08
Coefficiente de variación (CV) *	1.71	1.76	2.28
Media (mg)	89.60	333.49	135.10
P1000S (g)	0.90	3.34	1.35

\* Si el coeficiente de variación era menor a 4.0 (el valor para otras semillas) los resultados obtenidos se aceptaban.

### 1.3.2.2. Peso volumétrico

Los resultados para el peso volumétrico mostraron que *E. platyacanthus* y *L. williamsii* tuvieron los valores más altos y más bajos, respectivamente. Los valores para *E. grusonii* y *F. pilosus* fueron similares (Tabla 1.6). Prieto-García et al. (2006) obtuvieron en tres *Opuntia* spp. un promedio de 55.97, 64.22 y 65.29 Kg hL<sup>-1</sup>. Se observó que *E. platyacanthus* tenía la semilla con mayor peso volumétrico en comparación con *Opuntia* spp. Esto podría ser debido a la metodología utilizada por Prieto-García et al. (2006), que varió un poco en relación con nuestro método o porque las semillas de *E. platyacanthus* eran semillas más sólidas y pesadas. Mientras tanto, las otras especies de este estudio tenían un peso volumétrico menor en comparación con *Opuntia* spp.

**Cuadro 1.6.** Peso volumétrico de las semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii*.

Especies	<i>E. grusonii</i>	<i>E. platyacanthus</i>	<i>F. pilosus</i>	<i>L. williamsii</i>
Peso (g)	0.651	2.680	1.088	0.222
Volumen (mL)	1.2	3.2	2.0	0.44
Kg hL <sup>-1</sup>	54.25	83.75	54.40	50.45

En los cactus no hay un valor estándar para las semillas de peso y P1000 volumétricos como otras especies (maíz y frijoles) que son indicadores de la calidad de la semilla como fue establecido por ISTA (2005). Es por esta razón, que los valores encontrados de estas dos variables son la primera contribución de la especie en este estudio con el fin de utilizar este conocimiento para obtener parámetros de calidad de las semillas en los cactus. Además, la descripción de las características morfológicas establecidas por otros autores como Barthlott y Hunt (2000) y Bravo (1978) complementa el conocimiento con respecto a las cuatro especies de este trabajo y podría servir como características de clasificación.

## 1.4. CONCLUSIONES

Las características morfológicas de la semilla-plántula fueron similares para *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*; con la excepción de *L. williamsii* que no tenía perispermo y el embrión abarcaba todo el espacio en la semilla.

La semilla fue piriforme para las cuatro especies.

Las cuatro especies tienen diferencias en el color, estructura de la testa y tamaño de la semilla-embrión (longitud, área y perímetro).

Las características morfológicas en estas especies se pueden utilizar como información para la clasificación de estas especies.

*Echinocactus* constituye un grupo heterogéneo debido a que las semillas de las dos especies variaron significativamente en su tamaño, color de la testa y forma de los cotiledones.

Las especies utilizadas variaron en peso volumétrico y peso de 1000 semillas.

El peso de mil semillas y el peso volumétrico son métodos seguros que podrán determinar la calidad física de la semilla y así poder obtener pruebas confiables y estandarizadas, para lograr resultados uniformes y repetibles.

## 1.5. LITERATURA CITADA

- Alanís, F. G. J y C. G. M. Velazco. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) 11:5-11.
- Arias, S., U. Guzmán, C. M. Mandujano, G. M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I (Una comparación entre los listados). Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 50 (4): 101-125.
- Ayala-Cordero, G., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. Interciencia. 29: 692-697.
- Barthlott, W. and D. Hunt. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. Remous Ld., Richmond.
- Basra, A. S. 2006. Handbook of Seed Science and Technology. Published by Food Products Press. Binghamton, New York, N. Y.
- Bravo, H. H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. 2<sup>da</sup>. ed. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 2002. El interesante mundo de las cactáceas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Bregman, R. and F. Bouman. 1983. Seed Germination in Cactaceae. Botanical Journal of the Linnean Society. 86:357-374.
- CITES. 2009. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/resources/especies.html>. Fecha de consulta 25 de septiembre de 2009.
- Engleman, M. E. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. American Journal of Botany. 47: 460-467.

- Elizondo, J., J. Valdés, S. Arias y S. L. Hatch. 1994. Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cacteeae (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 39: 59-67.
- Flores, J. y E. Jurado. 2011. Germinación en cinco especies de cactáceas en categoría de riesgo en el desierto chihuahuense. *Revista Mexicana en Ciencia Forestal*. 2: 59-70.
- García de Almeida, O. J., L. Antonio de Souza y M. Sebastião. I. 2009. Morfoanatomía da plântula de indivíduos somaclones de *Cereus hildman-nianus* Schumann (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 6: 29-35.
- Haridasan, V. K. and P. K. Mukherjee. 1988. Seed surface features of some members of the Indian Campanulaceae. *Phytomorphology*. 37(4): 277-285.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. Handbook on tetrazolium testing. Zurich. Switzerland.
- Jiménez, S. C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12:1:23.
- Kelly, A. F. 1988. Seed production of agricultural crops. Longman Scientific and Technical-John Wiley and Sons. Inc. New York, USA.
- Kessler R and W. Stuppy. 2014. *Seed: time capsules of life*. Published for Royal Botanic Garden and Papadakis Publisher. Great Britain.
- Kunte L. y R. Šubik. 2004. La enciclopedia de los cactus. Editorial Libsa. Madrid, España.
- Latorre, R. S. J. y A. C. A. Calderón. 1998. Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos (*Sorghum bicolor* (L) moench) cultivados en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bucaramanga, Colombia.
- Martínez, P. M. y T. R. Bárcenas. 2008. Estudio morfológico de semillas de *Stenocatus* de la colección de la Universidad Autónoma de Querétaro. Memorias. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Moreno, C. P. 1996. *Vida y obra de granos y semillas*. La ciencia/146 para todos.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO). <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD232S/ad232s13.htm>. Fecha de consulta: 27-febrero-2013.
- Peña, N. A. 2006. En la calidad de uvas y vinos los taninos y su importancia. Vendimia. Informe Enológico. Chile.
- Powell, A. M. and J. F. Weedon. 2004. Cacti of the trans-pectos and adjacent areas. Ed. Texas Tech University Press. Lubock, Texas. (<http://books.google.com.mx/books?id=tix9HeLUOt4C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>). Fecha de consulta: 14-abril-2013.
- Prieto-García, F., S. Filardo-Kerstup, E. Pérez-Cruz, R. Beltrán-Hernández, A. Román-Gutiérrez y M. Méndez-Marzo. 2006. Caracterización física y química de semillas de opuntias (*Opuntia spp.*) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. Bioagro. 18: 163-169.
- Rojas-Arechiga M. and C. Vazquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments. 44: 85–104.
- Sánchez-Salas, J., Flores J, Martínez-García E. 2006. Efecto del tamaño de semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire. (CACTACEAE), especie amenazada de extinción. Interciencia. 5:1-12.
- SAS Institute. 1998. *User's guide: statistics*. 7-0<sup>th</sup>. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, febrero del 2011.
- Snicer, J., J. Bohata and V. Mišák. 2009. The littlest Lophophora. Cactus and succulent Journal. 81:295-300.
- Suárez, R. R. S. 2011. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
- Trópicos. 2011. <http://www.tropicos.org/Name/5104713?tab=specimens>. Fecha citada: 24-octubre-2013.

Wilcox, D., B. Dove, D. Mc David, D. Greer. 2002. UTHSCSA image tool for windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.

Wulff, D. R. 1986. Seed size variation in *Desmodium paniculatum*. II. Effects on seedling growth and physiological performance. *Journal of Ecology*. 74: 99-114.

## CAPÍTULO II. VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE CUATRO CACTÁCEAS EN PROTECCIÓN ESPECIAL Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

### RESUMEN

*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm), *Echinocactus grusonii* Hildm y *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) J.M. Coult., son especies en riesgo. La viabilidad y la germinación de las semillas son esenciales para conocer y conservar estas especies. Se evaluó la viabilidad de las semillas. Se evaluaron en diferentes sustratos e *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS) la germinación, el índice de velocidad germinativa (IVG) y su influencia en el vigor de las plántulas. La especie *E. platyacanthus* mostró el mayor porcentaje de viabilidad (87.5%) con tetrazolio a 0.1%. Las semillas de las cuatro especies germinaron más rápido en los sustratos y fueron mejores que en el medio MS. El valor más alto de germinación se observó en *F. pilosus* con tierra de monte-tezontle sin escarificación (98%) y con un IVG de 4.03 semillas por día. *E. grusonii* inmerso por 1 min, en ácido sulfúrico como escarificador, fue el mejor en tierra de monte-tezontle y en arena con 100% de germinación y con un IVG de 8.3 y 8.1 semillas por día, respectivamente. Se encontró relación entre la viabilidad y la germinación. Las concentraciones altas de tetrazolio no favorecieron la tinción de los embriones.

Palabras clave: tetrazolio, índice de velocidad germinativa y vigor.

## ABSTRACT

*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm), *Echinocactus grusonii* Hildm and *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) JM Coult., are species at risk. Viability and germination of seeds are essential to learn and preserve these species. The viability of the seeds was evaluated. Germination, germination speed index (IVG) and their influence on seedling vigor was evaluated on different substrates and in vitro on Murashige and Skoog (MS). *E. platyacanthus* species showed the highest percentage of viability (87.5%) 0.1% tetrazolium. The seeds germinated faster substrates in MS medium. The highest value of germination was observed in *F. pilosus* with forest soil-tezontle without scarification (98%) and an IVG of 4.03 seeds per day. *E. grusonii* immersed for 1 min in sulfuric acid as a scaler, it was the best-tezontle forest soil and sand with 100% germination and IVG with 8.3 and 8.1 seeds per day, respectively. Relationship between the viability and germination was found. High concentrations not favored tetrazolium staining embryos and treatments were best substrates.

Keywords: tetrazolium, germination speed index and vigor.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

En México las zonas desérticas y semidesérticas representadas por los desiertos de Sonora y Chihuahua, las Selvas Bajas Caducifolias y depresión de Balsas, contienen gran diversidad de cactáceas. Entre las zonas con mayor diversidad en la parte centro, destacan el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Barranca de Metztitlán. En estas zonas hay alrededor del 60% de las especies para México. Sin embargo, es alarmante el número de estas especies de cactáceas que se encuentran en alguna categoría de riesgo de extinción (Bravo, 1978; Bravo y Scheinvar, 2002; Kunte y Šubik, 2004; Arias *et al.*, 2005; Jiménez, 2011).

....Las especies *E. platyacanthus*, *F. pilosus*, *L. williamsii* y *E. grusonii* se distribuyen en el centro y norte del país. A pesar de su amplia distribución son especies sobreexplotadas y recolectadas indiscriminadamente, principalmente como ornato, alimento para el hombre y ganado; mientras *L. williamsii* es usado en ceremonias religiosas y medicina. Estas condiciones de uso han colocado a *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* en la lista de especies con protección especial y a *E. grusonii* en peligro de extinción de acuerdo a la norma NOM-059-ECOL-2010, (Kunte y Šubik, 2004; Arias *et al.*, 2005; SEMARNAT, 2010; Trópicos, 2011). Los *Echinocactus* y el *Ferocactus*, son endémicas de México (Kunte y Šubik, 2004; Alanis-Flores y Velasco-Macías, 2008; Trópicos, 2011). Las cuatro especies se encuentran en el apéndice II de CITES (2009) y *E. grusonii* está en peligro crítico con base al catálogo de la UICN (CONABIO, 2014).

La propagación de plantas por medio de semillas es de gran importancia para mantener la diversidad genética de las especies, contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa (Amador-Alfárez *et al.*, 2013), por lo que es necesaria la implementación de mecanismos de propagación eficientes para la conservación de la diversidad de sus poblaciones.

La semilla es la estructura vegetal más importante en el ciclo de vida de las plantas superiores ya que permite perpetuar la especie y junto a la latencia y la germinación son mecanismos naturales para asegurarla. La semilla está a menudo bien equipada para sobrevivir largos periodos de condiciones desfavorables, y el embrión está protegido por una o varias capas de tegumentos (Vozzo, 2002). Varias cactáceas presentan estas capas por lo que se han usado tratamientos para romperlas; por ejemplo, la inmersión en ácido para simular el paso de las semillas por el tracto digestivo de las aves, la aplicación de reguladores de crecimiento como las giberelinas y el lavado de la semilla.

El tiempo durante el cual las semillas puedan permanecer viables es muy variable y depende, en gran parte, de las condiciones de almacenamiento. La viabilidad se puede conservar adecuadamente bajo condiciones controladas para reducir la actividad metabólica del embrión sin embargo pueden influir otros factores (los ambientales y los genéticos) en ella, no obstante, la viabilidad tiende a disminuir con el tiempo (Cota, 1985). La viabilidad es importante, ya que permite conocer el rendimiento potencial de las semillas y así relacionarlos con el cultivo de las cactáceas a gran escala, familia que tiene gran auge a nivel mundial (Cota, 1985). La viabilidad expresa el potencial de una semilla para germinar por lo que este tipo de pruebas están enfocadas en cultivos de importancia económica como el trigo, maíz, frijol, cebolla, etc. (ISTA, 2005), pero poco se ha hecho con otras especies como las cactáceas, por lo que existe una necesidad de ampliar el conocimiento que se tiene al respecto.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar el protocolo de desinfección, evaluar la viabilidad, germinación y su índice de velocidad germinativa de las semillas de las cuatro especies. Se espera obtener semillas libres de patógenos, las concentraciones elevadas de cloruro de tetrazolio reducen el tiempo de tinción en las semillas y la técnica *in vitro* es una herramienta que favorece el mayor porcentaje de germinación.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Material vegetal

Las semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* fue proporcionada por la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala-Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Centro Ecoturístico y de Educación Ambiental Sierra de Guadalupe.

### 2.2.2. Prueba de viabilidad

Se utilizaron 40 semillas por especie y se pre-acondicionaron mediante remojo en agua destilada durante 48 h. Las semillas fueron disectadas longitudinalmente y los embriones tratados con tetrazolio (2, 3, 5-cloruro de trifeníl tetrazolio) (Sigma®) al 0.1, 0.5 y 1.0%, pH de 7.0 y a una temperatura de 40°C (León de la Luz y Domínguez, 1991; ISTA, 2005; Suarez, 2011). La concentración de 0.1% se aplicó en las cuatro especies, mientras que 0.5 y 1.0% se utilizó para los embriones de los dos *Echinocactus* y el *Ferocactus*. Para obtener las imágenes de los embriones se usó un microscopio Tessoar de Carls Zeiss con cámara digital para microscopía PAXcam 3. Las imágenes digitales se editaron con el programa GIMP 2.8.4 (Wilcox, 2002).

### 2.2.3. Germinación

Las semillas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *L. williamsii* tenían una edad de aproximadamente 2 años, mientras que las de *F. pilosus* tenía 3 años, al tiempo de la siembra. La desinfección de la semilla para la siembra *in vitro* se realizó al colocar la semilla en N-(triclorometilitio)ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida (captan) y bactrimicin (estreptomycin + oxitetraciclina) a 2 g L<sup>-1</sup> en agua destilada por 2 h, luego se puso en agua jabonosa por 40 min., en seguida se pasaron en alcohol al

70% por 1 min., posteriormente se colocaron en cloro comercial (6% de hipoclorito de sodio) al 20% por 20 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los sustratos se esterilizaron con cloro comercial al 15% por 20 min y tres enjuagues con agua destilada.

Se prepararon seis tratamientos, los tres primeros fueron *in vitro* en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100, 50 y 0%, complementado con glicina (2.0 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100.0 mg L<sup>-1</sup>), tiamina HCl (0.4 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (2.0 mg L<sup>-1</sup>) y sacarosa 30.0 g L<sup>-1</sup>. El pH fue de 5.7-5.8. Los tratamientos se vertieron en frascos a 25 mL con tapas de plástico y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min. Los otros tres tratamientos fueron *ex vitro* utilizando sustratos: arena (A), compost con tezontle (2:1/C-T) y tierra de monte con tezontle (2:1/TM-T) previamente esterilizados. Los tres sustratos se colocaron en cajas de plástico con tapa transparentes y en la parte superior se hicieron pequeños orificios. Las semillas de *Echinocactus* se escarificaron con ácido sulfúrico al 100% durante 0, 1 y 2 min. Los frascos y las cajas de los tratamientos se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 25°C± 2, con 16 h de luz y 8 h de obscuridad y a una intensidad luminosa de 62.5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. El último recuento en los tratamientos con MS fue a los 40 d y con los sustratos fue a los 25 d (al ser más rápida su germinación).

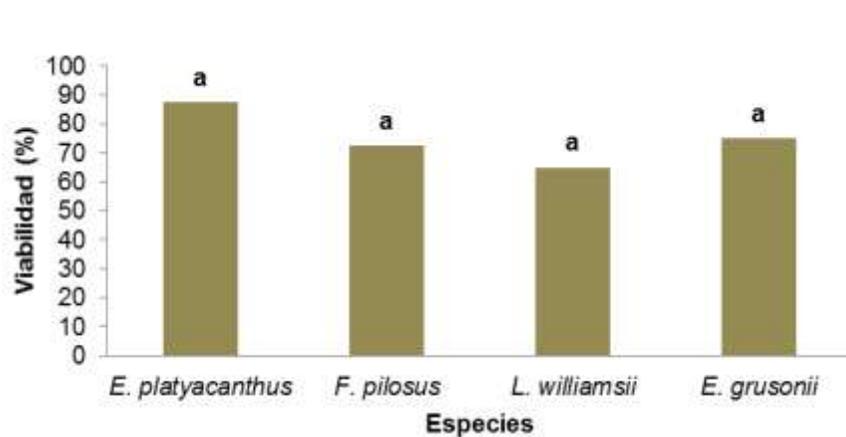
Se calculó el Índice de Velocidad de Germinación (IVG) mediante la siguiente expresión:  $IVG = \sum(n_i/t_i)$ ;  $n_i$ =número de semillas germinadas en el  $i$ -ésimo día y  $t_i$ =tiempo de días, para la germinación en el  $i$ -ésimo día.

Se usaron diseños completamente al azar y factorial completamente al azar y para todas las especies se consideraron cinco repeticiones con diez semillas cada una. El análisis se hizo mediante ANOVA y pruebas de medias de Tukey HSD ( $\alpha < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS, 1998).

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Viabilidad

La prueba de Tukey no mostró diferencias significativas entre las especies a la concentración de 0.1% de tetrazolio (Figura 2.1).

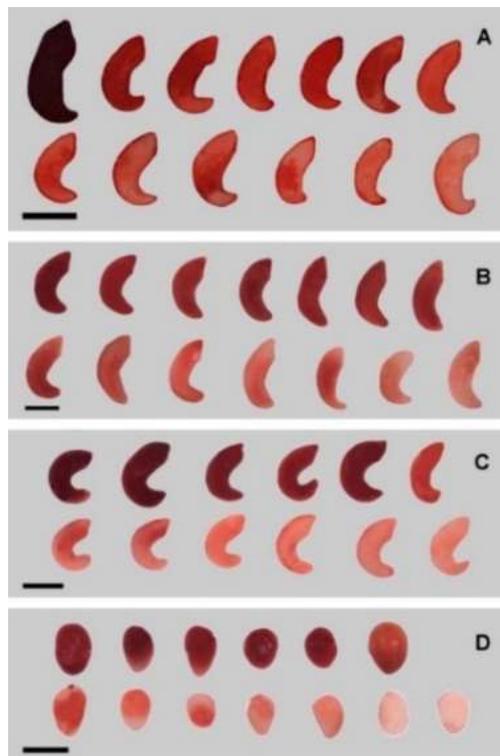


**Figura 2.1.** Porcentaje de viabilidad en cuatro especies de cactáceas en cloruro de tetrazolio con una concentración de 0.1% (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ).

En las cuatro especies se pudo observar que aun después de 2 o 3 años de almacenamiento a temperatura ambiente la viabilidad fue mayor de 65%. Este resultado de viabilidad es parecido al reportado por Cota (1985) de 70% de embriones viables en *Ferocactus latispinus* (Haw.) B.R. & Rose, con una concentración de 0.1% de tetrazolio, pese a no mencionar la edad de la semilla. Mientras un resultado contrario fue reportado por Suarez (2011) con 0.1% de tetrazolio en *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose (pitahaya amarilla) y con semillas de 24 h de recolectada obtuvo una baja tinción en los embriones, atribuida por el autor a una baja concentración de deshidrogenasas. La coloración rojiza varía en las cuatro especies, tanto en la intensidad, como en su uniformidad (Figura 2.2). Esta respuesta pudo deberse a la condición fisiológica o metabólica de cada especie, en lo relacionado con una mayor o menor actividad de las enzimas deshidrogenasas que reaccionan con el tetrazolio para originar el formazan que es la

coloración rojiza producto de la reacción en los tejidos vivos. Cota (1985) menciona que el grado de envejecimiento en los tejidos puede presentar coloraciones pálidas o moteadas. En algunos embriones de este trabajo se pudo distinguir este tipo de tinciones que podría atribuirse a la edad de la semilla (Figura 2.2).

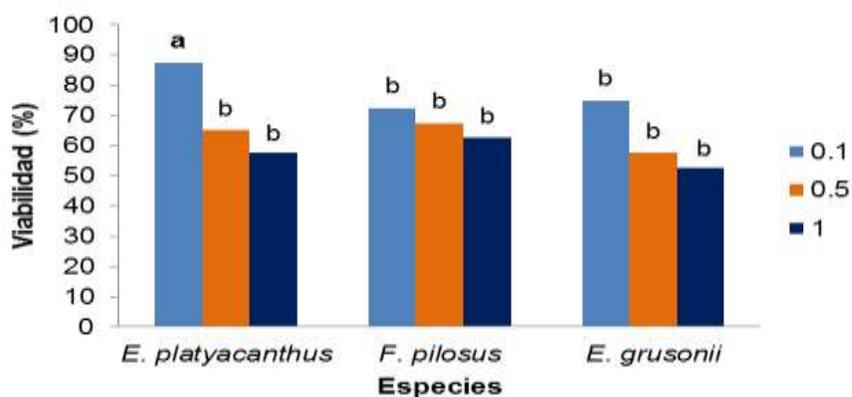
*L. williamsii* no se usó a las concentraciones de 0.5 y 1.0% de tetrazolio por el poco número de semillas que no fueron suficientes para poderla integrar al ensayo, por lo que solo aparecen las dos *Echinocactus* y el *Ferocactus*.



**Figura 2.2.** Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 0,1% en *E. platyacanthus* (A), *E. grusonii* (B), *F. pilosus* (C) y *L. williamsii* (D). Escala de 1 mm.

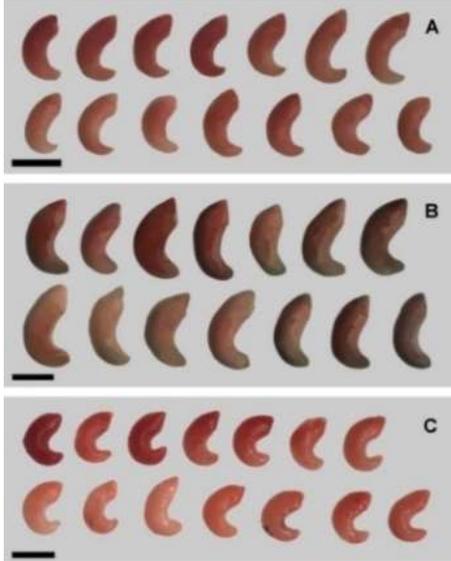
La prueba de Tukey si mostro diferencias significativas. Entre las especies y las concentraciones se presentaron diferencias significativas, siendo el mejor tratamiento el de 0.1% de tetrazolio en *E. platyacanthus* y las otras concentraciones fueron semejantes (Figura 2.3).

*E. platyacanthus* con 0.1% de tetrazolio mostró el mayor porcentaje de viabilidad. Este resultado contrasta con el logrado por varios autores quienes usaron concentraciones más altas. Suarez (2011) obtuvo tinción en todos los embriones en pitahaya amarilla a las concentraciones de 0.5 y 1.0% de tetrazolio. León de la Luz y Domínguez (1991) obtuvieron en semillas lavadas de *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson & Horak 90% de viabilidad con 1.0% de tetrazolio. Masini *et al.* (2014) con 1.0% de tetrazolio obtuvieron hasta un 73.3% de semillas viables de *Maihuenia patagónica* (Phil.) Britton & Rosey y 66.7% de semillas viables en *Maihueniopsis darwinii* (Hensl.) F. Ritter var. *hickenii* (Britton & Rose). Sin embargo, la edad de la semilla pudo influenciar la viabilidad ya que Suarez (2011) y León de la Luz y Domínguez (1991) utilizaron semillas después de ser recolectada, mientras Masini *et al.* (2014) almacenó la semilla por 60 d.

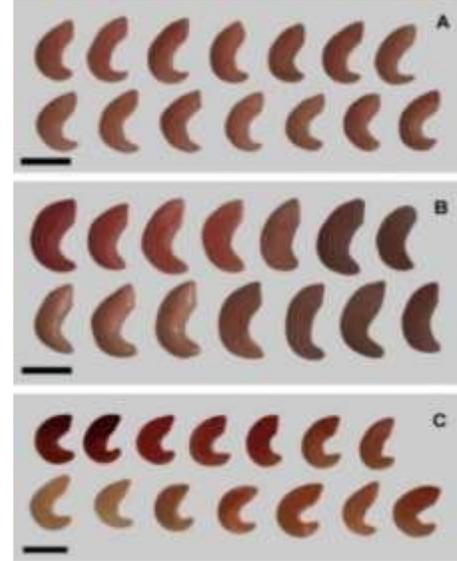


**Figura 2.3.** Porcentaje de viabilidad en tres especies de cactáceas en cloruro de tetrazolio a las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0% (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ) en tratamientos.

Con las concentraciones de 0.5 y 1.0% de tetrazolio se observó menor tinción de los embriones que con 0.1%. Esto pudo deberse a una mayor “sobresaturación” de tetrazolio por lo que las enzimas no alcanzaron a reducir el compuesto para formar el formazan (Figuras 2.2, 2.4 y 2.5).



**Figura 2.4.** Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 0,5% en *E. grusonii* (A), *E. platyacanthus* (B) y *F. pilosus*(C).

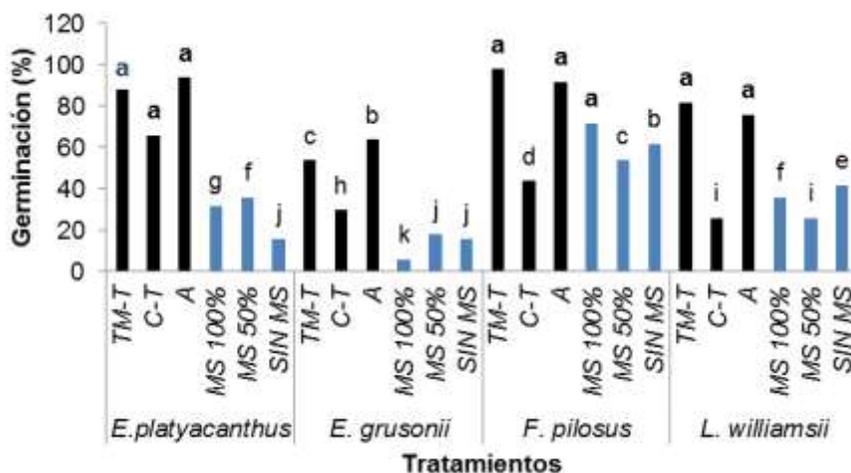


**Figura 2.5.** Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio a 1,0% en *E. grusonii* (A), *E. platyacanthus* (B) y *F. pilosus*(C).

### 2.3.2. Germinación

Las semillas no presentaron contaminación, debido a que el método de desinfestación fue el adecuado. Además, se observó que la germinaron fue más rápido en los sustratos que en el medio MS. Una explicación para esto es que el medios de cultivo MS utilizado en este trabajo fue sólido y al tener menor porosidad por lo tanto menor oxigenación que influyeron en el desarrollo de las plántulas que fue menor al compararlas con los sustratos (TM-T, C-T y A) (Figura 2.6). También, al tener menor porosidad no dejo absorber con facilidad el agua a las semillas reduciendo la germinación. Newell *et al.* (2003) realizaron un trabajo con especies australianas colocadas en *in vitro* con agar poroso (MS) (se batió) con diferente porosidad alcanzaron mayor aireación comparado a al agar sólido (MS) y el sustrato turba, arena y perlita (IVS) también poroso; Ellos observaron que el desarrollo de la raíz fue mejor en los medios porosos *in vitro* y en el sustrato (IVS) comparándolos con el medio sólido. También mencionan que los sustratos porosos aumentaron la aireación lo que favoreció y disminuyó el tiempo de desarrollo de las raíces lo mismo que benefició a la plántula e incrementó la adaptación de las obtenidas en *in vitro*.

Se observaron diferencias significativas entre especies como entre tratamientos en la prueba de Tukey. Los valores más altos fueron para *F. pilosus*, *E. platyacanthus* y *L. williamsii*, mientras los más bajos para *E. grusonii* (Figura 2.6). Al realizar una comparación entre el tipo de sustrato contra medio MS el mayor porcentaje de germinación en general se presentó en los sustratos (Figura 2.8). Para los sustratos TM-T (tierra de monte-tezontle) en *F. pilosus* alcanzó un 98% de germinación, *E. platyacanthus* en A (arena) obtuvo 94%, con *L. williamsii* fue TM-T (tierra de monte-tezontle) con 82% y en *E. grusonii* con A 64% (Figura 2.6). En este trabajo se lograron porcentajes más altos al compararlos con los logrados por Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en *E. platyacanthus* y *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg con suelo-tepojal del 30 y 50%, respectivamente, al ser estos los porcentajes de germinación más altos que obtuvieron.



**Figura 2.6.** Porcentaje de germinación con los diferentes tratamientos en las cuatro especies (Tukey,  $\alpha < 0,05$ ). TM-T: tierra de monte-tezontle, C-T: Compost-tezontle, A: arena y medio MS: medio Murashige & Skooge.

Para el medio MS los porcentajes más altos de germinación fueron con *F. pilosus* con 72% al 100% de MS, en *E. platyacanthus* fue 36% con 50% de MS, para *L. williamsii* fue al 42% sin MS y en *E. grusonii* fue de 18% en MS al 50% (Figura 2.6). Varios autores han reportado porcentajes de germinación en otras especies de cactáceas que son similares, superiores o inferiores a los logrados en este trabajo.

Mata-Rosas *et al.* (2001) en *Turbincarpus laui* Glass et Foster obtuvieron 40 y 50% con MS al 100 y 50%, respectivamente. Garza *et al.* (2005) en *Acanthocereus occidentalis* Britton & Rose obtuvieron 90% de germinación con MS al 100%. Santos (2005) con *Ferocactus glaucescens* Glass et Foster obtuvieron una germinación de 48%, mencionando que el bajo porcentaje pudo deberse a la desinfección. Salas-Cruz *et al.* (2011) en *Astrophytum myriostigma* Lem., *A. capricorne* (A. Dietr.) Britton & Rose, *Escobaria dasyacantha* (Engelm) Britton & Rose, *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck ex Walp.) Haage, *Sclerocactus scheeri* (Salm-Dyck) N. P. Taylor y *Mammillaria prolifera* (Mill.) Haw en promedio obtuvieron 63.3% de germinación con MS al 50% sin sacarosa. Este contraste de resultados con relación a los obtenidos en este trabajo puede deberse a las especies usadas por esos autores o a otros factores como la edad y el manejo postcosecha y pretratamiento de las semillas.

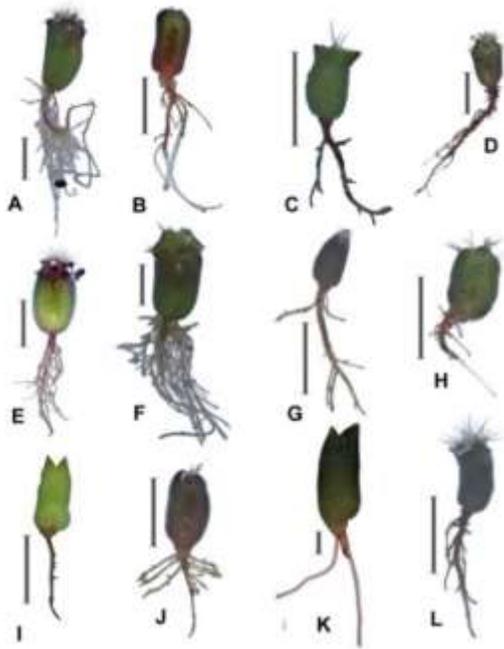
Un observación que se hizo en este trabajo es con el agar (sin sales MS) para *F. pilosus*, *E. platyacanthus*, *L. williamsii* y *E. grusonii* que tuvieron un 62, 16, 42 y 16% de germinación, respectivamente, mucho más bajos que los logrados por Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en agar (sin nutrientes) en las especies *E. platyacanthus* y *P. chichipe* del 80 y 60% de germinación, respectivamente. Es probable que la edad de la semilla haya influido en la germinación al tener las semillas de las especies estudiadas en la presente investigación de 3 a 4 años, mientras Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) utilizaron semillas que tenían una edad de 4 meses.

La germinación en el medio MS inició entre los días 13 y 34. En *L. williamsii* y *F. pilosus* la germinación inicio a los 13 d en los tres tratamientos con MS, mientras que en *E. platyacanthus* se observó entre los 16, 17, 24 d en el medio MS a 100, 50, 0% de su concentración, respectivamente. *E. grusonii* se observó entre los 34-13-13 d para 100, 50, 0% de MS, respectivamente. Este resultado es similar a reportado por Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) al observar en agar sin sales MS que en *E. platyacanthus* y *P. chichipe* la germinación inició a los 13 y 6 d, respectivamente.

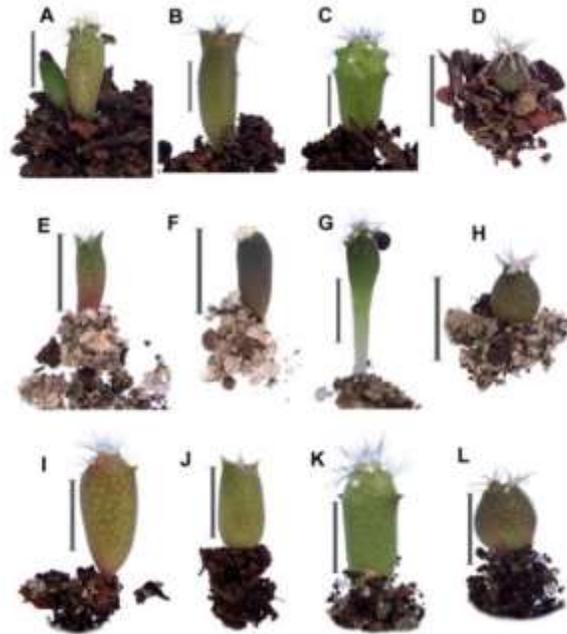
Esto indica que entre las especies y dentro de la misma especie puede haber variación en el tiempo de germinación.

En *L. williamsii*, *F. pilosus*, *E. platyacanthus* y *E. grusonii*, la germinación ocurrió entre los 4-7 d en los sustratos tierra de monte-tezontle (TM-T) y arena (A), respectivamente. Mientras que en compost-tezontle (C-T) fue entre los 9 y 17 d. Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) obtuvieron en *E. platyacanthus* y *P. chichipe* mayor velocidad de germinación 3-4 d en suelo-tepojal parecido al encontrado en los sustratos tierra de monte-tezontle (TM-T) y arena (A). El retraso que presentó el sustrato C-T, pudo deberse que al faltarle de tiempo para que estuviera bien compostado hubo presencia de hongos que afectó a las semillas y su germinación, posteriormente se pudieron controlar los patógenos.

En cuanto al vigor, fueron las plántulas que emergieron en el medio MS al 100% (se desarrollaron más rápido) (Figura 2.7 A, B, C, D) le siguieron las emergidas en el medio al 50% (Figura 2.7 E, F, G, H) y por el contrario en el medio sin nutrientes tuvieron menos vigor (el desarrollo fue más lento) (Figura 2.7 I, J, K, L). Elías-Rocha *et al.* (1998) mencionaron que las plantas de *M. candida* sembradas en medio MS al 50 y 100% las semillas germinaron al mismo tiempo; además observaron que las plántulas de estas especies fueron más grandes y vigorosas con el medio MS al 100%. El resultado de Elías-Rocha *et al.* (1998) y el de esta investigación sobre un mayor vigor en las plántulas puede estar relacionado con la cantidad de nutrientes contenidos en el medio MS al estar al 100%. Para los sustratos, tierra de monte-tezontle (TM-T) (Figura 2.8 A, B, C, D) y compost-tezontle (C-T) (Figura 2.8 I, J, K, L) mostraron plántulas más vigorosas, mientras con la arena mostraron menos vigor (Figura 2.8 E, F, G, H). El mayor vigor en los dos primeros sustratos quizás se debió a que tenían mejores nutrientes y retuvieron mejor el agua para el desarrollo de las plántulas.



**Figura 2.7.** Plántulas de *E. grusonii* MS 100%(A), 50%(E), 0% (I) *E. platyacanthus* MS 100% (B), 50% (F), 0% (J), *F. pilosus* MS 100% (C), 50% (G), 0% (K) y *L. williamsii* MS 100% (D), 50% (H), 0% (L). En la letra K la escala de 1 mm, mientras que en las demás son 5 mm. Medio MS: medio Murashige & Skooge.

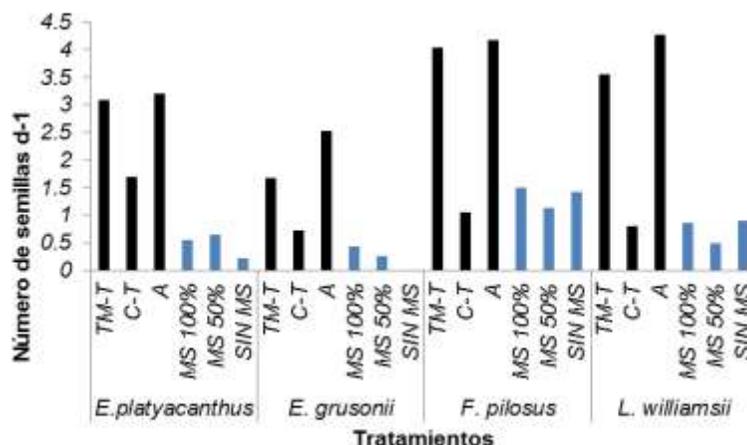


**Figura 2.8.** Plántulas en *E. grusonii* sustrato tierra de monte (A), arena (E) compost (I) *E. platyacanthus* tierra de monte (B), arena (F), compost (J), *F. pilosus* tierra de monte (C), arena (G), compost (K) y *L. williamsii* tierra de monte (D), arena (H), compost (L). La escala es de 5 mm.

### 2.3.3. Índice de Velocidad Germinativa

Este parámetro sirve para saber el vigor que tienen las semillas de las especies. Entre más semillas germinen en los primeros días mayor es el número de semillas germinadas por día y más oportunidades de generar plantas normales. El mejor tratamiento para el Índice de Velocidad Germinativa (ÍVG) de las cuatro especies se dio en los sustratos comparados a los medio MS (Figura 2.9). Se destacaron: *L. williamsii* en arena (A) y tierra de monte-tezontle (TM-T) con 4.27 y 3.55 semillas por día; seguido por *F. pilosus* en arena (A) y tierra de monte-tezontle (TM-T) con 4.18 y 4.03 semillas por día, respectivamente; *E. platyacanthus* en arena (A) y tierra de monte-tezontle (TM-T) con 3.2 y 3.08 semillas por día, respectivamente, y por último *E. grusonii* en arena (A) y tierra de monte-tezontle (TM-T) con 2.53 y 1.67 semillas

por día, respectivamente. Mientras en *E. grusonii* con agar, las semillas no germinaron (Figura 2.9). Salas-Cruz *et al.* (2011) obtuvieron un IVG en *A.* (5.27), *A. capricorne* (5.16), *E. dasyacantha* (4.45), *E. reichenbachii* (3.36), *S. scheeri* (3.26) y *Mammillaria prolifera* (2.85) semillas por día en *in vitro*.



**Figura 2.9.** Índice de Velocidad Germinativa (IVG) con los diferentes tratamientos en las cuatro especies. TM-T: tierra de monte-tezontle, C-T: Compost-tezontle, A: arena y medio MS: medio Murashige & Skooge.

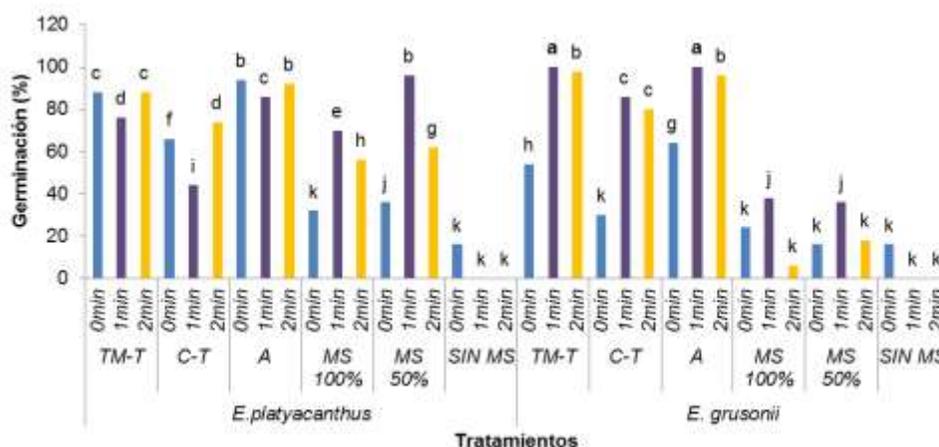
El IVG correspondió con lo obtenido en los porcentajes de germinación en las especies, en que el mayor número de semillas germinadas por día fue en los tratamientos con mayor porcentaje de germinación. Las plántulas vigorosas tuvieron: germinación más rápida, tuvieron mayor número de semillas germinadas y plántulas normales. En general se obtuvieron porcentajes altos de germinación, considerando que estas especies tienen problemas para su germinación. También al ser almacenadas las semillas a temperatura ambiente y la edad influyó en los resultados.

### 2.3.4. Escarificación en *E. platyacanthus* y *E. grusonii*.

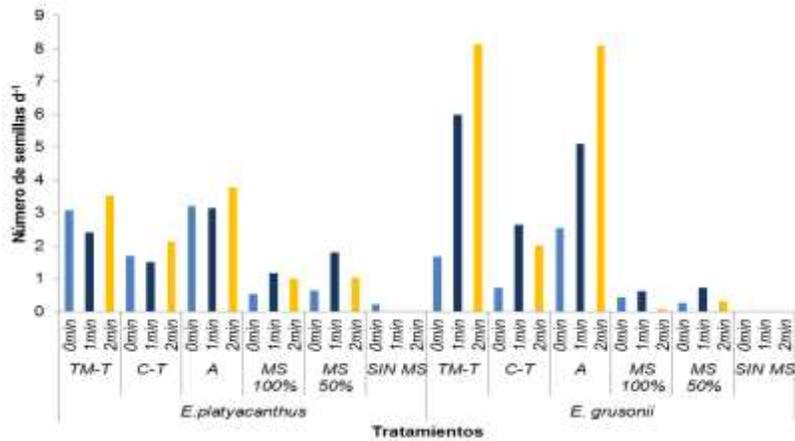
En las especies y los tratamientos se encontraron diferencias significativas en la prueba de Tukey. El mejor tratamiento de escarificación en la germinación de *E. grusonii* fue con 1 min de ácido sulfúrico en A y TM-T con 100% de germinación. En

general se pudo observar un aumento en el número de semillas germinadas en los sustratos con escarificación que sin esta. Solamente en agar y escarificación por 1 y 2 minutos no hubo semillas germinadas para las dos especies (Figura 2.10). Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) observaron que el mejor tratamiento en *P. chichipe* con ácido sulfúrico al 100% por 15 segundos en suelo-tepojal con 40% de germinación y en *E. platyacanthus* con ácido sulfúrico al 100% por 1h el mejor fue 90% de germinación en suelo-tepojal.

*E. platyacanthus* en MS 50% alcanzó un 96% de semillas germinadas con 1 min, lo que sugiere que esta especie requiere de escarificación para poder obtener un porcentaje alto de germinación. Este porcentaje es alto si se compara a los obtenidos por los autores Moebius-Goldammer *et al.* (2003) quienes en *Ariocarpus kotschobeyanus* (Lem.) K. Schum con una escarificación de 2 min con ácido sulfúrico en MS al 100% obtuvieron 70% de germinación. Además, De Medeiros *et al.* (2006) obtuvieron en *Notocactus magnificus* (Ritter) Krainz un porcentaje del 13% de germinación sin tratamiento y al utilizar una cámara Gearbox (al alternar la temperatura) solo lograron 26% de germinación.



**Figura 2.10.** Porcentaje de germinación con los diferentes tratamientos de escarificación en *E. platyacanthus* y *E. grusonii* (Tukey  $\alpha < 0.05$ ).



**Figura 2.11.** Índice de Velocidad Germinativa (IVG) con los diferentes tratamientos de escarificación en *E. platyacanthus* y *E. grusonii*.

Los sustratos TM-T y A con escarificación presentan los valores más altos del número de semillas germinadas por día en *E. grusonii*. En *E. platyacanthus* los sustratos TM-T y A con/sin escarificación tuvieron los valores más altos del número de semillas germinadas por día (Figura 2.11). Aun con los tres años de almacenamiento a temperatura ambiente, el pretratamiento en estas especies demostró ser favorable al disminuir los días de germinación entre 4-17 d así como aumentó el porcentaje la germinación.

## 2.4. CONCLUSIONES

El valor de esta investigación radicó en poder obtener los mejores tratamientos para el manejo de las semillas con el fin de obtener plántulas más vigorosas y un mayor éxito en campo.

Los métodos de desinfección fueron los adecuados para obtener semillas libres de patógenos.

El tetrazolio a una concentración de 0,1% fue la mejor para teñir los embriones de las cuatro especies.

Los sustratos tierra de monte-tezontle y arena fueron los mejores tratamientos para el tiempo de germinación y el porcentaje de germinación.

Se debe de escarificar las semillas de *E. platyacanthus* y *E. grusonii* para mejorar la germinación.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Alanis-Flores, G.J. y C. G. Velasco-Macías. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el Noreste de México. *Ciencia UANL*. 11:5-11.
- Amador-Alfárez, K. A., J. Díaz-González, S. Lorza-Cornejo y E. Bivián-Castro. 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas en dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotanica*. 35: 109-131.
- Arias, M. S. 1997. Distribución general. En *Suculentas Mexicanas Cactáceas*. Editorial CVS Publicaciones. México.
- Arias, S., U. Guzmán, C. M. Mandujano, G. M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I (Una comparación entre los listados). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 50 (4): 101-125.
- Bravo, H. H. 1978. 2° ed. *Las Cactáceas de México*. Vol. 1 y 2<sup>da</sup>. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F.
- Bravo-Hollis H. y L. Scheinvar. 2002. *El interesante mundo de las cactáceas*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- CITES. 2009. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/resources/especies.html>. Fecha de consulta: 25-septiembre-2012.
- CONABIO. 2014. Biodiversidad Mexicana, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en: [http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies\\_enriesgo/buscadador\\_especies/resultados.php?txtNombreCientifico=ecparahinocactus+platyacanthus&txtNombreComun=biznaga+tonel&selRegion=-1&selNomCat=-1&selPrioritaria=-1&selCatIUCN=-1&selCatCITES=-1](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_enriesgo/buscadador_especies/resultados.php?txtNombreCientifico=ecparahinocactus+platyacanthus&txtNombreComun=biznaga+tonel&selRegion=-1&selNomCat=-1&selPrioritaria=-1&selCatIUCN=-1&selCatCITES=-1). Fecha de consulta: 13-octubre-2014.
- Cota, S. G. H. 1985. Morfología y pruebas de viabilidad con sales de tetrazolio en semillas de *Ferocactus latiospinus* (Haw.) Br. and Rose. *Cactáceas y suculentas mexicanas*. 30(3):51-55.

- De Medeiros, L. A., R. C. R. De. Salvador, L. A. Gallo, E. O. De Tiago and M. E. S. P. Demattê. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84:165-169.
- Elías-Rocha, M. A., M. del S. Santos-Díaz y A. Arredondo-Gómez. 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia*. 6: 96-101.
- Garza, P. R. A., R. M. E. Morales y N. J. F. Treviño. 2005. Propagación *in vitro* de *Acanthocereus occidentalis*, Britton and Rose. Boletín Informativo de la SLCCS. 2 (3): 5.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. *Handbook on Tetrazolium Testing*. Zurich. Switzerland.
- Jiménez, S. C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12:1:23.
- Kunte, L. y R. Šubik. 2004. *La enciclopedia de los cactus*. Editorial Libsa. España.
- León, de la L. J. S. y C. R. Dominguez. 1991. Evaluación de la reproducción por semilla de la pitaya agria (*Stenocereus dummosus*) en baja california sur, México. *Acta Botánica Mexicana*. 14:75-87.
- Masini, A. C. A., A. E. Rovere y G. I. Pirk. 2014. Requerimientos pregerminativos de *Maihuenia patagonica* y *Maihueniopsis darwinii*, cactáceas endémicas de Patagonia. *Guyana Botanica*. 71(2): 188-198.
- Moebius-Goldammer, K. G., M. Mata-Rosas y V. M. Chávez-Avila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschobeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 39:388-393.
- Newell, C., D. Grows y J. Mc Comb. 2003. The influence of medium aeration on in vitro rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 75: 131-142.
- Rosas-López, U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *ΦΥton*. 53:213-220.

- Salas-Cruz, L. R., R. Foroughbackch-Pournabav, M. de L. Díaz-Jiménez, M. L. Cárdenas-Ávila y A. Flores-Valdés. Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3: 565-575.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Fecha de consulta: 24-febrero-2011.
- Santos, D. M. del S. 2005. Micropropagación de *Ferocactus glaucescens* Britton and Rose, cactácea mexicana de valor ornamental. *Boletín Informativo de la SLCCS*. 2 (3): 6-8.
- SAS Institute. 1998. *User's guide: statistics*. 7-0<sup>th</sup>. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Suárez, R. R. S. 2011. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. Tesis de grado en maestría en ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 280 p.
- Trópicos. 2011. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/5104713?tab=specimens>. Fecha de consulta: 24-octubre-2011
- Wilcox, D., B. Dove, D. Mc David y D. Greer. 2002. *UTHSCSA image tool for windows ver. 3.0*. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.
- Vozzo, J. A. 2002. *Tropical Tree Seed Manual*. United States Department of Agriculture. Forest service.

### CAPÍTULO III. MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS AMENAZADAS

#### RESUMEN

*Echinocactus platyacanthus* Enlace y Otto, *Echinocactus grusonii* Hildm., *Ferocactus pilosus* (Galeotti) Werderm y *Lophophora williamsii* (. Lem Ex Salm-Dyck) JM Coult, son especies endémicas de México y se encuentran en una categoría de riesgo; por esta razón, fue importante establecer la regeneración *in vitro* de estas especies. El medio de cultivo básico fue Murashige & Skoog (MS). Los tratamientos fueron citoquininas 1.0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina o 6-furfurilaminopurina (K), 6-bencilaminopurina (BA) y adenina N-isopentenil (2ip), solos o en combinación con auxina ácido naftaleno acético (NAA) en dosis de 0, 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup> y testigo. Los resultados indicaron que la mejor citocinina fue 2iP, en todas las concentraciones, así como en todos los tratamientos para regenerar brotes. El mejor tratamiento en *E. platyacanthus* fue de 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA regenerando en promedio 5.6 brotes por explante. *E. grusonii* fue la especie con menor número de brotes principalmente en K y BA. El enraizamiento *in vitro* en las tres especies fue mejor con MS sin reguladores, alcanzó el 90% de los brotes enraizados. Las plántulas enraizadas en MS sin reguladores se aclimataron en el 80%.

Palabras clave: reguladores de crecimiento, cactáceas, enraizamiento, aclimatación.

## ABSTRACT

*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Echinocactus grusonii* Hildm., *Ferocactus pilosus* (Galeotti) Werderm and *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) JM Coult, are species endemic to Mexico, and are in a risk category; for this reason, it was important to establish the in vitro regeneration of these species. The basic culture medium was Murashige & Skoog (MS). The treatments were cytokinins 1.0 mg L<sup>-1</sup> kinetin or 6-furfurylaminopurine (K), 6-benzylaminopurine (BA) and N-isopentenyl adenine (2iP), alone or in combination with auxin Naphthalene acetic acid (NAA) in doses of 0-0.01-0.1 mg L<sup>-1</sup> and control. The results indicated that the best was 2iP cytokinin, in all concentrations as well as in all treatments for regenerating buds. The best treatment in *E. platyacanthus* was 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA by regenerating on average 5.6 buds per explant. *E. grusonii* was the species with fewer buds mainly in K and BA. The in vitro rooting in the three species was better with MS without regulators, reached 90% of rooted shoots. Seedlings rooted in MS without regulators were acclimated in 80%.

KEYWORDS: growth regulators, cactus, rooting, acclimatization.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El 80% de las cactáceas en México son endémicas, según Jiménez (2011) son alrededor de 730 especies y un número considerable de estas, según SEMARNAT (2010) se encuentran en alguna categoría de riesgo alrededor de 276 especies, como: *Echinocactus grusonii* Hildm., nombrada “asiento de suegra” y que se distribuye desde Hidalgo hasta San Luis Potosí, se considera una planta de ornato y está en peligro de extinción. *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto conocida como “biznaga tonel grande”, se distribuye en el centro y norte del país, a pesar de amplia distribución, es una especie sobreexplotada, principalmente para la elaboración de dulce (acitrón) y como alimento para el ganado. *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm) llamada “biznaga barril de lima”, se encuentra en Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, y Zacatecas, se vende como planta de ornato, en época de sequía se utiliza como forraje, las flores y los frutos se consúmen. *Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dyck) J.M. Coult., nombre común “peyote”, no es endémica al distribuirse en México (Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, y Zacatecas) y EE. UU. (Texas y Nuevo Mexico), es usado en ceremonias religiosas y medicinal; por lo que están en protección especial; en la NOM-059-ECOL-2010 (Kunte y Šubík, 2004; Arias *et al.*, 2005; SEMARNAT, 2010; Tropicos, 2011). Son especies recolectadas indiscriminadamente para el comercio, como plantas de ornato y se encuentran en el apéndice II de CITES (CITES, 2015).

Estas cuatro especies tienen características biológicas que las hacen más vulnerables, como es el lento crecimiento y la dificultad de que la semilla germine en condiciones naturales. Por otro lado existe la dificultad de conseguir material vegetativo para su propagación y la obtención de tejidos libres de patógenos, por lo que dificulta su manejo, aunado a la presión antropogénica en la que se encuentran. Es por esto que se hace necesario el uso de técnicas, que aseguren la supervivencia y el rescate de estas especies que están en alguna categoría de riesgo de manera que se plantearon los objetivos siguientes: establecer el protocolo

para conocer el efecto de los reguladores del crecimiento en las plántulas de las cuatro especies, obtenidas de la germinación *in vitro*; determinar el efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes, de raíz en los brotes; y por último, evaluar el porcentaje de aclimatación de las plántulas.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de semillas germinadas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus*, *F. pilosus* y *L. williamsii* que fueron donadas por la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala-Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y Centro Ecoturístico y de Educación Ambiental Sierra de Guadalupe.

### 3.2.2. Establecimiento e inducción de brotes

Se emplearon 100 plántulas de 0.5 cm de longitud por especie, obtenidas de semillas germinadas *in vitro*. Como inóculo se utilizó la parte aérea, y se retiró la raíz. Los explantes se transfirieron al medio Murashige & Skoog (MS) (1962) con sales al 100%, complementado con glicina (2.0 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100.0 mg L<sup>-1</sup>), tiamina HCl (0.4 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (2.0 mg L<sup>-1</sup>) y sacarosa (30.0 g L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó entre 5.7-5.8 con 0.1 N de hidróxido de sodio o con 0,1 N de ácido clorhídrico. El medio de cultivo se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Los tratamientos consistieron en el empleo de reguladores de crecimiento: 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2iP), bencil aminopurina (BA), cinetina (K) 1.0 mg L<sup>-1</sup> como citocininas solas y en combinación con la auxina ácido naftalenacético (ANA) en las concentraciones 0, 0.01, 0.1 mg L<sup>-1</sup> y el testigo (medio MS sin reguladores). Los frascos se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 27°C $\pm$ 2 con luz constante y a una intensidad luminosa de 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.3. Enraizamiento

Los brotes se enraizaron en medio MS al 100% sin reguladores de crecimiento y en medio MS al 100% con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

### 3.2.4. Aclimatación

Los brotes con raíz fueron colocados en el área de incubación, a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C}\pm 2$ , para su aclimatación. Se colocaron en cajas de plástico transparentes desechables y en la parte superior se hicieron orificios pequeños. El sustrato utilizado fue tierra de monte con tezontle (2:1) tamizado con una malla de 0.5 cm, esterilizado y se regaron cada tres días. Se dejaron en el área de incubación por ocho meses. Después las plantas obtenidas se llevaron a un túnel con una temperatura promedio de  $19^{\circ}\text{C}$  y riegos semanales.

Las variables evaluadas fueron: tipo y color de callo, número de brotes, brotes que formaron raíz y plántulas aclimatadas. Se utilizaron cinco repeticiones para la micropropagación, 30 repeticiones en enraizamiento (cada frasco fue una unidad experimental) y 25 en aclimatación (cada caja fue una unidad experimental). Se utilizó en micropropagación un diseño completamente al azar con un arreglo factorial (3X10, donde, tres especies x diez MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y MS sin reguladores), en enraizamiento fue 3x2 (tres especies x brotes colocados en MS y MS con AIB) y en aclimatación fue 3x2 (tres especies x especies enraizadas en MS y MS con AIB, colocadas en tierra de monte con tezontle). El análisis de los datos consistió en un análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey) HSD ( $\alpha < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute 1998).

### 3.3. RESULTADOS

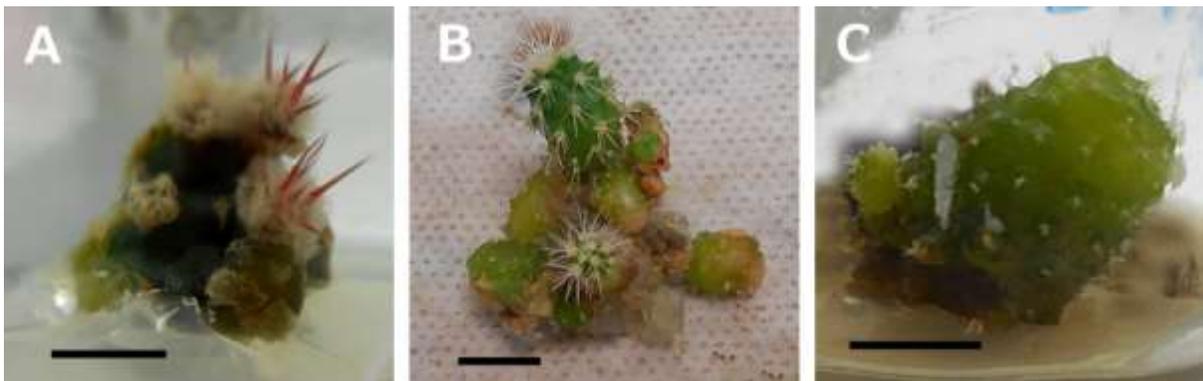
#### 3.3.1. Formación de brotes

En la fase de micropropagación no se presentó contaminación en ningún de los tratamientos.

El testigo (explantos colocados en MS sin reguladores de crecimiento) promovió pequeñas formaciones de callos y de raíz en los tejidos en las tres especies.

*L. williamsii* no aportó la información esperada, ya que solamente se obtuvieron tres brotes en un callo con 0.1 ANA:1.0 mg L<sup>-1</sup> K y los demás explantes se perdieron por oxidación aun en el testigo. Por esta razón, ya no se añadió esta especie en los cálculos estadísticos.

Todos los tratamientos con reguladores de crecimiento se estimuló la formación de callo. Los callos en *E. platyacanthus* fueron compactos, color verde oscuro y en algunos callos presentaron pequeñas zonas friables, mientras en *E. grusonii* y *F. pilosus* presentaron callos menos compactos, verdes claros con partes hiperhidratadas (Figura 3.1).

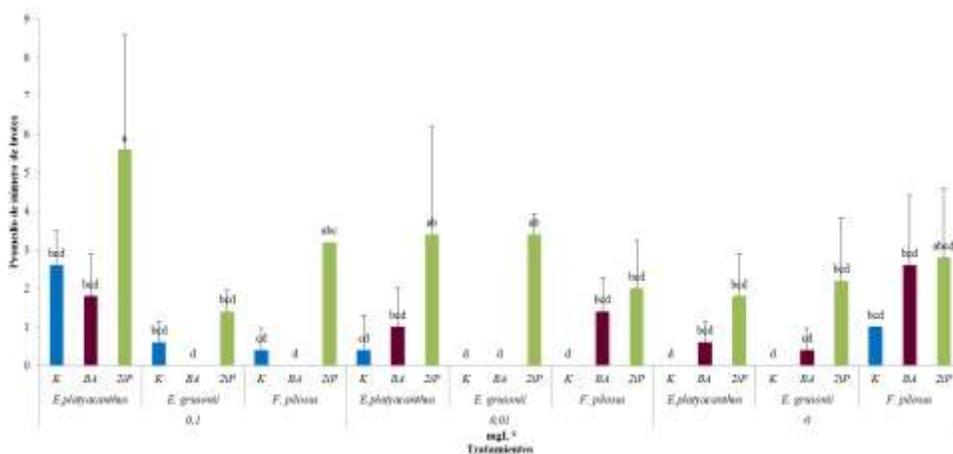


**Figura 3.1.** Tipo y color de callo-brotes con y sin hiperhidratación (A) *E. platyacanthus*, (B) *F. pilosus* y (C) *E. grusonii* (escala a 1 cm).

*E. platyacanthus* no presentó brotes en el tratamiento 1.0 K, mientras en *E. grusonii* no indujeron brotes en los tratamientos 0.01 ANA:1.0 K, 0.01 ANA:1.0 BA, 1.0 K y 0.1 BA y en *F. pilosus* 0.01 ANA:1.0 K y 0.1 ANA:1.0 BA ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 3.2).

La prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ) en las especies y las concentraciones presentaron diferencias significativas (Figura 3.2). La brotación inició a las cuatro semanas después de su siembra. El mejor regulador de crecimiento fue el 2iP para las tres especies, al tener brotes en todas las repeticiones. En general, la combinación de ANA con BA no favoreció el rebrote, en tanto la adición ANA con K hubo una mejor respuesta, el BA sin auxina tuvo mejor respuesta, mientras con K se observó lo contrario (Figura 3.2).

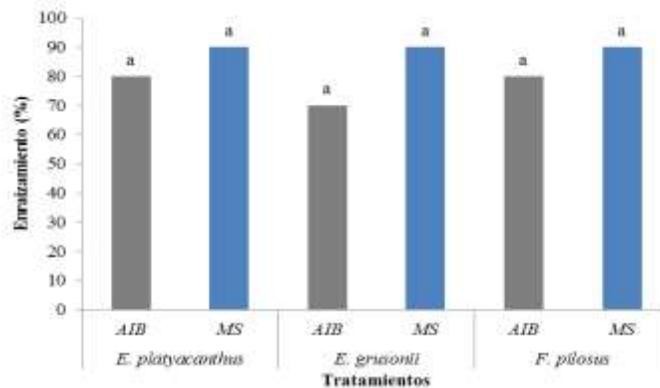
*E. platyacanthus* fue la especie que obtuvo mayor rebrote. El mejor tratamiento fue 0.1 ANA: 1.0 2iP  $\text{mg L}^{-1}$  con un promedio de 5.6 brotes por explante. Mientras *E. grusonii* fue el que formó menor número de rebrote ya sea con K y BA solas o combinación con ANA. El mejor tratamiento para esta especie fue 0.01 ANA: 1.0 2iP  $\text{mg L}^{-1}$  con un promedio de 3.4 brotes por explante (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Promedio (desviación estándar) del número de brotes por explante de *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus*, con sus tratamientos, prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).

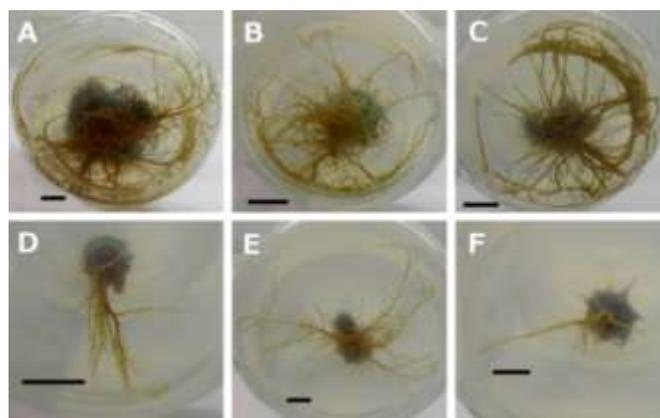
### 3.3.2. Formación de raíz

El enraizamiento no mostró diferencias significativas en la pruebas de medias y se obtuvieron porcentajes mayores del 70% de brotes con raíz (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Porcentajes de enraizamiento y prueba de medias en *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* con y sin AIB. Prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).

Los brotes que estuvieron en medio MS sin AIB mostraron raíces numerosas, por lo que las plántulas crecieron mejor comparadas con las que estuvieron en el medio MS con AIB (Figura 3.4). En el medio MS se obtuvo 90% de enraizamiento para las tres especies. Los brotes hiperhidratados que formaron raíz se restablecieron (coloración verde oscuro).

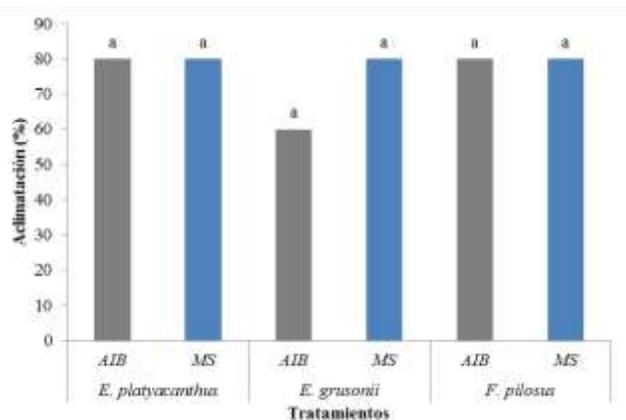


**Figura 3.4.** Formación de raíz con MS (A-B-C) y AIB (D-E-F) en *F. pilosus* (A-D), *E. grusonii* (B-E) y *E. platyacanthus* (C-F) (escala a 1 cm).

El número de raíces primarias, en promedio, en el medio MS sin reguladores, fue de diez, ocho y 15 para *F. pilosus*, *E. grusonii* y *E. platyacanthus*, respectivamente. La abundancia de las raíces secundarias en *E. grusonii* fue mayor comparada a *F. pilosus* y *E. platyacanthus*. Por el contrario con el medio MS suplementado con AIB el número de raíces primarias en promedio fueron cinco, cuatro y una en *F. pilosus*, *E. grusonii* y *E. platyacanthus*, respectivamente.

### 3.3.3. Plántulas aclimatadas

Los brotes con raíz de *F. pilosus*, *E. grusonii* y *E. platyacanthus*, sometidas en los medios MS sin reguladores y MS con AIB; no mostraron diferencias estadísticas significativas en su aclimatación (Figura 3.5) y se obtuvieron porcentajes entre el 60 al 80% de plántulas aclimatadas. Sin embargo, en el medio MS mostraron el 80% de aclimatación, para las tres especies (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Porcentaje y prueba de medias Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).de plántulas aclimatadas en raizadas en diferentes tratamientos

En general el desarrollo de brotes de las plántulas obtenidas a partir del medio MS sin reguladores, fue mayor, en comparación con las plántulas obtenidas del medio MS con AIB (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Aclimatación en tierra de monte y tezontle de plántulas enraizadas en MS (A-B-C) y AIB (D-E-F) de *F. pilosus* (A-D), *E. grusonii* (B-E) y *E. platyacanthus* (C-F) (escala a 1 cm).

### 3.4. DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Formación de brotes

La presencia de los reguladores de crecimiento fue necesaria para la formación de brotes en los tejidos de *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* al compararlos con el testigo donde no hubo brotes. En *L. williamsii*, probablemente la presencia de los metabolitos secundarios (alcaloides) o el estrés provocado al hacer los cortes indujeron la oxidación de los explantes como lo reporta Azofeifa (2009) para otras especies en general.

La formación de callo fue favorecido principalmente con el uso de reguladores de crecimiento que aquellos comparados con el testigo. Se sabe que la formación del callo puede causarlo algún tipo de daño con la presencia de auxinas en el medio de cultivo (George, 1993). Mata *et al.* (2001) observaron que el desarrollo de callo en *Turbinicarpus laui* Glass *et Foster*, fue mayor en los tratamientos con reguladores de crecimiento que sin estos. Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) observaron la formación de callo en *Coryphantha retusa* (Britton & Rose), con los tratamientos de ANA. En este trabajo, el tipo de callo y sus tonalidades varió según la especie. En *E. grusonii* y *F. pilosus* el callo fue un verde claro y poco compacto, mientras que en *E. platyacanthus* fue de coloración verde oscuro y compacto. Las tonalidades claras también las observaron De Medeiros *et al.* (2006) en *Notocactus magnificus* (F.Ritter) Krainz ex N. P. Taylor, en sus tratamientos formaron callos compactos, y mencionaron que hubo disminución en la clorofila.

La brotación inició a las cuatro semanas con 2iP por lo que fue lenta la formación de brotes comparada con la obtenida por De Medeiros *et al.* (2006) en *N. magnificus*, que ya tenían seis brotes por explante con BA después de las cuatro semanas. Mientras Balch *et al.* (1998) comentaron que el inicio de los rebrotes en 21 especies de cactáceas fue entre las 6-12 semanas, mucho más lento que en las

especies utilizadas en este trabajo. Posiblemente se deba a las características biológicas de cada especie

El mejor tratamiento fue con la citocinina 2iP con y sin auxina en las tres especies utilizadas en este trabajo. El tratamiento con el mayor número de brotes por explante fue con 0.1 ANA: 1.0 2iP ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en *E. platyacanthus* con 5.6 brotes por explante, por lo que si se le da mayor tiempo podría favorecer la inducción de un mayor número de brotes por explante. Mata *et al.* (2001) obtuvieron los mejores resultados, 269.8-146.2 brotes por explante después de 14 semanas con (8.8-13.32  $\mu\text{M}$  BA con y sin ANA) 1.98-3.0  $\text{mg L}^{-1}$  BA, en *T. laui*. Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) obtuvieron más rebrotes en cortes apicales y laterales, con una media de 8.8-10.4 brotes, respectivamente y después de 70 d tuvieron hasta 14 brotes por explante en *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) con 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  BAP sin ANA. Dávila-Figueroa *et al.* (2005) obtuvieron en diferentes especies de *Turbinicarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb. 7.8 a 19.7 brotes por explante con BA y 2iP sin auxinas. Balch *et al.* (1998) tuvieron de 2.15-16.75 brotes en promedio en 21 especies y con *E. platyacanthus* y *F. pilosus* mencionaron que fue de 9.0 y 5.1 brotes cifra mayor que en las especies de este trabajo. Mientras De Medeiros *et al.* (2006) en *N. magnificus* observaron, en promedio, seis brotes en (22.2 $\mu\text{M}$ ) 5.0  $\text{mg L}^{-1}$  en BA y cinco brotes en (2.9 AIA: 4.6K  $\mu\text{M}$ ) 0.5:0.9  $\text{mg L}^{-1}$ . Gómez *et al.* (2006).en *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console con 0.1 AIA: 0.5 BA ( $\text{mg L}^{-1}$ ); de la parte apical obtuvieron 7.6 brotes por explante, similares a los obtenidos en este trabajo.

En *E. grusonii* con K y BA no formó o fue baja la formación de brotes, por lo que no se recomienda el uso de estos reguladores para esta especie. Aíra de Medeiros *et al.* (2006) obtuvieron más rebrotes en *N. magnificus* con K y BA. Aliyu y Muatapha (2007) con BAP obtuvieron brotes, sin mencionar cuantos, en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Las especies se comportaron diferentes en cada tratamiento, por lo que su plasticidad morfo-génica puede ser menor o mayor según la especie, por lo que hay

que utilizar un tratamiento particular y así obtener más brotes para cada una de ellas.

### 3.4.2. Formación de raíz

El enraizamiento inició a las tres semanas en las tres especies para todos los tratamientos. Este resultado es una semana más al obtenido por Mata *et al.* (2001) para *T. laui* en MS quienes reportaron solo dos semanas después de sembradas para la formación de las raíces. Estos resultados fueron similares a lo reportado por Balch *et al.*, (1998) en 21 especies con AIA o AIB cuyo enraizamiento inicio entre las tres y cinco semanas.

El porcentaje de enraizamiento fue de 70-90%, por lo que se consideró alto al compararlo con el obtenido por varios autores. De Medeiros *et al.* (2006) en *N. magnificus* fue del 45% utilizando MS sin reguladores de crecimiento. Dávila-Figueroa *et al.* (2005) obtuvieron del 50.1-94.2% de enraizamiento en diferentes especies de *Turbinicarpus* utilizando MS y AIB. Mata *et al.* (2001) informan que brotes en *T. laui* observaron un 50% con MS. Gómez *et al.* (2006) observaron en *M. geometrizzans* 75% de enraizamiento con 5.0 AIA y 7.0 AIB ( $\text{mg L}^{-1}$ ), respectivamente. Sin embargo, fue ligeramente bajo si se comparan con los logrados por Balch *et al.* (1998), quienes reportaron para las 21 especies, enraizamiento arriba de 75% con AIA o AIB dentro de las cuales estaban consideradas *E. platyacanthus* y *F. pilosus* que tuvieron porcentajes de 95 y 100%. Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) obtuvieron el 100% de enraizamiento en *C. retusa* con MS.

Para la formación de raíz en los brotes cultivados en medio MS no fue necesaria la presencia de AIB. Lo cual puede significar que exista alguna inhibición de raíz por la presencia del regulador. Además, al no usar este reactivo se podría lograr una reducción de insumos. Esta misma observación fue hecha por Dávila-Figueroa *et al.* (2005) en diferentes especies de *Turbinicarpus* obtuvieron enraizamiento más alto

con MS comparado con AIB, lo que estos resultados fueron similares a lo obtenido en este trabajo.

### **3.4.3. Plántulas aclimatadas**

Las plántulas enraizadas en MS mostraron un 80% de sobrevivencia en este trabajo. Este resultado es igual o ligeramente bajo si se compara con los obtenidos por otros autores. Gómez *et al.* (2006) obtuvieron un 84% de plántulas de *M. geometrizzans* adaptadas. Mata *et al.* (2001) tuvieron una sobrevivencia en *T. laui* del 94-100%. Balch *et al.* (1998) en las 21 especies observaron una sobrevivencia del 70-95% incluidas *E. platyacanthus* y *F. pilosus*, ambas con 95% de sobrevivencia. Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2010) refieren que el porcentaje de plántulas aclimatadas en *C. retusa*, fue del 95%.

### 3.5. CONCLUSIONES

Se concluyó que el uso de esta técnica *in vitro* es una herramienta importante para estudiar y mantener germoplasma. También es un método que puede ayudar a producir mayor número de plantas para satisfacer los mercados y así reducir la presión antropogénica excesiva que sufren estas especies.

El mejor tratamiento para la formación de brotes en *E. platyacanthus* fue 0.1 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup>, en *E. grusonii* 0.01 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup> y en *F. pilosus* 0.1 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup>.

El mejor tratamiento para la formación de raíz en *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* el mejor fue con MS sin reguladores.

El mejor tratamiento para la aclimatación fueron las plántulas de *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* obtenidas del enraizamiento con MS sin reguladores y sembradas en tierra de monte con tezontle.

### 3.6. LITERATURA CITADA

- Aliyu, B. S. and Y. Mustapha. 2007. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. African Journal of Biotechnology. 6(11): 1330-1331.
- Arias, S., U. Guzmán, C. M. Mandujano, G. M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I (Una comparación entre los listados). Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 50 (4): 101-125.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana. 20(1): 153-175.
- Balch, P. M. E., M. E. R. Pérez, E. A. Villalobos, E. R. Meza, L. del R. R. Morones and H. J. V. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 34: 131-135.
- Cites. 2015. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/disc/species.php>. Fecha de consulta: 25-abril-2015.
- Dávila-Figueroa, C. A., M. de L. De la Rosa-Carrillo and E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). In Vitro Cell Dev B-P. 41: 540-545.
- De Medeiros, L. A., R. C. Salvador de Ribeiro, L. A. Gallo, E. Tiago de Oliveira and P. D. M. E. Soares. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84: 165-169.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I The technology. Exegetics, Limited. England.
- Gómez, J. J. L., J. E. Morales, C.J.A. Lechuga y S.F. Cruz. 2006. Reproducción *in vitro* del garambullo, *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 5 (2): 36-45.
- Jiménez, S. C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. Revista Digital Universitaria. 12(1):1-23.

- Kunte, L., y R. Šubik. 2004. La enciclopedia de los cactus. Editorial Libsa. Madrid, España.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mata, R. M., M. A. Monroy de la Rosa, G. K. Moebius and A. V. M. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 37: 400-404.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 139–143.
- SAS Institute. 1998. User's guide: statistics. 7-0<sup>th</sup>. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Fecha de consulta: 24-febrero-2011.
- Trópicos. 2011. <http://www.tropicos.org/Name/5104713?tab=specimens>. Fecha de consulta: 24-octubre-2014.

## CAPITULO IV. NÚMERO CROMOSOMICO DE TRES ESPECIES DE CACTÁCEAS EN RIESGO

### RESUMEN

Se determinó el número y morfología de los cromosomas en tres especies cactáceas de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm) y *Echinocactus grusonii* Hildm, son especies que se encuentran en una categoría de riesgo. Los cromosomas fueron observados en células de ápices radicales pre-tratadas con colchicina al 0.05% por diferentes horas y en frío por 24-36 h; se fijaron en Carnoy. La tinción de los cromosomas se hizo con Feulgen y el aplastado con orceína propiónica al 2 %. Solo en *E. grusonii* se observaron los cromosomas en metafase, el número cromosómico diploide fue  $2n=2x=22$  en 2 h de colchicina. Los cromosomas fueron homogéneos y metacéntricos.

Palabras clave: colchicina, solución de Feulgen, cloroformo y cariotipo.

## ABSTRACT

The number and morphology of chromosomes in three species of cacti *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto, *Ferocactus pilosus* Galeotti (Werderm) and *Echinocactus grusonii* Hildm determined, are species found in a risk category. Chromosomes were observed in root cells pretreated with 0.05% colchicine in different times and in cold for 24-36 h; they fixed in Carnoy. The staining of chromosomes was done with Feulgen and crushed with propionic orcein 2%. *E. grusonii* only chromosomes were observed at metaphase, the diploid chromosome number was  $2n = 2x = 22$  in 2 hours colchicine. Chromosomes were homogeneous and metacentric.

Keywords: colchicine, Feulgen solution, chloroform and karyotype.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

La familia se divide en 4 subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae y Maihuenioidae (Nyffeler, 2002). La subfamilia Cactoideae incluye 85% de la diversidad de especies en la familia y exhibe las especies más exuberantes. La tribu Cacteae está incluida en esta subfamilia, que se encuentra principalmente en hábitats áridas o semiáridas en América del Norte (Bravo, 1978; Cota *et al.* 1996; Bravo-Hollis y Scheinvar, 2002) y en esta tribu están los generos *Ferocactus* Britton & Rose y *Echinocactus* Link & Otto. *E. platyacanthus* y *F. pilosus* están en la norma NOM-059-ECOL- 2010 en protección especial. Mientras *E. grusonii* se encuentra en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010).

Los estudios cromosómicos aportan información que ayuda a esclarecer las relaciones taxonómicas y filogenéticas; además muchas especies de cactáceas no han sido analizadas citológicamente y el número básico es  $x=11$  (Reyes-Valdez *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2009; Páez *et al.*, 2012). Páez *et al.* (2012) menciona que la mayoría de las especies presentan cariotipos simétricos y el 70% de las especies son diploides.

Reyes-Valdez *et al.* (2000) mencionan que la especie más estudiada es *Opuntia* que forma diploides ( $2n=2x=22$ ) hasta poliploides octaploides ( $2n=8x=88$ ). Pinkava *et al.* (1992) y Swanson (1958) menciona que la poliploidía o alteraciones del número básico de cromosomas es considerada uno de los factores determinantes en la evolución y clarificación taxonómica de las especies. Larrea-Alcázar (2007) indica que en las cactáceas se pueden encontrar diferentes niveles de ploidía siendo este un mecanismo rápido de especiación.

Grimaldo-Juárez *et al.* (2001) mencionan que la presencia de un número mayor de cromosomas metacéntricos en los cariotipos indica que éstos son poco evolucionados o primitivos y cuando los cariotipos están integrados por cromosomas asimétricos su evolución es considerada mayor.

La falta de información cromosómica y la necesidad de contribuir al conocimiento de las tres especies de cactáceas como recursos nativos de México, hizo que se propusiera el siguiente objetivo: describir y comparar las características cromosómicas de las tres especies y así poder identificarlas.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de semillas germinadas de *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus* que fueron donadas por la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala - Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y Centro Ecoturístico y de Educación Ambiental Sierra de Guadalupe.

### 4.2.2. Determinación del número de cromosomas

Se obtuvieron las raíces de plántulas sembradas con papel filtro (grado 40, WHATMAN®) en cajas Petri de vidrio (3.5X1.0 cm). El área de incubación, donde se colocaron las cajas Petri con las semillas, se mantuvo con temperatura de 26°C±2, luz constante e intensidad luminosa de 62.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Las raíces recolectadas para el pretratamiento presentaron color blanquecino y longitud de 0.5 a 1 cm.

Para la observación de los cromosomas se realizó:

1. **Pre-tratamiento:** las raíces colectadas se colocaron en cajas Petri de vidrio (3.5X1.0 cm) con papel filtro el cual se humedeció con colchicina al 0.05%, posteriormente las cajas se envolvieron en papel aluminio para que estuvieran en obscuridad por 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 h. También se pre-trataron en frío colocando las raíces en un termo con hielo (4°C) por 24 y 36 h.
2. **Fijación:** se realizó en Carnoy con etanol absoluto-ácido acético glacial-cloroformo en relación 3:1:1 (v/v). Utilizando tiempos de fijación de 24-48 h, posteriormente se almacenaron en etanol al 70% a temperatura ambiente por 5-10 d.
3. **Hidrólisis:** las raíces se colocaron en HCl 1N a 60°C por 11 min.

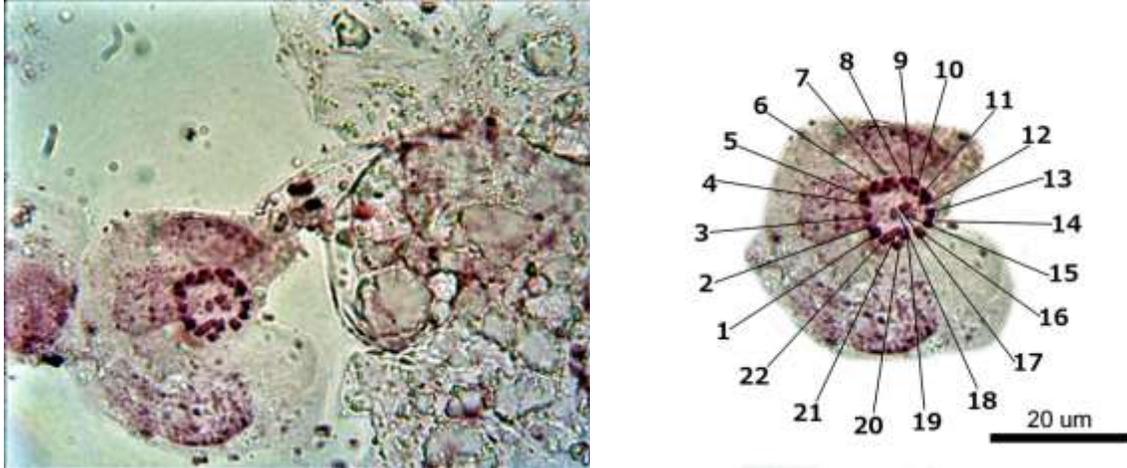
4. **Tinción:** las raíces se tiñeron con el reactivo de Feulgen, durante 5 min a 60°C. Posteriormente se colocaron en orceína propiónica 2% por periodos de 0.5 a 3.0 h.
5. **Preparación:** sobre el portaobjeto se coloca un segmento de la parte apical de la raíz y una gota de orceína al 2 %, se colocó sobre ambos un cubreobjeto se golpea hasta que el tejido es dispersado, posteriormente se observó al microscopio.
6. **Observación y determinación de los cromosomas:** las observaciones se hicieron en un microscopio Leitz Wetzlar modelo DIALUX 20 E, a 10, 40, 63 y 100X, se tomaron fotografías.
7. **La observación y el conteo de los cromosomas:** se hizo a partir de las fotografías, las cuales se observaron con el programa GIMP 2.8.4 (Wilcox et al. 2002).

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1. Número cromosómico

En *F. pilosus* lo que se observó fueron células con sus núcleos.

El número cromosómico somático observado en *E. grusonii* fue diploide ( $2x=2n=22$ ) esto se observó con pre-tratamiento colchicina 2 h (Figura 4.1) y los cromosomas de *E. platyacanthus* se observaron en profase tardía, los cromosomas apenas se alcanzan a distinguir ( $2n=22$ ) con el pre-tratamiento en frío por 24 h. Coincidiendo con lo obtenido por Cota y Wallace (1995) en algunas especies de *Echinocereus* Engelm. en las cuales observaron en cromosomas mitóticos diploides  $x=11$  ( $2n=22$ ), sin embargo en cinco variedades del género *E. engelmannii* (Parry ex Engelm.) Lem obtuvieron poliploides. Grimaldo-Juárez *et al.* (2001), en seis especies de *Hylocereus* spp (A.Berger) Britton & Rose. observaron un número cromosómico diploide ( $2n=2x=22$ ). Powell y Weedin (2001) encontraron en algunas especies de *Opuntia* Mill., *Echinocereus*, *Ancistrocactus tobuschii* W.T. Marshall ex Backeberg, *Coryphantha duncanii* (Hester) L. Benson y *Echinomastus warnockii* (L. Benson) Glass & Foster como número cromosómico  $n=11$ . Pinkava *et al.* (1992) en varias especies de cactáceas encontraron números cromosómicos de  $n=11$ . Cota *et al.*, (1996) en las 14 especies de *Ferocactus* encontraron un número cromosómico de  $x=11$ . Reyes-Valdez *et al.* (2000) en *Turbincarpus valdezianus* (Möller) Glass & Foster encontraron como número básico de los cromosomas  $x=11$ . Páez *et al.* (2012) en *Gymnocalycium saglionis* Britton es diploide con número gamético  $n= 11$  y somático  $2n=2x=22$ .



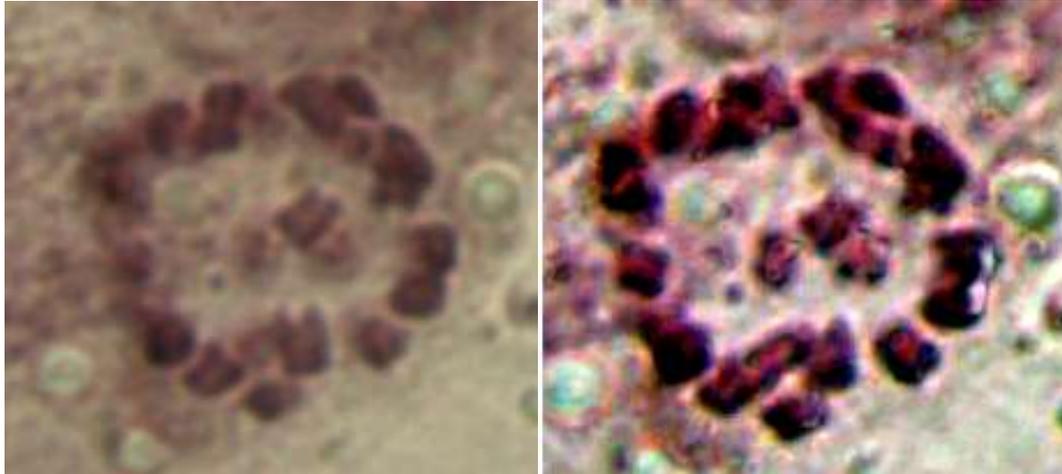
**Figura 4.1.** Cromosomas de ápices de raíz a 100x en *E. grusonii* en 2.0 h de colchicina.



**Figura 4.2.** Cromosomas en profase tardía de ápices de raíz a 63x en *E. platyacanthus* en 24 h frío.

#### 4.3.2. Morfología de los cromosomas

En *E. grusonii* la mayoría de sus cromosomas son uniformes metacéntricos. Majure y Ribbens (2012) en *Opuntia fragilis*, *O. humifusa* s.l., y *O. macrorhiza* s.l. los cromosomas de las tres especies fueron pequeños y la mayoría de forma homogénea, típicamente metacéntrica.



**Figura 4.3.** Morfología de los cromosomas a 100x en *E. grusonii* con un pre-tratamiento en 2 h de colchicina.

Cota, J. H. y R. S. Wallace (1995) en algunas especies de *Echinocereus* observaron cromosomas relativamente simétricos, la mayoría cromosomas metacéntricos. Observaron también satélites en los brazos cortos de los cromosomas. Cota *et al.*, (1996) en 14 especies de *Ferocactus*, sin estar incluido *F. pilosus*, obtuvieron cromosomas mitóticos en metafase los cuales fueron homogéneos en su morfología general, además en todas las especies se encontraron cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, con cinco cromosomas con cojinete y un par con satélites. Páez *et al.* (2012) en *Gymnocalycium saglionis* Britton observaron un cariotipo formado de 11 pares de cromosomas metacéntricos.

#### 4.4. CONCLUSIONES

Con los resultados que se obtuvieron se puede decir que tanto *E. grusonii* como *E. platyacanthus* son dipliodes.

*E. grusonii* tiene cromosomas homogéneos que van de ser pequeños metacéntricos.

#### 4.5. LITERATURA CITADA

- Baker, M. A., J. P. Rebman, B. D. Parfitt, D. J. Pinkava and A. D. Zimmerman. 2009. Chromosome numbers in some cacti of western north america—VIII. *Haseltonia*. 15: 117–134.
- Bravo, H. H. 1978. 2° ed. Las Cactáceas de México. Vol. 1 y 2<sup>da</sup>. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 2002. El interesante mundo de las cactáceas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Cota, J. H. and R. S. Wallace. 1995. Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia*. 48(2): 105-122.
- Cotal, J. H., J. P. Rebman and R. S. Wallace. 1996. Chromosome Numbers in *Ferocactus* (Cactaceae: Cactoideae). *Cytologia*. 61: 431-437.
- Grimaldo-Juárez, O., A. García-Velázquez, J. Ortiz-Cereceres y L. M. Ruiz-Posadas. 2001. Características cariotípicas de seis genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7(2): 177-195.
- Larrea-Alcázar, A. 2007. Estudios citogenéticos en Cactaceae de Argentina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 4(3): 7-9.
- Majure C. L. and E. Ribbens. 2012. Chromosome counts of *Opuntia* (Cactaceae), prickly pear cacti in the Midwestern United States and environmental factors restricting the distribution of *Opuntia fragilis*. *Haseltonia*. 17: 58-65.
- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany* 89(2): 312-326.
- Páez, V. de los A., A. R. Andrada, M. Elozzia y N.B. Muruaga. 2012. Número cromosómico y cariotipo de *Gymnocalycium saglionis* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 9(2): 24-28.

- Powell, A. M. and J. F. Weedon. 2001. Chromosome numbers in Chihuahuan Desert Cactaceae. III. Trans-Pecos Texas. *American Journal of Botany*. 88(3): 481-485.
- Pinkava, D. J., B. D. Parfitt, M. A. Backer and R. D. Worthington. 1992. Chromosome numbers in some cacti of North America VI, with nomenclatural changes. *Madroño*. 39:98-113.
- Reyes-Valdez, M. H., M. Gómez Martínez y H. T. García-Osuna. 2000. Número cromosómico y apareamiento meiótico en *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) Glass & Foster (Cactaceae). *Acta Botánica Mexicana*. 53: 17-25.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Fecha de consulta: 24-febrero-2011.
- Swanson, P. C. 1958. *Cytology and cytogenetics*. Prentice-Hall Inc. New York, USA.
- Wilcox, D.; Dove, B.; Mc David, D.; Greer, D. 2002. *UTHSCSA image tool for windows ver. 3.0*. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las características morfológicas de la semilla-plántula fueron similares para *E. grusonii*, *E. platyacanthus* y *F. pilosus*; con la excepción de *L. williamsii* que no tenía perispermo y el embrión abarcaba todo el espacio en la semilla.

La semilla fue piriforme para las cuatro especies.

Las cuatro especies tienen diferencias en el color, estructura de la testa y tamaño de la semilla-embrión (longitud, área y perímetro).

Las características morfológicas en estas especies se pueden utilizar como información para la clasificación de estas especies.

*Echinocactus* constituye un grupo heterogéneo debido a que las semillas de las dos especies variaron significativamente en su tamaño, color de la testa y forma de los cotiledones.

Las especies utilizadas variaron en peso volumétrico y peso de 1000 semillas.

El peso de mil semillas y el peso volumétrico son métodos seguros que podrán determinar la calidad física de la semilla y así poder obtener pruebas confiables y estandarizadas, para lograr resultados uniformes y repetibles.

El valor de esta investigación radicó en poder obtener los mejores tratamientos para el manejo de las semillas con el fin de obtener plántulas más vigorosas y un mayor éxito en campo.

Los métodos de desinfección fueron los adecuados para obtener semillas libres de patógenos.

El tetrazolio a una concentración de 0,1% fue la mejor para teñir los embriones de las cuatro especies.

Los sustratos tierra de monte-tezontle y arena fueron los mejores tratamientos para el tiempo de germinación y el porcentaje de germinación.

Se debe de escarificar las semillas de *E. platyacanthus* y *E. grusonii* para mejorar la germinación.

Se concluyó que el uso de esta técnica *in vitro* es una herramienta importante para estudiar y mantener germoplasma. También es un método que puede ayudar a producir mayor número de plantas para satisfacer los mercados y así reducir la presión antropogénica excesiva que sufren estas especies.

El mejor tratamiento para la formación de brotes en *E. platyacanthus* fue 0.1 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup>, en *E. grusonii* 0.01 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup> y en *F. pilosus* 0.1 ANA:1.0 2iP mg L<sup>-1</sup>.

El mejor tratamiento para la formación de raíz en *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* el mejor fue con MS sin reguladores.

El mejor tratamiento para la aclimatación fueron las plántulas de *E. platyacanthus*, *E. grusonii* y *F. pilosus* obtenidas del enraizamiento con MS sin reguladores y sembradas en tierra de monte con tezontle.

Con los resultados que se obtuvieron se puede decir que tanto *E. grusonii* como *E. platyacanthus* son dipliodes.

*E. grusonii* tiene cromosomas homogéneos que van de ser pequeños metacéntricos.