



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

**Escuela de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**ESTUDIOS MORFOLÓGICOS *IN VITRO* DE CLADODIOS DE *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE.**

*Tesis previa a la obtención del título de  
Ingeniera en Gestión Ambiental*

**Autora**

Silvia del Cisne Celi Riofrío

**Director**

Blgo. Máximo Oswaldo Moreira Palacios

**Loja-Ecuador**

2011

## **CERTIFICACIÓN**

Biólogo  
Máximo Oswaldo Moreira Palacios  
**DIRECTOR DE TESIS**

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Silvia del Cisne Celi Riofrío, previo a la obtención del título de INGENIERA EN GESTIÓN AMBIENTAL, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 29 de Junio de 2011

.....  
Blgo. Máximo Oswaldo Moreira Palacios  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **AUTORÍA**

La investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidas en la presente tesis son de exclusiva responsabilidad del autor.

Silvia del Cisne Celi Riofrío

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo primero que nada a mi Dios por darme fuerza para culminar esta etapa tan importante en mi vida, a toda mi familia en especial, a mis padres Arnovio y María por ser el timón principal en mi vida y porque a ellos les debo todo lo que soy, a mis Hermanos (as) Deisy, Diego, Katherine, Xavier, Karolina y Mishell a quienes a pesar de los problemas que tenemos como hermanos los quiero y aprecio mucho y siempre estarán en mi corazón a Anthony te quiero mucho gracias por creer en mí siempre, a Anita mi mejor amiga y a todas las personas especiales que en cada momento de mi vida me han sabido dar ánimos para culminar mi tesis. A todos mis amigos de la Unidad de Fisiología Vegetal que con su incondicional apoyo me han ayudado a culminar con éxito mis metas.

*Silvia del Cisne Celi Riofrío*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Técnica Particular de Loja, a la carrera de Gestión Ambiental a mis profesores y más personal perteneciente a la Institución que con sus enseñanzas y apoyo han contribuido a mi formación como profesional.

Al laboratorio de la Unidad de Fisiología Vegetal por los conocimientos adquiridos y por abrirme las puertas y contribuir en mis conocimientos como estudiante y brindarme el apoyo en la realización de mi proyecto de fin de carrera.

Al Blgo. Máximo Moreira por su gran orientación, apoyo y paciencia para la realización de mi tesis.

A Augusta por sus conocimientos impartidos para la finalización de mi tesis

A, Elizabeth, Rosita, Iván, Adriana y a todos las personas que conforman la Unidad de Fisiología Vegetal por su apoyo y orientación en la realización de mi tesis.

A la Sra. Magdalena Murillo por haber compartido conmigo sus conocimientos de histología los cuales me sirvieron para la culminación de mi tesis.

## **CONTRATO DE CESION DE DERECHO DE TESIS**

Yo, Silvia del Cisne Celi Riofrío declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice "Forman parte del patrimonio de la Universidad, la propiedad intelectual de las investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico, o institucional (operativo) de la Universidad".

Silvia del Cisne Celi Riofrío  
**AUTORA**

Blgo. Máximo Moreira Palacios  
**DIRECTOR DE TESIS**

## ÍNDICE

| Contenidos  | Pág. |
|---|------|
| <b>Certificación</b> .....  | i    |
| <b>Autoría</b> .....  | ii   |
| <b>Dedicatoria</b> .....  | iii  |
| <b>Agradecimientos</b> .....  | iv   |
| <b>Contrato de cesión de derechos de tesis</b> .....  | v    |
| <b>Índice</b> .....   | vi   |
| <b>Resumen</b> .....  | 1    |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 2    |
| <b>1.1. OBJETIVOS</b> .....   | 4    |
| 1.1.1 Objetivo General.....   | 4    |
| 1.1.2 Objetivos Específicos .....   | 4    |
| <b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | 5    |
| 2.1 Generalidades de la familia Cactaceae .....   | 5    |
| 2.1.1 Descripción de <i>H. ocamponis</i> .....  | 5    |
| 2.1.2 Distribución geográfica .....   | 6    |
| 2.1.3 Usos e importancia .....  | 6    |
| 2.2 Reguladores de crecimiento vegetal.....   | 7    |
| 2.2.1 Combinación de reguladores de crecimiento .....   | 8    |
| 2.2.2 Efecto residual de hormonas vegetales .....   | 8    |
| 2.3 Evaluación de tejidos vegetales en procesos de crecimiento .....  | 9    |
| 2.3.1 Estudios en cactáceas.....  | 9    |
| <b>3. METODOLOGÍA</b> .....   | 10   |
| 3.1 Evaluación del efecto residual de explantos sometidos a distinta<br>combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal transplantados<br>a MS base..... | 10   |
| 3.2 Estudios morfológicos e histológicos de explantos sometidos a dos<br>combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal .....                           | 10   |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....  | 15   |
| 4.1 Evaluación del efecto residual de explantos sometidos a distintas<br>combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal transplantado<br>a MS base..... | 15   |
| 4.2 Respuestas morfológicas .....   | 19   |
| 4.2.1 Explantos que presentan respuestas morfológicas .....   | 19   |
| 4.2.2 Formación y crecimiento de cladodios, raíces y callos sometidos a<br>diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal....             | 21   |
| 4.2.3 Análisis histológico.....   | 23   |
| 4.2.3.1 Observación: inicio del cultivo .....   | 24   |
| 4.2.3.2 Observaciones en el T1 a los 10,20 y 30 días.....   | 25   |
| 4.2.3.3 Observaciones en el T2 a los 10,20 y 30 días.....   | 27   |
| 4.2.3.4 Observaciones en el T3 a los 10,20 y 30 días.....   | 29   |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....    | 32 |
| <b>6. RECOMENDACIONES</b> ..... | 33 |

### **Índice de Cuadros**

|  |    |
|--|----|
| Cuadro.1. Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.  | 10 |
| Cuadro.2. Mejores combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal para cladodios y callos.....   | 11 |
| Cuadro.3. Formación de cladodios, raíces y callos en material expuesto a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal y de ese mismo material al trasplantarlo a medio MS base ..... | 18 |
| Cuadro.4. Formación y crecimiento de cladodios raíces y callos sometidos a dos combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal a los 10, 20 y 30 días de cultivados .....                          | 22 |

### **Índice de Figuras**

|   |    |
|---|----|
| Fig.1. Planta adulta y fruto de <i>H. ocamponis</i> . Catacocha–Loja .....  | 5  |
| Fig.2. Diferentes usos de pitaya roja ( <i>H. ocamponis</i> ) .....   | 7  |
| Fig.3. Evaluación de respuestas morfológicas, expuestas a reguladores de crecimiento a los 10, 20 y 30 días en tejidos de <i>H. ocamponis</i> ..... | 20 |
| Fig.4. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>H. ocamponis</i> : brote con hiperhidricidad formación de capa de polisacáridos .....                         | 21 |
| Fig.5. Observación histológica del estado inicial del cladodio .....  | 24 |
| Fig.6. Observaciones histológicas en el T1 a los 10, 20 y 30 días de sembrados. ....  | 26 |
| Fig.7. Observaciones histológicas en el T2 a los 10, 20 y 30 días de sembrados. ....  | 28 |
| Fig.8. Observaciones histológicas en el T3 a los 10, 20 y 30 días de sembrados. ....  | 30 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| <b>8. BIBLIOGRAFIA</b> ..... | 34 |
|------------------------------|----|

## RESUMEN

A pesar de la gran variedad de especies y diversidad de usos que tienen las cactáceas, muchas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción debido a problemas ambientales como la deforestación y expansión agrícola que afectan directamente en sus procesos reproductivos. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar los cambios morfológicos de *Hylocereus ocamponis* que se dan por causas del efecto residual; y también estudiar los cambios morfológicos e histológicos que suceden al formarse cladodios, callos y raíces al usar reguladores de crecimiento vegetal. Para el estudio sobre efecto residual, se repicaron cladodios desde medios con diez combinaciones de reguladores de crecimiento a medio MS base y se hizo el seguimiento de sus distintas respuestas, encontrándose que la mayor formación de cladodios y raíces fue en los explantos repicados del MS+1  $\mu\text{M}$  BAP a MS base con 0,67 brotes y 1,83 raíces por explanto, respectivamente; y la mejor formación de callos fue en los explantos repicados del medio MS+9 $\mu\text{M}$  2,4-D+4,6 $\mu\text{M}$  KIN a medio MS base con 0,84 callos por explanto. Para el estudio de cambios morfológicos asociados a los histológicos se sembró la parte apical de cladodios en medio MS libre y con dos combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal, teniendo que las mejores respuestas fueron en el MS base con 3,60 raíces por explanto, en MS+TDZ 0,5  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$  NAA con 2,67 brotes por explanto y en MS+9  $\mu\text{M}$  2,4-D + 4,6  $\mu\text{M}$  KIN con 2,87 callos por explanto; los explantos provenientes de estos tres tratamientos también se los analizó histológicamente a través de secciones longitudinales y transversales observándose células meristemáticas, formación de elementos de conducción, células mucilaginosas y la formación de raíces entre otras estructuras, las cuales se las pudo correlacionar con las respuestas antes mencionadas.

**Palabras claves:** *H. ocamponis*, efecto residual, reguladores de crecimiento vegetal, análisis histológico, MS, 2,4-D; KIN; TDZ; NAA.

**Siglas:** MS: Murashige y Skoog, 1962; 2,4-D: 2,4-Acido Dicloro-fenoxiacético; KIN: Kinetina; TDZ: Thidiazuron (1-fenil-1,3,4-tiadiazol-5il)-urea); NAA: Acido- $\alpha$ -Naftalenacético.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es considerada un grupo monofilético que contiene unos 120 géneros y 2.000 especies de plantas suculentas y perennes exclusivas de América (Anderson 2001). En Ecuador se han reportado 17 géneros de cactáceas con 41 especies que se encuentran distribuidas en zonas áridas de las cuales 6 son endémicas (Madsen 2002). La mayoría están ubicadas en el sur del país (Cerón 2003). Las cactáceas son plantas que cuentan con diversas adaptaciones morfológicas, estructurales y fisiológicas para condiciones de baja humedad, además presentan gran diversidad de formas que van desde cactus epifitos y arbustivos hasta especies con tallos suculentos globulares y columnares (Liogier 1994; Nyffeler 2002; Terrazas & Mauseth 2002).

Un gran número de especies de cactus se encuentran actualmente amenazadas o en peligro de extinción. Es así como un total de 35 especies están incluidas en el Apéndice I de CITES, en el libro de las especies en peligro de extinción y el resto de la familia Cactaceae se incluye en el Apéndice II dentro de la cual encontramos a la pitaya roja, *H. ocamponis*. (CITES 2010; Godínez-Álvarez *et al.* 2003).

La pitaya roja es una fruta considerada exótica, por su aspecto llamativo. Es originaria del continente americano, pero se ha difundido a diversos países de los cuatro continentes a partir de la conquista (Bravo-Hollis 1978). A pesar de ser de zonas tropicales puede adaptarse a medios de baja precipitación.

El fruto de la pitaya contiene propiedades nutricionales semejantes a la naranja (Castillo & Calix 1996), además de consumirse como fruta fresca, se utiliza para obtener diversos alimentos como mermeladas y bebidas refrescantes, productos de repostería y en la fabricación de vinos (Argüello & Jiménez 1997; López 2004). Los tallos jóvenes pueden ser consumidos como vegetales y la planta completa puede ser utilizada como forraje para rumiantes. Se usa para formar cercos vivos en los linderos y las ramas secas son empleadas como leña.

La situación actual de las cactáceas en el mundo obliga a pensar en alternativas de propagación y manejo que permitan su conservación a largo plazo, una de esas formas es utilizando las herramientas de cultivo *in vitro*. Con esa herramienta se puede evaluar el efecto residual de reguladores de crecimiento usados en explantos y se las puede propagar utilizando distintas combinaciones que induzcan diferentes respuestas.

Aunque no se han encontrado reportes formales sobre el efecto residual de reguladores de crecimiento en cactáceas en condiciones *in vitro*, algunos estudios mencionan su alta capacidad de proliferación posterior a la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal (Tisserat 1985; Mauseth 1979; Ramírez-Serrano & Soltero-Quintana 2007). Estos estudios a más de los conocimientos que se generen podrían tener una implicación muy importante en costos de propagación de la misma.

En cuanto a la propagación *in vitro* esta ha sido estudiada en muchas especies de cactáceas con formación de cladodios (Dávila-Figueroa *et al.* 2005), de raíces (Pérez-Molphe *et al.* 1998), de callos (Pelah *et al.* 2002), metabolitos (Morales-Rubio *et al.* 2010) entre otros, sin embargo no se han encontrado reportes en *H. ocamponis* que evalúen procesos morfológicos e histológicos. Con las herramientas histológicas podemos comprender un poco más de los diferentes procesos de desarrollo a nivel tisular y celular que se presentan en los tejidos y asociarlos con sus distintas respuestas de formación de órganos, al ser influidos por distintos tratamientos de hormonas vegetales.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1.OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar cambios morfológicos *in vitro* en cladodios de *Hylocereus ocamponis*.

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Evaluar el efecto residual de explantos transferidos a medio MS base previa exposición a reguladores de crecimiento vegetal
- Estudiar los cambios morfológicos e histológicos de explantos sometidos a dos combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. Generalidades de la familia Cactaceae

Las cactáceas o cactus presentan adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten acumular agua durante los meses de sequía y al mismo tiempo evitar la evapotranspiración (Bravo-Hollis & Scheinvar 1995; Glafiro *et al* 2008) debido al medio desértico en el que crecen. En la evolución de sus estructuras han adaptado diferentes tendencias morfológicas como: reducción del tallo, modificaciones de las hojas y cambio de simetría de las flores, tendencias que en conjunto han llevado a establecer posibles líneas filogenéticas (Bravo-Hollis 1978).

Dentro del grupo de las cactáceas existe una gran diversidad de tallos, éstos varían mucho en tamaño y forma según la especie. El tallo puede estar constituido por segmentos (cladodios) (Rodríguez & Apezteguía 1985; Ortiz *et al.*, 2009). Existen tallos arbóreos grandes, bien definidos como en el caso de *Hylocereus*. En la mayoría de los cactus las hojas están ausentes o son caedizas y muy rudimentarias, reduciéndose a pequeñas escamas. Sus flores son de atractivos y brillantes colores. La mayoría de las veces las flores son abocinadas o campanuladas y con menos frecuencia presentan forma de copa. Todas las estructuras de las flores están determinadas por la sequía y por las modalidades de polinización (Bravo-Hollis & Scheinvar 1995). Las raíces de los cactus son originalmente terminales y fuertes. La raíz principal es de forma cónica se halla muy ramificada dando lugar a un sistema radicular esparcido y sirven de sostén al tutor donde se adhieren (Paniagua 1980; Bravo-Hollis & Scheinvar 1995; OIRSA 2000).

#### 2.1.1. Descripción de *H. ocamponis*



**Fig. 1:** *H. ocamponis* a) Planta adulta; b) fruto. Catacocha-Loja

Los tallos de *H. ocamponis* son suculentos, contienen fibra, mucha agua y nutrientes. Son triangulares lo cual es característico de especies en climas secos (Fig 1a). Presentan además espinas pequeñas en las areolas. Posee dos

tipos de raíces: las raíces primarias, penetran en el suelo y alimentan a la planta y las raíces secundarias o adventicias, nacen en la parte aérea de la planta y su función es de sostén, para eso se adhieren a la superficie de tutores como piedras o muros (INTA 1996; Ramírez 2006 en Gusmán 2005). Se ha comprobado que los tallos colgantes son los que más producen flores y frutos (Pietri 1993)

El fruto es una baya de forma oblonga o redondeada con brácteas (Fig. 1b), cuyas características más apreciadas son: su peso, comúnmente de más de 250 g; el color de su cáscara, que puede ser de varias tonalidades de rojo o amarillo; la pulpa blanquecina o de tonos rojizos; las semillas pequeñas, de 1-2 mm; la carencia de espinas en la cáscara (Castillo & Calix 1996; OIRSA 2000). Sus semillas son ovoides, cubiertas por una cutícula, aparecen lisas y con un brillo negro (Madsen 1989).

### **2.1.2. Distribución geográfica.**

Las especies de la Familia Cactaceae son nativas del continente americano del litoral hasta los 4.000 m s.n.m, distribuidas desde México hasta el norte de Perú tanto en partes húmedas como calientes, cuyo centro de diversidad es en la Región Caribeña y América Central (Madsen, 1989; OIRSA 2000). La mayor variedad de cactus se encuentran en las regiones desérticas, semidesérticas a veces cubiertas de bosques secos, chaparrales o matorrales espinosos de América del Norte y de Centroamérica, y son capaces de llegar a dominar las asociaciones vegetales y determinar el paisaje (Ríha & Subik 1991; Anderson 2001). Hay numerosas especies y variedades de las cuales algunas están localizadas en pequeñas áreas, mientras otras se distribuyen en regiones más bastas. (Paniagua 1980; Rodríguez 2000).

### **2.1.3. Usos e importancia**

Aunque en Ecuador es poco conocida; se la ha usado para alimento humano y como forraje para ganado, esta fruta tiene demanda en el mercado internacional como fruta fresca y como pulpa congelada. Según López (2004) todas las partes de la planta se pueden utilizar en diversos fines, la pulpa contiene un aceite que evita los cólicos ayudando al funcionamiento del estomago e intestino, también contiene una sustancia llamada cactina que actúa como tonificante del corazón y como calmante de los nervios; la cáscara del fruto se puede usar como forraje para el ganado; del jugo concentrado de los tallos se puede extraer jabón (Fig. 2).

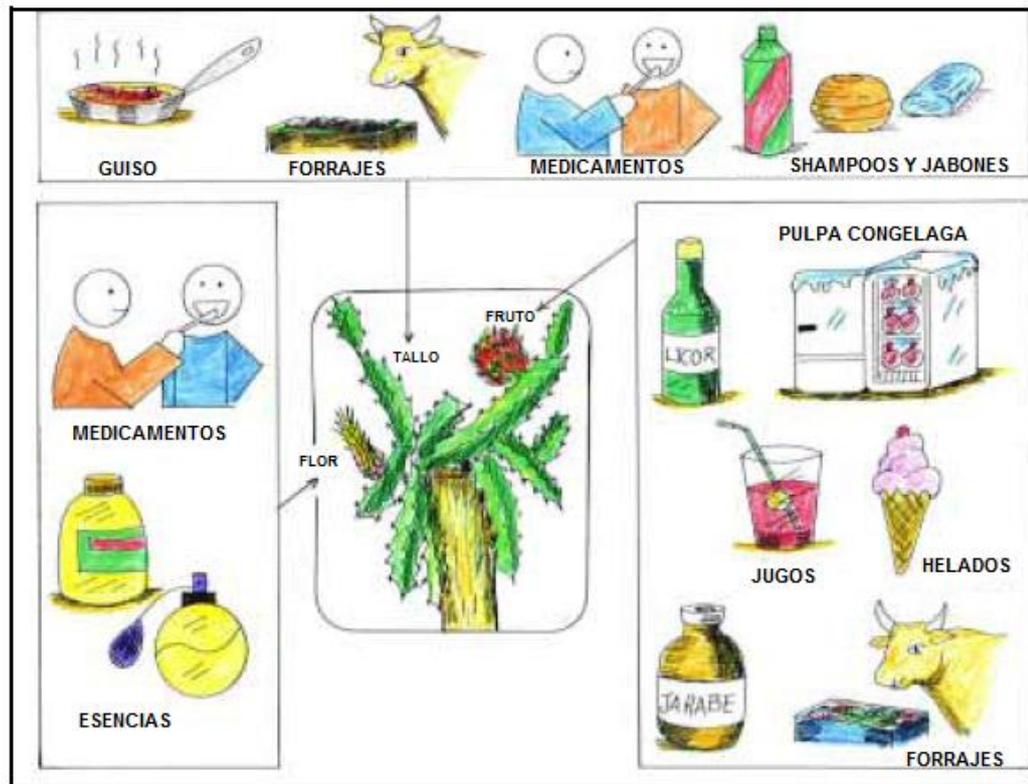


Fig. 2.- Diferentes usos de pitaya roja (*H. ocamponis*). Fuente: UNA/FAGRO

## 2.2. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel importante en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel del órgano, tejido y célula, pues actualmente se reconoce que la mayor actividad fisiológica de la planta está medida por los reguladores de crecimiento (Bidwell 1979). Estos procesos fisiológicos pueden ser afectados por más de un tipo de hormonas vegetales, puede ocurrir que en algunos casos los efectos fisiológicos de las hormonas se complementen, pero en otras se contrarresten. Por otra parte una misma hormona vegetal puede ejercer efectos completamente distintos, incluso opuestos, dependiendo de la concentración en que esté presente en los distintos tejidos vegetales (Pérez *et al.* 2003). Las hormonas de crecimiento son sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra parte siendo el sitio donde ejercen un proceso fisiológico específico (Álvarez 1998).

Dentro de estas hormonas vegetales tenemos las siguientes:

**Auxinas:** La palabra auxina deriva del término griego "auxein", que significa "crecer", son sustancias químicamente relacionadas con el ácido indolacético, el cual parece ser la auxina principal de muchas plantas (Pérez *et al.* 2003). En las células vegetales provocan efectos fisiológicos como el enraizamiento y la elongación, influyen en la dominancia apical, retrasan la senescencia de

hojas, crecimiento de los tallos y la maduración de frutos (Lira 2000; Pérez *et al.* 2003). Cuando a un tejido le suministran auxinas algunas respuestas se observan en periodos de tiempo cortos inferiores a 15 minutos, mientras que para observar otros hay que dejar que trascurren periodos de tiempos más largos (Barceló *et al.* 2007).

**Citoquininas:** Las citoquininas afectan fundamentalmente el proceso de división celular, promueven la formación de yemas, rompen la dormición apical, induciendo por tanto la brotación de las yemas laterales y favoreciendo así la ramificación en la planta (Pérez *et al.* 2003). Las citoquininas son prácticamente inmóviles y son producidas continuamente en las raíces, sin embargo la presencia de citoquininas en el xilema y floema de la planta indican que estas hormonas se transportan a través de ambos tejidos (Barceló *et al.* 2007). A veces las citoquininas estimulan la formación de raíces laterales a las mismas concentraciones que inhiben el crecimiento de la raíz principal (Barceló *et al.* 2007).

### **2.2.1. Combinación de reguladores de crecimiento.**

En el cultivo *in vitro* es necesario el suministro de reguladores de crecimiento exógenos, los cuales se pueden utilizar solos o combinados; y dependiendo de la especie y el tipo de tejido a inducir, se utilizará el tipo y concentración del regulador hormonal (Pierik 1990). Las combinaciones que se utilicen podrían depender de si son especies monocotiledóneas o dicotiledóneas ya que se ha encontrado patrones como que una alta concentración de auxinas con una baja de citoquininas genera formación de raíces en dicotiledóneas o callos en monocotiledóneas. El tipo de auxina o citoquinina que se utilice también determinará una respuesta.

### **2.2.2. Efecto residual de hormonas vegetales.**

Según Barceló (2007), la concentración de auxinas en las plantas puede regularse no solo por su tasa de síntesis y la velocidad de transporte hacia y desde el órgano que se considere, sino por los mecanismos de inactivación. En las citoquininas la oxidación de la cadena lateral es lo más frecuente que puede sucederle a esta hormona aplicada exógenamente a un tejido, como consecuencia se pierde la actividad citoquinina y desaparecen rápidamente como citoquininas libres, sin embargo permanecen durante mucho tiempo los 7, 9-glucósidos que son metabolitos muy estables y pueden ser formas de almacenamiento, aunque no se conoce exactamente su papel.

Quintana *et al.* (1999) estudiaron el efecto residual en explantos de *Crotalaria retusa* los cuales fueron sometidos a enraizadores y no presentaron respuestas, sin embargo al ser sembrados en medio libre de hormonas se produjo un buen enraizamiento. Otro estudio sobre efecto residual de reguladores de crecimiento vegetal es el de Olivera *et al.* (2000) quienes evaluaron la respuesta organogénica de *Gerbera jamesonii* al aplicar

diferentes concentraciones de bencialminopurina, cinetina y tidiazuron, al aclimatar las plantas obtenidas se observó mejor sobrevivencia de las producidas con cinetina, aduciéndolo como un efecto residual. Yánez (2010) en banano encontraron formación de brotes aduciendo al uso previo de brasinolida en la fase de multiplicación pero según el autor al repicar los nuevos brotes estos pueden surgir por acción residual de la citoquinina a la que fueron expuestos mientras se encontraban en la fase de multiplicación o a la acción de los reguladores empleados en la fase de enraizamiento.

Tisserat (1985) indica que cualquier planta que se desarrolle por efecto de reguladores de crecimiento residual será fácilmente adaptable a condiciones ambientales al transferirlas a un sustrato de suelo y materia orgánica.

### **2.3. Evaluación de tejidos vegetales en procesos de crecimiento.**

Una de las maneras de evaluar los cambios morfológicos en los tejidos es utilizando técnicas histológicas que posibilitan su estudio en microscopio (Aimale & Gatti 2010), permitiendo interpretar la forma en que se relacionan estructural y funcionalmente los tejidos. Según Pierik (1990), la examinación por microscopía del tejido en diferentes etapas del cultivo puede contribuir a comprender la secuencia del desarrollo de la plántula.

Para aplicar estas técnicas se siguen seis pasos que comprenden la fijación, deshidratación, inclusión, corte del tejido, montaje y coloración de la muestra.

#### **2.3.1 Estudios en cactáceas.**

A pesar de que los cactus han despertado curiosidad académica para su estudio *in vitro*, éstos no han sido objeto de investigación que redunden en resultados prácticos en un gran número de especies (Hubstenberger *et al.* 1992). Los primeros estudios del cultivo *in vitro* en cactáceas analizan la formación de callo y su proliferación (Nitsch 1951; Colomas 1971; Minocha & Mehra 1974 citados por Hubstenberger *et al.* 1992). Kolar *et al.* (1976), trabajando con *Mammillaria woodsi* fueron los primeros en informar de la micropropagación de una Cactaceae *in vitro*. Algunos de los más importantes trabajos fueron mencionados en la introducción de este trabajo.

Según Rubluo *et al.* (1996) más de 80 especies de esta familia han sido micropropagadas con diversos grados de éxito. Un ejemplo de éxito en la micropropagación de cactáceas es el de Rubluo *et al.* (1993), que evitaron la extinción *Mammillaria san-angelensis* especie de la cual existían solo cinco individuos en las poblaciones naturales. Las investigaciones efectuadas por estos autores permitieron no solo la propagación masiva de esta especie, sino su restablecimiento al sitio de origen (Rubluo *et al.* 1996).

### 3. METODOLOGÍA

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Ecología de la UTPL. Se realizaron dos procesos distintos. Primero se vio el efecto residual haciendo un seguimiento de explantos expuestos a reguladores de crecimiento y repicados a medio MS libre de hormonas observando las distintas respuestas que generaban. La segunda manipulación fue con nuevas plantas, de explantos germinados, se sembró la parte apical de estos en medio MS base (control) y en MS con dos combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal para evaluar sus cambios morfológicos e histológicos.

#### 3.1 Evaluación del efecto residual de explantos sometidos a distintas combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal transplantados a MS base

Para evaluar el efecto residual de las hormonas de crecimiento se partió de diez combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal en medio MS (Murashige & Skoog 1962) realizadas por Moreira (datos no publicados) (Cuadro 1), en esos medios se mantuvieron por 3-4 meses y luego fueron repicados a medio MS base. Se evaluó la formación de cladodios, raíces y callos. Se tomaron datos a los 45, 90 y 135 días de ser sembrados. En cada frasco se sembraron cuatro individuos, constituyendo cada frasco una repetición.

**Cuadro1.** Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (Moreira, datos no publicados)

| <b>Código</b> | <b>Combinación</b>            |
|---------------|-------------------------------|
| <b>T1</b>     | MS base                       |
| <b>T2</b>     | MS base + 0,5µM NAA           |
| <b>T3</b>     | MS + TDZ 0,1 µ M              |
| <b>T4</b>     | MS + TDZ 0,1 µ M + 0,5 µM NAA |
| <b>T5</b>     | MS + TDZ 0,5 µM               |
| <b>T6</b>     | MS + TDZ 0,5 + 0,5 µM NAA     |
| <b>T7</b>     | MS + BAP1 µM                  |
| <b>T8</b>     | MS + BAP 1 µM + 0,5 µM NAA    |
| <b>T9</b>     | MS + BAP 5 µM                 |
| <b>T10</b>    | MS + 9 µM 2-4D + 4,6 µM KIN   |

#### 3.2 Estudios morfológicos e histológicos de explantos sometidos a dos combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal

De los tratamientos realizados por Moreira (datos sin publicar), se escogieron los mejores tratamientos inductores de callos, cladodios y el control (MS base), que produjo gran cantidad de raíces, (Cuadro2) para relacionarlos con los cambios a nivel histológico.

| Efecto residual | Combinación de reguladores            | <i>In vitro</i> |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| T1              | MS base                               | T1              |
| T6              | MS + TDZ 0,5 + 0,5 $\mu$ M NAA        | T2              |
| T10             | MS + 9 $\mu$ M 2-4D + 4,6 $\mu$ M KIN | T3              |

**Cuadro2.** Mejores combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal para cladodios y callos (Moreira, datos no publicados)

### ***Estudios morfológicos***

El material de partida fueron yemas apicales de 0,5cm de plántulas germinadas *in vitro* alrededor de siete meses de cultivadas. Se tomaron datos de formación y crecimiento de cladodios, raíces y callos por explanto; a los 10, 20 y 30 días de sembrados, para todo el ensayo se realizan tres repeticiones; cada una consta de cinco frascos, con cuatro explantos. El cultivo se mantiene a 23° C, con fotoperiodo de 12 horas luz.

Se utilizó el medio MS solidificado con 7  $gl^{-1}$  de agar. Como fuente de carbono, azúcar en una concentración de 20  $gl^{-1}$ , y se ajustaron a pH 5.8. El autoclavado se realiza a una presión de 1  $kg/cm^2$  a 120°C, durante 20 minutos.

### ***Evaluación de cambios histológicos de los explantos***

Para el estudio histológico se utilizaron igualmente los explantos provenientes de los tres medios (inductores de callos, cladodios y el control) evaluando la porción apical de cada uno. Los cortes se realizaron antes de iniciar el cultivo y a los 10, 20 y 30 días de iniciado el cultivo siguiendo los pasos a continuación citados:

**1. Fijación,** previo a la fijación de cada porción en FAA por 24 horas, se eliminó todas las raicillas. Las concentraciones del FAA son: Formaldehído 40%, 5ml; Alcohol 50%, 90ml; Acido acético puro 5ml (D' Ambrogio 1970).

**2. Deshidratación del tejido,** se realiza de la siguiente manera:

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Alcohol 25%            | 30 minutos |
| Alcohol 50%            | 30 minutos |
| Alcohol 70%            | 30 minutos |
| Alcohol 95%            | 30 minutos |
| Alcohol 100%           | 2 horas    |
| Alcohol 100%           | 3 horas    |
| Alcohol 100%           | 12 horas   |
| <b>Clarificación</b>   |            |
| Etanol: Xilol<br>(1:1) | 3 horas    |
| Xilol                  | 45 min     |
| Xilol                  | 2horas     |
| Xilol                  | 4horas     |

**3. Inclusión,** los explantos se pasan a xilol puro agregando escamas de parafina (1/1) y son almacenados a 58 °C por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, al explanto se lo pasa a moldes con parafina pura (Paraplast Plus) derretida (Ramírez *et al.* 2005). Los explantos se colocaron en forma transversal y longitudinal y se dejaron solidificar.

**4. Corte del tejido,** se realizaron cortes en micrótopo de 10 µm. Cada corte se coloca en baño maría para el estiramiento completo.

**5. Montaje,** se lo pesca con un portaobjetos que pasa a una estufa o placa calentadora a 60°C por media hora para eliminar la parafina y poder aplicar las tinciones.

**6. Coloración,** se realizaron dos tinciones que se detallan a continuación:

**Tinción con Hematoxilina- Eosina:** colorea de azul oscuro al núcleo en reposo, a las mitocondrias y a algunas estructuras del citoplasma; y lo colorea de rosa anaranjado al citoplasma, logrando un buen contraste con el núcleo. Ideal para meristemas apicales (D' Ambrogio 1970). Se aplica de la siguiente manera:

| <b>COMPUESTO</b>        | <b>TIEMPO</b> |
|-------------------------|---------------|
| Xilol I                 | 1<br>minuto   |
| Xilol II                | 1<br>minuto   |
| Alcohol 100%            | 1<br>minuto   |
| Alcohol 96%             | 1<br>minuto   |
| Alcohol 86%             | 1<br>minuto   |
| Lavado H2O<br>destilada | 1<br>minuto   |
| <b>Tinción</b>          |               |
| Hematoxilina            | 1<br>minuto   |
| Lavado H2O de<br>grifo  | 1<br>minuto   |
| Eosina                  | 1<br>minuto   |
| <b>Montaje</b>          |               |
| Alcohol 86%             | 1<br>minuto   |
| Alcohol 96%             | 1<br>minuto   |
| Alcohol 100%            | 1<br>minuto   |

**Tinción con Azul de Toluidina:** colorea al citoplasma de azul, a las lipoproteínas de color rojo, el núcleo se ve azul verdoso, los tubos cribosos y células acompañantes se observan color magenta, las paredes lignificadas se ven con color rosa o púrpura (D' Ambrogio 1970). Se aplica de la siguiente manera:

| <b>COMPUESTO</b>    | <b>TIEMPO</b> |
|---------------------|---------------|
| Xilol               | 5 minutos     |
| Etanol: Xilol (1:1) | 5 minutos     |
| Etanol 100%         | 5 minutos     |
| Etanol 70%          | 5 minutos     |

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| Etanol I 25%         | 5 minutos              |
| Lavado H2O destilada | 5 minutos              |
| <b>Tinción</b>       |                        |
| Azul de Toluidina    | A partir de 15 minutos |
| Lavado H2O destilada | 5 minuto               |
| <b>Montaje</b>       |                        |
| Etanol I 25%         | 5 minutos              |
| Etanol 70%           | 5 minutos              |
| Alcohol 100%         | 5 minutos              |
| Etanol: Xilol (1:1)  | 5 minutos              |
| Xilol                | 5 minutos              |

Finalmente se deja secar por unos minutos las placas y se añade Histofluid, sustancia pegante, se coloca el cubre objetos, y se deja secar por 1 a 3 minutos.

Los datos se tomaron en un microscopio óptico modelo Labomed Lx 400 y con aumentos de 10x y 20x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CANON G11. De cada corte se hicieron tres repeticiones.

### **Análisis Estadístico**

**Anova:** Prueba de Duncan y Tukey con un intervalo de confianza de un 95%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Evaluación del efecto residual de explantos sometidos a distintas combinaciones de hormonas de crecimiento vegetal transplantados a MS base

En muchos grupos de plantas existe un efecto residual de los reguladores de crecimiento utilizados, observándose que explantos expuestos a alguna combinación de reguladores de crecimiento y que al ser transplantados a medio libre de hormonas siguen generando nuevas estructuras como cuando estaban expuestos a esas combinaciones (Ramírez-Serrano & Soltero-Quintana 2007), esto se cumple en algunas Cactáceas que incluso sin usar previamente hormonas vegetales generan brotes o raíces (Mauseth & Hampering 1975). Esto a más de permitir reducir costos de propagación nos permite conocer más sobre el comportamiento fisiológico de determinadas especies.

Los explantos de *H. ocamponis* provenientes de diez tratamientos distintos (cuadro. 1) y transplantados a medio MS base generaron cladodios, raíces y callos desde los 45 a 135 días, observándose sobretodo poca variación pasados los 90 días, por eso se decidió escoger los datos obtenidos a los 90 días para evaluar el efecto residual. Una de las posibles causas es que en el medio de cultivo, sustrato de los explantos, se haya dado la sedimentación o transformación de algunos de sus minerales por el paso del tiempo (Von Arnold *et al.* 2002); al respecto Salinas (2009) indica que es necesario el trasplante a otro medio de cultivo pasadas las 4 a 8 semanas.

Aunque el efecto residual en las tasas de multiplicación es poco conocido (Barboza & Caldas 2001; Moreira *et al.* 2003), para su estudio recomiendan la transferencia desde medio con reguladores de crecimiento vegetal a medios sin hormonas, lo que es suficiente para estimular la diferenciación (Tisserat 1985). Por ejemplo al usar el placobutrazol (PBZ) en medio de multiplicación líquido durante cinco sub cultivos de *Musa sp.*, con una frecuencia de cinco semanas, no tuvieron un efecto residual, en la elongación de la raíz, ni mostraron variación en los estados de aclimatación (Albany *et al.* 2005). En cactáceas interesantes respuestas de formación de raíces han sido observadas al trasplantar a medios libres de hormonas (Rubluo *et al.* 1993, Choreño - Tapia *et al.* 2002).

La mejor **formación de cladodios** se dio en los explantos repicados del T7 a medio MS base (Cuadro 2) con 0.67 cladodios por explanto, esto puede deberse a que las citoquininas solas pueden ser más beneficiosas que combinadas (George & Sherrington 1984). Sin embargo el T7 al ser evaluado en la aplicación directa de reguladores de crecimiento no generó gran cantidad de cladodios/explanto (0.15) siendo los más altos el T5 y T9 con 0.4 y 0.49 respectivamente. El T6 al ser transferido a medio MS base se obtuvo 0.50 brotes/explanto, en este tratamiento previo su transferencia se pudo observar la presencia de macizos de proliferación de brotes. Aunque no se han

encontrado reportes de efecto residual con TDZ, las respuestas que se han obtenido al usar BAP sola o combinada con NAA son similares (Ojeda-Zacarías *et al.* 2006, Jacyna & Barnard 2008), o al usar GA con NAA (Duarte *et al.* 2009) estos últimos indican que ese efecto residual puede deberse a la regulación de niveles endógenos de citoquininas, llevada a cabo por las auxinas.

El TDZ es una de las sustancias conocidas por su alta acción citoquinina, siendo mayor su actividad a la zeatina, la bencilaminopurina y la kinetina; ello posiblemente porque el TDZ actúa estimulando la síntesis de citoquininas endógenas y de otros metabolitos afines a ellas (Mok *et al.* 1982). Además, el TDZ se reporta como altamente resistente a la degradación por acción de la enzima citoquinina oxidasa (Mok *et al.* 1987), y esa posiblemente es la causa de los efectos encontrados en esta investigación.

Los cladodios provenientes de medio MS base (control del primer ensayo) con 0.30 cladodios por explanto al ser repicados a MS base produjeron 0.62 cladodios por explanto (Cuadro. 2), siendo significativamente diferentes de los otros tratamientos. Aunque Mauseth & Hampering (1975) ya indica que se pueden generar brotes o raíces sin usar previamente hormonas vegetales, no existe una clara definición porque al ser subcultivados aumenta la producción de los mismos, sin embargo podría ser una buena herramienta de multiplicación de este material.

La mejor **formación de raíces** se presenta en los explantos repicados del T6 y T7 a Medio base (Cuadro 2) con 2 y 1.83 raíces/explanto respectivamente; mostrando que la combinación de TDZ y NAA en concentraciones iguales son capaces de inducir mejor formación de raíces al trasplantarlos en medio MS base. Según Passey *et al.* (2003), el TDZ sólo y en altas concentraciones puede inhibir la formación de raíces, esto se observa en el T5 original y sus repicadas (Cuadro 2). Las raíces formadas por el T7, que es con BAP, eran fuertes y de gran tamaño, lo cual no concuerda con Mauseth & Hampering (1975), que señala que la BAP puede inducir la formación de raíces con mal formaciones y además tardíamente. Similares respuestas se han encontrado en cactáceas al utilizar NAA y BAP sin observar respuestas de formación de raíces y que al ser transplantados a medio MS base han obtenido buena producción de éstas (Ruvalcaba-Ruiz *et al.* 2010, Rodríguez 2006). Todas las raíces observadas fueron blancas, fibrosas y con numerosas raicillas.

Al comparar las respuestas generadas en los tratamientos expuestos a reguladores de crecimiento vegetal con los explantos repicados a medio MS base, se observa que el T9 y T1 son los que mejor respondieron con 1.38 y 1.17 raíces por explanto, respectivamente, pero al ser repicados a medio MS base disminuyó su producción (Cuadro.2). Esto no concuerda con Garcés (2003), que al cultivar brotes de *Eriosyce aurata* en medio MS base no tuvo enraizamiento, pero al repicarlos de nuevo a MS base se dio buen enraizamiento. La producción de raíces en cactáceas se da de forma espontánea (Clayton *et al.* 1990), posiblemente es un proceso adaptativo a los

ecosistemas áridos en los que se encuentran, además Rubluo *et al.* (2002) mencionan que estas poseen altas concentraciones endógenas de auxinas.

**Cuadro 3.** Formación de cladodios, raíces y callos en material expuesto a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal y de ese mismo material al trasplantarlo a medio MS base

| Combinaciones de reguladores de crecimiento |                      |                      |                      |                        |                      |              | Explantos expuestos a combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (Moreira, datos no publicados) | Explantos sembrados en MS libre de hormonas de crecimiento vegetal |                     |                        |                     |                     |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|--------------|--|--|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| Trat  | TDZ<br>$\mu\text{M}$ | BAP<br>$\mu\text{M}$ | NAA<br>$\mu\text{M}$ | 2,4-D<br>$\mu\text{M}$ | KIN<br>$\mu\text{M}$ | #<br>frascos | Formación de cladodios   | Formación de raíces  | Formación de callos | Formación de cladodios | Formación de raíces | Formación de callos |
| 1   | —                    | —                    | —                    | —                      | —                    | 5            | 0.30±0.09ab  | <b>1.18±0.26ab</b>   | 0±0c                | 0.62±0.32ab            | 0.86±0.06abc        | 0.07±0.07b          |
| 2   | —                    | —                    | 0,5                  | —                      | —                    | 17           | 0.13±0.04bc  | 0.78±0.11cd  | 0.4±0.02c           | 0.48±0.22ab            | 1.45±0.08abc        | 0.01±0.05b          |
| 3   | 0,1                  | —                    | —                    | —                      | —                    | 32           | 0.21±0.05bc  | 0.78±0.14cd  | 0±0c                | 0.47±0.20ab            | 1.52±0.09ab         | 0.00±0.00b          |
| 4   | 0,1                  | —                    | 0,5                  | —                      | —                    | 40           | 0.18±0.05bc  | 0.88±0.14bcd   | 0±0c                | 0.20±0.19b             | 1.10±0.10abc        | 0.03±0.03b          |
| 5   | 0,5                  | —                    | —                    | —                      | —                    | 25           | <b>0.40±0.09a</b>  | 0.65±0.13de  | 0.01±0.01c          | 0.09±0.20b             | 0.32±0.08bc         | 0.04±0.04b          |
| 6   | 0,5                  | —                    | 0,5                  | —                      | —                    | 42           | 0.14±0.07bc  | 0.37±0.07e   | 0.14±0.05b          | 0.50±0.19ab            | <b>2.00 ±0.10a</b>  | 0.02±0.02b          |
| 7   | —                    | 1                    | —                    | —                      | —                    | 59           | 0.15±0.09bc  | 1.05±0.12abc   | 0±0c                | <b>0.67±0.18a</b>      | <b>1.83±0.11a</b>   | 0.00±0.00b          |
| 8   | —                    | 1                    | 0,5                  | —                      | —                    | 28           | 0.02±0.01c   | 1.04±0.11abc   | 0±0c                | 0.19±0.20b             | 1.49±0.09ab         | 0.05±0.04b          |
| 9   | —                    | 5                    | —                    | —                      | —                    | 31           | <b>0.49±0.09a</b>  | <b>1.38±0.13a</b>  | 0±0c                | 0.29±0.20ab            | 0.96±0.09abc        | 0.04±0.04b          |
| 10  | —                    | —                    | —                    | 9                      | 4,6                  | 14           | 0.03±0.02c   | 0.01±0.01f   | <b>0.49±0.05a</b>   | 0.04±0.04b             | 0.01±0.01c          | <b>0.84±0.00a</b>   |

Datos expresados como promedio ± error estándar. Media identificada por diferentes letras son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) usando Duncan y Tukey

La mejor **formación de callos** se presenta en los explantos repicados del T10 al MS base con 0.84 y 0.49 callos por explanto respectivamente (Cuadro 2), puesto que es un medio que se caracteriza por inducir la formación de callos, sin embargo en ninguno de los dos casos se ha podido observar una clara formación de brotes, a pesar de que se esperaba que los callos al ser transferidos a MS base iniciaran la producción de brotes como ya ha sido reportado (Mata-Rosas *et al.* 2001, Cuellar 1997, Minocha & Mehra 1974). Con iguales concentraciones Bhau (1999), obtuvo la mejor proliferación de callos en *Coryphantha elephantidens* y su posterior formación de brotes. Es importante mencionar que en cactáceas, combinaciones de auxinas y citoquininas con fines de producción de raíces o brotes pueden también conducir a la regeneración de callos (Kolar *et al.* 1976; Johnson & Emino 1979; Vyskot & Jara 1984). En otros estudios se ha observado que una alta concentración de TDZ promueve una producción masiva de callos (Huetteman & Preece 1993), sin embargo en este estudio se produjeron muy pocos antes y después de ser repicados a medio MS base. También en los tratamientos expuestos a NAA se desarrollaron pocos callos, similares respuestas han sido reportadas en otras especies de cactus (Ruvalcaba-Ruiz *et al.* 2010).

El 2,4-D es más fuerte que el NAA, por lo que tiende a acumularse por más tiempo con un periodo activo prolongado y rápidamente forma callo (Mejía & Vittorelli 1988; Hurtado & Merino 1991), además su degradación es lenta (Arzarte *et al.* 1998). Esto posiblemente explica las elevadas respuestas de formación al ser repicados los explantos a MS base.

La formación de callos en los explantos comenzó en las zonas de corte de los segmentos. Los callos formados cubrieron la totalidad del segmento foliar a los 90 días de cultivo, donde se observó la presencia de un callo compacto, de color amarillo translúcido y algunas veces amarillo verdoso con características nodulares, similares respuestas fueron observadas en *Anthurium andraeanum* (Bautista *et al.* 2008).

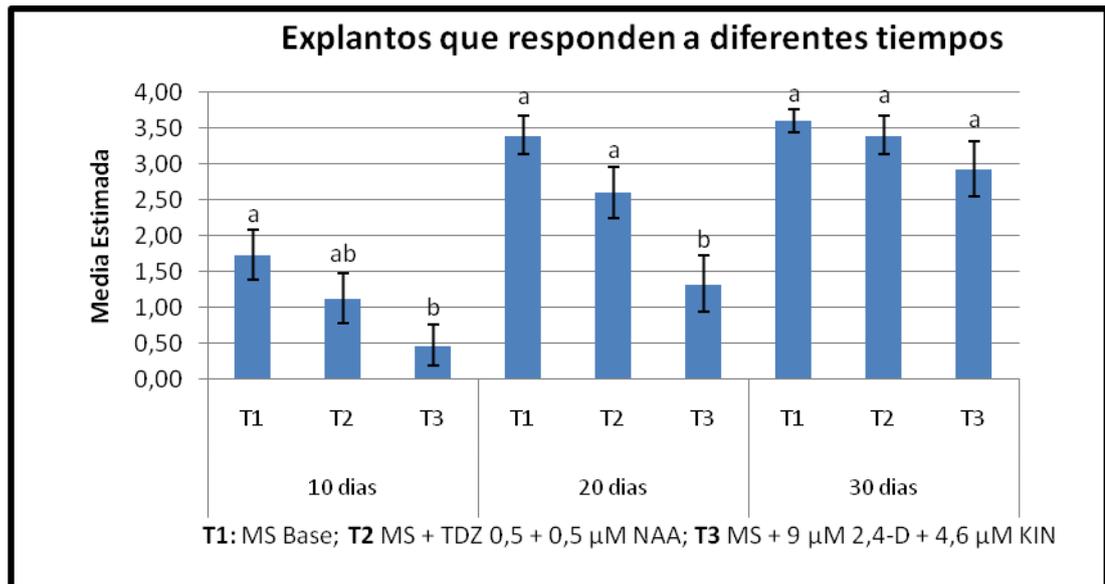
## **4.2 Respuestas morfológicas**

### **4.2.1. Explantos que presentan respuestas morfológicas**

A diferencia de las plantas C3, el crecimiento de cactáceas y en general de las plantas CAM, es por lo general muy lento en su medio natural, en condiciones *in vitro* se puede acelerar considerablemente, ya que aumentan los procesos de absorción de carbono al permanecer abiertos sus estomas todo el tiempo por la alta humedad (Malda *et al.* 1999).

Las cactáceas presentan gran plasticidad en cuanto a sus procesos de desarrollo *in vitro* (Mauseth 1979; Vyzkot & Jara 1984; Malda *et al.* 1999), esto se observa con *H. ocamponis* (Fig. 3), que a los 10 días ya se encuentran distintas respuestas en los tres tratamientos aplicados. El T1 presenta mejor respuesta desde el inicio del ensayo hasta el final, siendo las raíces la principal estructura formada. En el T2 se observa principalmente la formación de

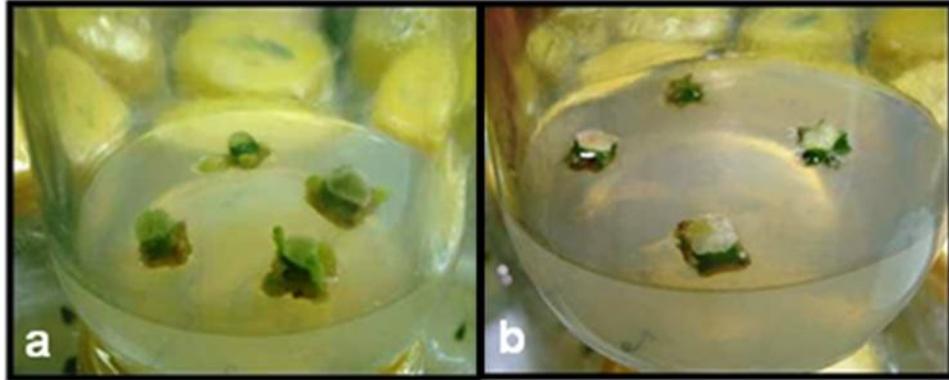
cladodios y también algunas raíces; y en el T3 se formaron solamente callos y se caracteriza por mostrar cambios lentos. Algunos autores indican que los mejores resultados se han logrado al utilizar ápices de brotes, ya que contienen grandes cantidades de areolas o yemas axilares, las cuales potencialmente darán origen a nuevos brotes (Starling & Doods 1983; Giusti *et al.* 2002).



**Fig. 3.** Explantos de *H. ocamponis* que presentan respuesta (cladodios, raíces y/o callos). Evaluación a los 10, 20 y 30 días de sembrados. Se utiliza Duncan y Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

La rápida formación de raíces, brotes y callos en explantos de cactáceas expuestos a medios con reguladores de crecimiento vegetal ha sido también reportada por varios autores (Mauseth 1978; Choreño *et al.* 2002; Ruvalcaba-Ruiz *et al.* 2010)

En el T2 con TDZ se observaron explantos con hiperhidricidad desde los 10 días (Fig. 4a), similares respuestas han sido observadas al utilizar TDZ y otros reguladores en otras especies de cactáceas (Ordoñez 2003). La hiperhidricidad se genera por un desorden fisiológico causando un cambio en el metabolismo, que conduce a la alteración de la estructura y apariencia anormal de los tejidos observándolos como vítreos o acuosos (George 1996). Además las condiciones del cultivo *in vitro* como alta humedad, exceso de carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores de crecimiento, o condiciones más particulares de las cactáceas como su metabolismo CAM y la naturaleza suculenta de sus tejidos influyen para que se genere la hiperhidricidad (Ziv 1991; Debergh & Read 1991; Oliveira *et al.* 1995; Pérez *et al.* 2002). También, desde el inicio del cultivo se observa en la parte apical de los explantos una capa vidriosa (Fig. 4b), la cual es constituida por polisacáridos y sirve de protección a los tejidos para que no se deshidraten (Machado 1999).



**Fig. 4.** Cultivos *in vitro* de *H. ocampensis* a) brote con hiperhidricidad b) formación de capa de polisacáridos

#### **4.2.2. Formación y crecimiento de cladodios, raíces y callos sometidos a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal**

La **formación de cladodios** en cactáceas cultivadas *in vitro* no es un problema, pues al estar en condiciones óptimas sus areolas se pueden multiplicar produciendo distintas estructuras que se desarrollen en plantas completas con cierta facilidad (Johnson & Emino 1979; Clayton *et al.* 1990; Bravo-Hollis 1978). La actividad de las citoquininas puede ser determinante para romper la dormancia de las areolas, porque promueve la formación de brotes en los tejidos de cactus (Fay & Gratton 1992). El T2 presenta la mejor formación de brotes, con una media de 0.13; 1.67; 2,67 brotes/explanto a los 10, 20 y 30 días, respectivamente (Cuadro 4). Similares respuestas observó Ordoñez (2003) con TDZ en *Mammillaria voburnensis*, ya que a pesar de que sus explantos presentaban gran hiperhidricidad generaron proliferación de brotes. El TDZ induce la regeneración de brotes mostrando respuestas específicas que dependen del genotipo y del tipo del tejido; esta es la citoquinina más activa para plantas de tejidos leñosos (Huetteman & Preece 1993; Passey *et al.* 2003). También es importante mencionar que el T2 produjo formación de brotes múltiples o macizos de proliferación, similares respuestas fueron observadas por Pérez *et al.* (1998), en brotes de *Mammillaria formosa* y *Mammillaria obscura* en un medio MS con BAP y NAA. La formación de macizos fue observada en el anterior ensayo razón por la cual se escogió ese tratamiento para la presente investigación.

El **crecimiento de brotes** de cactáceas en condiciones *in vitro* es más rápido que en condiciones naturales (Ault & Blackmon 1987; George 1993), por ejemplo Malda *et al.* (1999) en *Coryphantha minima* observaron un crecimiento de plantas 7 veces más grandes que en medio natural; la velocidad del crecimiento estará determinada por el balance entre auxinas y citoquininas (Johnson & Emino 1979). El T2 generó la mayor cantidad de individuos con crecimiento del cladodio de 0-1cm y en el único en que se observaron individuos de 1-2cm (Cuadro 4). Estas respuestas no coinciden con lo que mencionan algunos autores de que una de las desventajas del TDZ es que inhibe la elongación (Huetteman & Preece 1993; Marcotrigiano *et al.*

1996; Debnath & McRae 2005). Por otra parte Mauseth (1978) en explantos de *Opuntia polyacantha* logro un crecimiento de 5 a 6 cm de largo a los 21 días de cultivados con BA, GA<sub>3</sub> y NAA.

Las respuestas de formación y crecimiento de brotes en los T1 y T3 fue baja (Cuadro 4), ya que el 2,4-D y la kinetina no actúan directamente en la formación de brotes sino más bien en formación de callos (Minocha & Mehra 1974). Aunque en otras especies, en el medio libre de hormonas se ha observado rápidamente formación de cladodios (Pérez-Molphe *et al.* 1998), cabe mencionar que pasados los 30 días en el T1 se observó elevada proliferación de cladodios, lo cual es lo esperado en cactáceas (Mauseth 1975 & Hampering; Rubluo *et al.* 2002).

| Días | Trat | # de brotes       | Longitud           | # de raíces       | Longitud           | # de callos       |
|------|------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|      |      | por<br>explanto   | de brotes<br>0-1cm | por<br>explanto   | de raíces<br>0-2cm | por<br>explanto   |
| 10   | T1   | 0±0a              | 0±0a               | <b>1.73±0.35a</b> | <b>2.00±0.36a</b>  | 0±0a              |
|      | T2   | 0.13±0.13a        | 0.57±0.57a         | 0.60±0.21b        | 0.64±0.23b         | 0.27±0.15a        |
|      | T3   | 0.13±0.13a        | 0.14±0.14a         | 0±0b              | 0±0b               | 0.33±0.21a        |
| 20   | T1   | 0±0b              | 0±0b               | <b>3.40±0.27a</b> | <b>5.00±0.61a</b>  | 0±0b              |
|      | T2   | <b>1.67±0.36a</b> | <b>4.57±1.11a</b>  | 1.07±0.30b        | 1.64±0.51b         | 0.93±0.33a        |
|      | T3   | 0.13±0.13b        | 0.14±0.21b         | 0.20±0.15c        | 0.21±0.15b         | 1.27±0.37a        |
| 30   | T1   | 0.13±0.09b        | 0.14±0.10b         | <b>3.60±0.16a</b> | <b>6.57±0.78a</b>  | 0±0c              |
|      | T2   | <b>2.67±0.35a</b> | <b>7.71±1.79a</b>  | 1.53±0.27b        | 1.93±0.37b         | 1.33±0.19b        |
|      | T3   | 0.07±0.13b        | 0.14±0.14b         | 0.33±0.16c        | 0.43±0.20c         | <b>2.87±0.38a</b> |

**Cuadro 4.** Formación y crecimiento de cladodios raíces y callos sometidos a dos combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal a los 10, 20 y 30 días de cultivados

La **producción de raíces** en cactáceas se da espontáneamente y la exposición a reguladores no influye en gran proporción (Rubluo *et al.* 2002; Garcés 2003; Quiala *et al.* 2007), esta característica talvez se deba a un proceso natural de adaptación y aclimatación a los medios áridos en los que viven las cactáceas como respuesta al estrés hídrico (Mauseth & Halperin 1975; Clayton *et al.* 1990). En los tres tratamientos se presentan raíces, siendo el T1 en donde se observa la mayor producción de raíces por explanto en todos los tiempos de observación (Cuadro 4). El T2 y T3 no pasaron de 1.53 y 0.33 raíces por explanto respectivamente. En el medio con 2,4D y KIN parece ser lo esperado (Minocha & Mehra 1974; Marín *et al.* 1998). Según Mauseth & Halperin (1975), pocas cactáceas forman raíces exponencialmente antes de los 30 días, esto difiere con este estudio ya que se observaron desde los 10 días.

El mayor **crecimiento de raíces** se dio en el T1 en todos sus tiempos (Cuadro 4), y solamente en este tratamiento se observaron raíces de 2-4 cm a los 30 días con 0,86 individuos por explanto. En todos los casos las raíces

presentaron gran cantidad de pelillos radicales. En T2 y T3 sus raíces no pasaron del rango de 0-2 cm presentando muy pocos individuos raíces (Cuadro. 4). En el T3 las raíces formadas fueron como pelillos radicales que salían de la parte aérea del callo formado.

Generalmente la **formación de callo** es estimulada en función de la concentración exógena del regulador de crecimiento vegetal utilizado, sin embargo hay que tomar en cuenta la concentración endógena de auxinas en el explanto, el tipo de explanto y el estado fisiológico del mismo e incluso, la especie vegetal utilizada (Rout *et al.* 2000). El T3 respondió con 2.87 callos/explanto a los 30 días siendo significativamente diferente de los otros tratamientos (Cuadro. 4). Se sabe que la Kinetina produce un rápido crecimiento de callos en los explantos (Wakhlu & Bhau 2000). Similares respuestas obtuvieron utilizando 2,4-D y KIN para la inducción de callo en explantos de cactáceas como *Coryphantha elephantidens*; *Cephalocereus senilis*; *Cereus peruvianus*; *Mammillaria elongata* (Bhau 1999; Nava-Esparza & Yáñez 1984; Machado *et al.* 1995; Johnson & Emino 1979). El T2 también presentó formación de callos con una media de 1.33 callos/explanto (Cuadro 4), esto se explica ya que el TDZ puede ser inductor de callos (George 1993; Wilhelm 1999). Según Pérez-Molphe *et al.* (1998) el NAA solo en diferentes concentraciones produjo escasa formación de callos en algunas cactáceas. También se ha observado que medios sin reguladores de crecimiento vegetal pueden producir callos como en la especie *Mammillaria gracillis* (Poljuha *et al.* 2003) lo que no ocurrió en este estudio.

La mayoría de los callos presentaban poca friabilidad lo cual no concuerda con Minocha & Mehra (1974) que obtuvieron callos friables en *Neomammillaria prolifera* al usar los mismos reguladores, pero al igual que en el presente estudio no hubo diferenciación de brotes. La ausencia de brotes tal vez se deba al corto tiempo del estudio (30 días). La forma de los callos en algunos casos fue uniforme y poco organizada. Los callos fueron de color verde amarillento o café claro, dando una apariencia, en algunos casos de tejido necrosado.

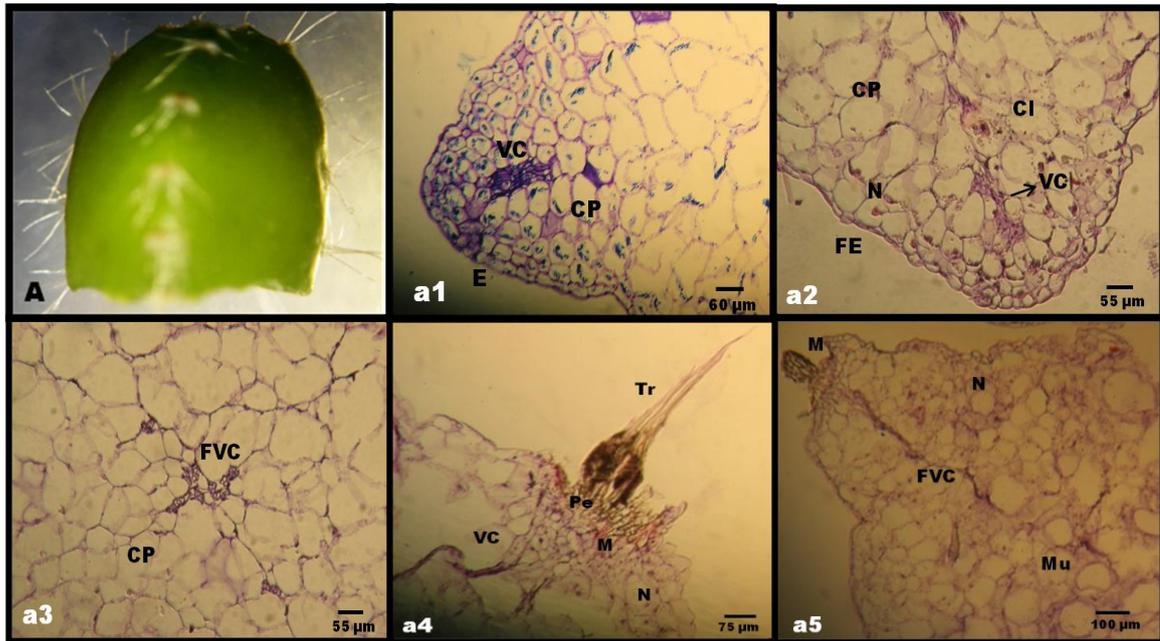
#### **4.2.3. Análisis histológico**

A continuación se hace una descripción de algunos de los procesos de desarrollo a nivel histológico en distintos tiempos (inicio del cultivo, 10, 20 y 30 días), que se han dado en los explantos expuestos a los tres tratamientos (T1:control; T2:TDZ y NAA; T3:2,4-D y KIN).

##### **4.2.3.1. Observación: inicio del cultivo**

En los cladodios observados (Fig. 5A) previo a iniciar el cultivo los explantos presentan algunos tejidos diferenciados (Fig.5), con 1 o 2 capas de células que conforman la epidermis, encontrándose vasos conductores en formación y a su alrededor células acompañantes, y además las células parenquimáticas con núcleos grandes teñidos de color azul (Fig. 5 a1, a2, a3), similares respuestas

fueron observadas en tejidos de *Stenocereus queretaroensis* y *Opuntia ficus-indica* (Loza et al. 2003; Gomes et al. 2006).



**Fig. 5.** Estado inicial del cladodio y de tejidos de *H. ocamponis*, 0 días. Los cortes histológicos fueron observados con aumento de 20X con excepción de a5 que es a 10X. **A.** Parte apical del cladodio. **a1)** Porción de vasos conductores, epidermis con una a dos capas de células; **a2)** Tejido diferenciado mostrando células parenquimáticas bien desarrolladas con núcleos; cloroplastos, vasos conductores y formación de la epidermis, **a3)** proceso de formación de vasos conductores rodeado por células parenquimáticas, **a4)** Irrigación de vasos conductores a zona meristemática, cubierta por tricoma, en el centro se observa la peridermis, **a5)** Células mucilaginosas, irrigadas por vasos conductores en formación, en el extremo se observa una zona meristemática. VC: vasos conductores, E: epidermis, CM: células maduras, N: núcleos grandes, CP: células parenquimáticas, Cl: cloroplastos, FE: epidermis en formación, FVC: vasos conductores en formación, M: meristema, Tr: Tricoma, Pe: peridermis, Mu: mucilago.

En las cactáceas Las células parenquimáticas se diferencian fácilmente de las epidérmicas (Martín 1993). La epidermis aparentemente es simple, la forma de sus células cuadrada o rectangular, similares respuestas han sido encontradas en *Stenocereus* (Terrazas et al. 2005). Se observaron algunos cloroplastos, al respecto Nilsen (1995) menciona que algunas de las células del parénquima tienen a su alrededor cloroplastos cerca de la superficie, favoreciendo la movilización de productos de la fotosíntesis.

En la areola (Fig. 5a4) las espinas son producidas por un meristema basal unidas por peridermis, pudiéndose observar una aglomeración de células meristemáticas. Según Cornejo et al. (2003), la formación de la peridermis comienza como parches pequeños en algunas partes del tallo en plántulas de 9 meses de edad.

Una de las estructuras más observadas fueron los tubos conductores, que se encontraron por todas partes irrigando los distintos tejidos. La Fig. 5a5 muestra el proceso de formación de los vasos conductores que inician desde la

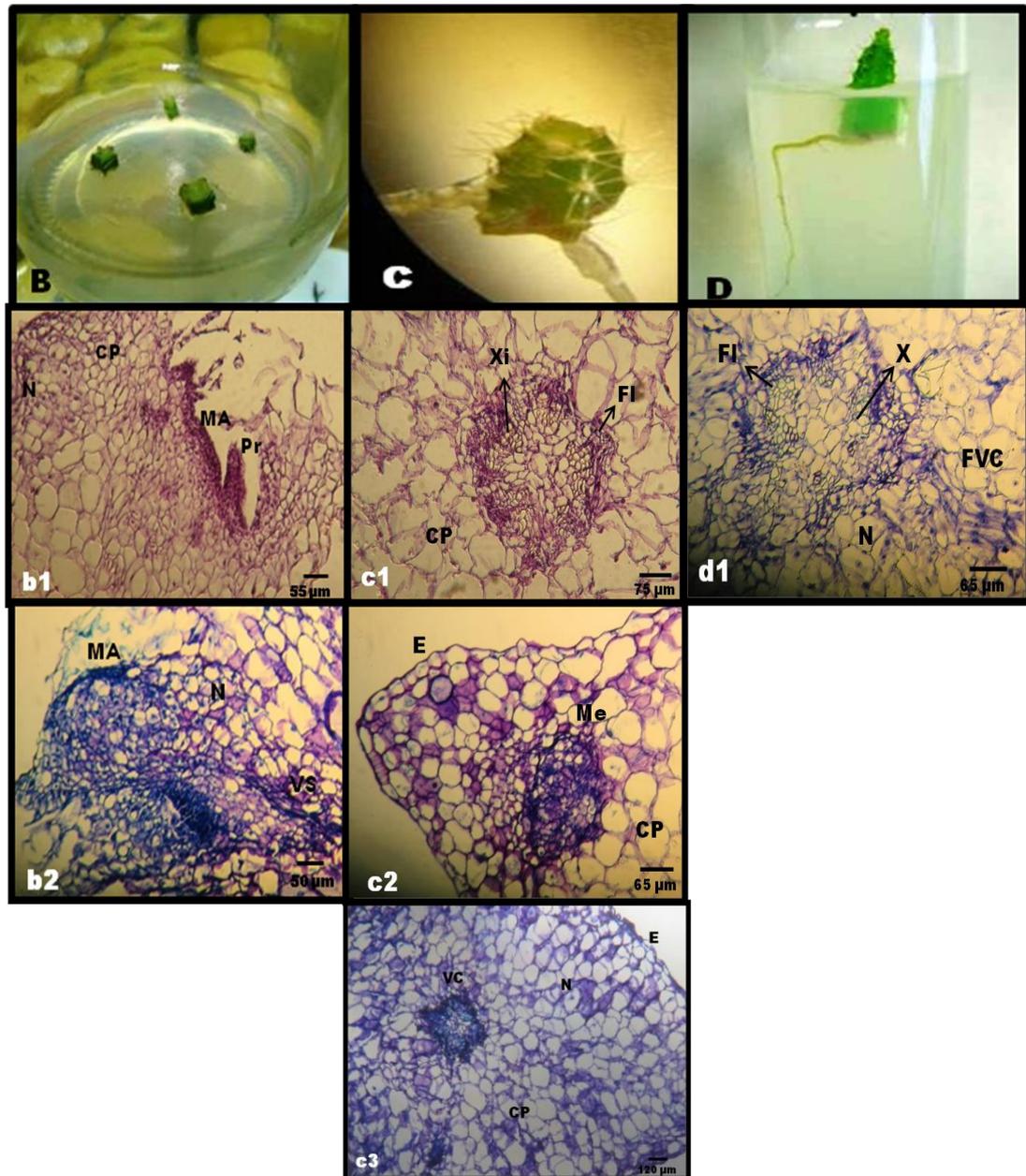
base hacia el ápice conectado desde un punto donde surge la espina, similares observaciones realizaron Salinas-Soto & Gómez-Sánchez (2007).

Otra estructura común en todos los tratamientos fueron las células del mucilago, las cuales generalmente son redondeadas y de mayor tamaño que las células del parénquima (Fig. 5a5), esto es característico en la mayoría de cactáceas (Terrazas *et al.* 2005). Los mucilagos parecen aumentar la capacidad de las células para absorber y retener agua y pueden encontrarse en el protoplasto y en la membrana (Esaú 1985). También se pudo observar tricomas, los cuales son importantes en procesos de adaptación a condiciones ambientales (Mosco 2009).

#### **4.2.3.2 Observaciones en el T1 a los 10, 20 y 30 días**

Aunque con el tratamiento MS libre de reguladores de crecimiento se observó mejor formación de raíces desde los 10 días, a nivel histológico no se pudo apreciar la formación de las raíces.

En todos los tiempos se observa presencia de células del parénquima, esto puede deberse a que estas células pueden especializarse, también, en el almacenamiento de agua (Esaú 1985), muchas plantas como las cactáceas, contienen en sus órganos fotosintéticos, células parenquimáticas desprovistas de clorofila pero llenas de agua; este tejido acuoso consta de células vivas de tamaño particularmente grande y con membranas casi siempre delgadas, las células se disponen a menudo en filas, pudiendo ser alargadas como las células en empalizada, en este estudio las células tenían una fina membrana y grandes núcleos, estas células muestran un arreglo organizado y compacto con células relativamente grandes (Fig.6 b1, c1, c2, c3). Según Poljuha *et al.* (2003) en tejidos de *Mammillaria gracilis* cultivados en medio MS base se encontró células de parénquima altamente vacuoladas con plástidos, y los espacios intercelulares estaban bien desarrollados, lo que no se observó en este estudio.



**Fig. 6.** Tejido apical de *H. ocamponis* en Medio MS base. Los cortes histológicos fueron observados con aumento de 20X con excepción de c2 que es a 10x. **B)** Parte media apical del cladodio a los **10 días de cultivo**, aparentemente todavía no hay respuesta alguna, **b1)** células del parénquima con núcleos grandes, activación del meristema axilar, formación del protoderma, **b2)** activación del meristema axilar, células grandes con núcleos vistosos, porción de vasos conductores. **C)** **20 días de cultivo** se observa ya la presencia de raíces pequeña, **c1)** detalle del xilema y el floema, con células parenquimáticas a su alrededor, **c2)** epidermis con una capa de células parenquimáticas a su alrededor y formación del meristemoide, **c3)** se observa una fina capa de la epidermis con células parenquimáticas, núcleos y vasos conductores. **D)** **30 días de cultivo** presencia de raíces con gran tamaño. **d1)** formación de vasos conductores, se observa el xilema y el floema y células con sus respectivos núcleos. (N) núcleos, (CP) células parenquimáticas, (MA) meristema axilar, (Pr) protoderma, (VC) vasos conductores, (X) xilema, (FI) floema, (E) epidermis, (Me) meristemoide, (FVC) formación de vasos conductores.

La Fig.6 (b1, b2) muestra el desarrollo de un brote desde un meristema axilar formando una protuberancia, similares respuestas han sido encontradas en el cultivo *in vitro* de otras cactáceas (Rubluo *et al.* 2002; Loza *et al.* 2003). Esta región, de formación de brotes, se caracteriza por poseer células de menor diámetro y un menor grado de diferenciación histológica, suelen estar formadas por varias capas de células parenquimáticas de pequeño tamaño con paredes muy delgadas (Pérez *et al.* 2003).

En la Fig.6 (c2, c3) se observa una fina capa de células de la epidermis con células rectangulares, esta forma es usual en algunas especies de cactáceas (Terrazas *et al.* 2005). Según Esaú (1985), la epidermis del brote se origina a partir de una capa de células externas del meristemo apical, de células iniciales independientes; conjuntamente con las capas de células subyacentes.

Se puede observar a detalle el xilema y el floema como el proceso de irrigación con el resto de vasos hacia las demás células parenquimáticas (Fig.6 c1, c3, d1). Según Esaú (1985), un vaso se forma a partir de una serie longitudinal de células meristemáticas, estas son células procambiales en el xilema primario y células derivadas del cambium en el secundario. En la Fig. 6 (c2) se logra apreciar un meristemoide que es una gran masa de células pequeñas meristemáticas (Martin 1993).

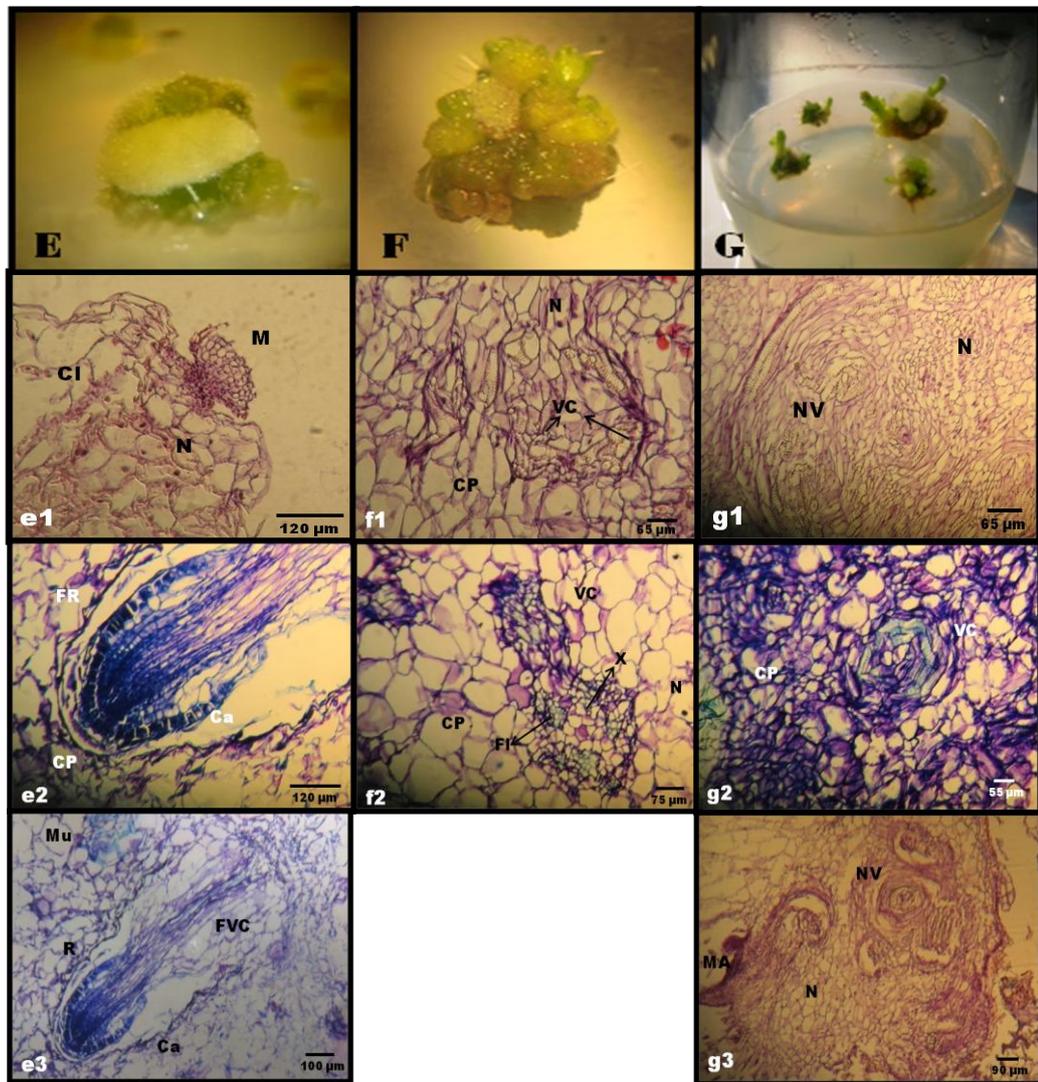
Al compararlo con los explantos antes de iniciar la manipulación, en los explantos sembrados en MS base se nota mayor presencia de células meristemáticas, posiblemente las yemas meristemáticas se activan al ser segmentados y sembrados los explantos en el medio nutritivo, generando su posterior crecimiento. También se observa un incremento en la cantidad de vasos conductores, lo cuales se relacionan con los procesos de desarrollo.

#### **4.2.3.3 Observaciones en el T2 a los 10 20 y 30 días**

El tratamiento con TDZ y NAA formó brotes y algunos callos. A nivel histológico se observaron células parenquimáticas con sus respectivos núcleos, células meristemáticas con una organización celular más definida formando hileras (Fig. 7e1), similares respuestas fueron reportadas por Cabrera *et al.* (2008).

Según Weaver (1926), Guttenberg (1940), las raíces presentan diferencias morfológicas, estructurales y de desarrollo en correlación con sus especializaciones fisiológicas. Aunque este tratamiento presenta poca formación de raíces *in vitro*, en los cortes se pudo observar el proceso de formación de las mismas (Fig. 7e2), se aprecia la caliptra con células alargadas aparentemente muy apretadas entre sí y con membranas delgadas y células parenquimáticas y algunas colapsadas alrededor de estas. Según Guttenberg (1940), la caliptra es comúnmente considerada como una estructura que protege al meristemo radical y ayuda a la raíz en su penetración al sustrato durante el crecimiento. En algunas plantas las células de la caliptra son mecánicamente fuertes, contienen células parenquimáticas

vivas (Esaú 1985). En la Fig. 7 (e3) se distingue la formación de los vasos conductores a partir de las demás células de la raíz. Según Torrey (1957) el futuro xilema se distingue pronto del futuro floema por el aumento del tamaño y la vacualización de las células.



**Fig. 7.** Tejido apical de *H. ocamponis* en Medio MS + TDZ 0,5  $\mu$ M + 0,5  $\mu$ M NAA. Los cortes histológicos fueron observados con aumento de 20X con excepción de e3 y g3 que es a 10X. **E) 10 días de cultivo**, presencia de polisacáridos en su base, **e1)** células con núcleos grandes, cloroplastos y células meristemáticas. **e2)** formación de la raíz, se puede ver claramente la caliptra, con células parenquimáticas a su alrededor, **e3)** vista panorámica de la formación de la raíz con su caliptra y la formación de vasos conductores y algunas células del mucilago **F) 20 días de cultivo**, formación de callos y algunos brotes, **f1)** irrigación de los vasos conductores a células parenquimáticas con sus núcleos, **f2)** detalle del xilema y floema y formación de vasos conductores alrededor células parenquimáticas con sus núcleos. **G) 30 días de cultivo**, formación de callos en casi todo el tejido y presencia de polisacáridos en su base, **g1)** inicio de la conexión entre el nódulo vascular interior y el sistema vascular **g2)** células parenquimáticas con vasos conductores en forma espiral, **g3)** nódulo vascular con núcleos y a un extremo se observa una zona meristemática. (CI) cloroplastos, (N) núcleos y (M) meristema, (FR) formación de la raíz, (Ca) caliptra, (CP) células parenquimáticas, (Mu) mucilago (R) raíz, (FVC) formación

de los vasos conductores, (VC) vasos conductores, (X) xilema, (FI) floema, (NV) nódulos vasculares, (CM) células meristemáticas, (MA) meristema axilar.

A los 20 días se logra observar la presencia de brotes e iniciación del callo (Fig. 7F). Logrando apreciar vasos conductores (Fig.f1), también se muestra a detalle el xilema y el floema (Fig.f2) y células parenquimáticas con grandes núcleos alrededor de estas, cabe recalcar que en este tratamiento en los tres tiempos se observaron gran cantidad de vasos conductores.

En cambio a los 30 días en la Fig. 7G se aprecia la formación de callos y macizos de proliferación que ya comienzan a formar brotes. En la (Fig.7 g1, g3), se observa nódulos vasculares que no siguen un orden y que posiblemente se conectaran con los nuevos brotes; Fuentes *et al.* (2005), reporta la presencia de nódulos vasculares en el interior del callo, en los cuales posteriormente se desarrollaron en xilema y floema, que mantuvieron la misma orientación que en el tallo de una planta; lo cual no se observó en este estudio. Sin embargo Martín (1993), en explantos de *Limonium dufourei* manifiesta que el estímulo inductor no actúa por igual en todas las zonas del explanto y que se producen simultáneamente distintos modelos de diferenciación celular y morfogénesis, es por eso la aglomeración de vasos conductores en este tratamiento. Por su parte Fortes y País (2000) describieron la formación de tejido vascular a partir de divisiones tangenciales que sufrieron determinadas células corticales de los segmentos internodales utilizados como explantes.

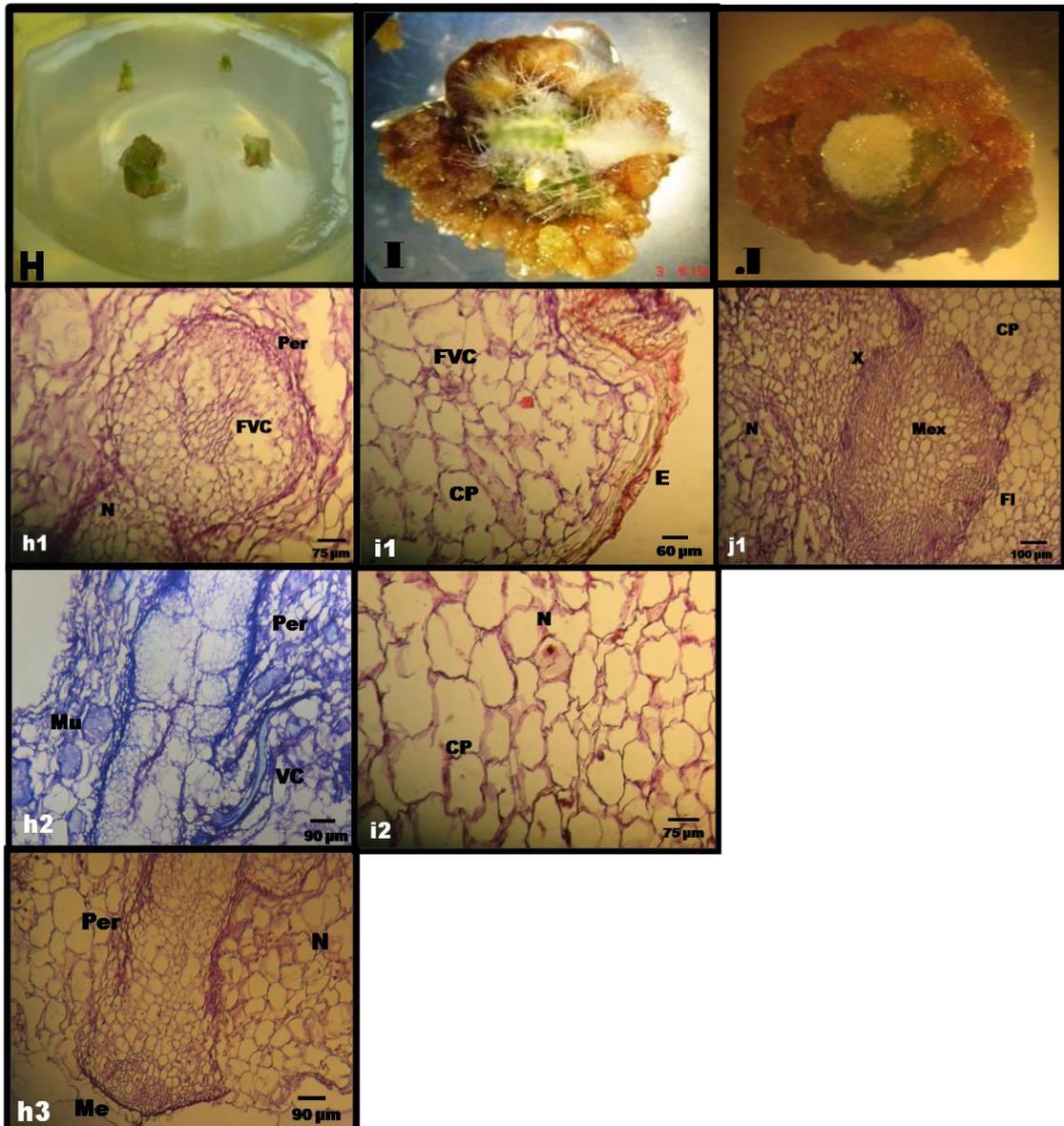
Los vasos conductores fueron circulares, rodeados de células parenquimáticas algunas con núcleos sobresalientes (Fig. 7g2), similares respuestas fueron encontradas por Terrazas *et al.* (2005) en tejidos de *Stenocereus zopilotesis*. En algunas familias como las cactáceas, la degeneración evolutiva de los miembros de los vasos trae consigo una disminución en diámetro de las células y la falta de desarrollo de algunas estructuras (Bailey 1957; Carlquist 1961)

Al comparar los cortes de los explantos de la fase inicial y del T1 con los del T2 se observa gran cantidad de nódulos vasculares (aglomeración de vasos conductores), con células en proceso de división y diferenciación, esto se asocia con la formación de los nuevos brotes y su sistema de irrigación. La formación de raíces que es espontánea en todas cactáceas se la pudo observar en material de este tratamiento.

#### **4.2.3.4. Observaciones del T3 a los 10 20 y 30 días**

Este tratamiento formó callos. A los 10 días se observa en la Fig. 8H que inicia el proceso de formación de callos en la base del brote. A nivel histológico se pueden observar embriones globulares o la iniciación de un nuevo vástago con células pequeñas y núcleos que sobresalen, y células meristemáticas y del periciclo alrededor de este. También se puede observar células mucilaginosas. Además de que el tejido vascular ha iniciado la diferenciación hacia la periferia se observaron células colapsadas (Fig. 8 h1, h2, h3) Similares respuestas

fueron encontradas por (Cabrera *et al.* 2008). La morfología de las células es típica de estructuras en formación de callos (Gomes *et al.* 2006).



**Fig.8.** Tejido apical de *H. ocampensis* en Medio MS + 9  $\mu$ M 2,4-D + 4,6  $\mu$ M KIN. Los cortes histológicos fueron observados con aumento de 20X con excepción de h2 y j1 que es a 10X. **H) 10 días de cultivo**, comienza la formación del callo, **h1)** células con núcleos grandes, inicio de la formación de los vasos conductores y células del periciclo. **h2)** células del mucilago, formación de las células de periciclo y vasos conductores atravesando las células, **h3)** células meristemáticas en la parte inferior, células parenquimáticas con sus núcleos y células del periciclo. **I) 20 días de cultivo**, los callos ya recubren la mayor parte del tejido, **i1)** Formación de los vasos conductores, células parenquimáticas 2 a 3 capas de células de la epidermis, **i2)** detalle de las células parenquimáticas con grandes núcleos. **J) 30 días de cultivo**, formación de callos en casi todo el tejido y formación de algunos brotes, **j1)** Detalle del xilema y del floema, en el centro se observa células del metaxilema y células parenquimáticas con sus núcleos rodeándolos. (N) núcleos, (FVC) formación de los vasos conductores, (Per) periciclo, (Mu) mucilago, (VC) vasos conductores, (Me) meristema, (CP) células parenquimáticas, (E) epidermis, (X) xilema, (FI) floema, (Mex) metaxilema.

A los 20 días el callo se encuentra presente en la mayoría del explanto con algunas raíces adventicias (Fig. 8I). Fue posible observar una mayor proporción de células diferenciadas y la formación de vasos de conducción con células relativamente grandes e isodiamétricas, también se puede observar un grupo de células iniciales, 2 a 3 capas de células de la epidermis (Fig.i1), la epidermis no presenta cuerpos de sílice lo cual es característico en algunas cactáceas, como en el género *Stenocereus* (Terrazas & Loza-Cornejo 2002). La presencia de grupos celulares con cierto grado de organización y diferenciación celular en los callos es evidencia del inicio de la formación de estructuras (Ross *et al.* 1973; Asbell 1977). Similares respuestas obtuvo Cabrera *et al.* (2008) en tejidos vegetales de cicadas utilizando 2,4-D y KIN, en las primeras semanas del cultivo encontró células parenquimáticas que conformaron el callo, estas células fueron de forma isodiamétrica de tamaños relativamente grandes y con presencia de vacuolas. En la (Fig. 8 i2) se logra observar la típica forma de las células de las cactáceas deformes, grandes y largas que muestran un arreglo organizado y con núcleos grandes en algunas células.

A los 30 días el segmento ya está cubriendo todo el callo, (Fig. 8 J, j1). A nivel histológico Rubluo *et al* (2002) aplicando 2-4D en *Mammillaria san-angelensis* después de 3-4 semanas observó haces vasculares, similares respuestas se encontró en este estudio lográndose distinguir el xilema y el floema y aparentemente el metaxilema variables en tamaño y células parenquimáticas con sus respectivos núcleos. Cabrera *et al.* (2008) utilizando 2-4D y Kin a los tres meses pudo observar una mayor proporción de células diferenciadas formando regiones meristemáticas con células pequeñas, rectangulares con citoplasma denso y núcleos notorios. A este nivel las células en división fueron frecuentes y en menor número se encontraron células alargadas.

Al diferenciar los explantos del inicio del cultivo y del T1 y T2 con los del T3, en este último se aprecian células de mayor volumen que es característica propia de los callos, algunos de los vasos conductores encontrados presentan mayor grado de diferenciación, posiblemente es el inicio de estructuras. También se pudo observar células mucilaginosas al igual que en el T1, sin embargo las células mucilaginosas son comunes en esta especie.

## **5. CONCLUSIONES**

### ***Efecto residual***

- En el análisis del efecto residual el tratamiento MS+ 1µM BAP es el que mejor respondió a la formación de cladodios con una media estimada de 0.67 cladodios/explanto y de raíces con una media estimada de 1.83 raíces/explanto. Es importante mencionar que se produjeron más brotes y raíces que en el medio inicial (con reguladores de crecimiento vegetal). En la formación de callos, al igual que con el MS + 9 µM 2,4-D + 4,6 µM KIN, fue mejor en los explantos repicados a MS y provenientes de ese tratamiento con una media estimada de 0.84 callos/explanto, mayor a la anterior manipulación 0.49 callos por explanto.

### ***Evaluación in vitro***

- De las respuestas *in vitro* observadas a los 30 días se obtuvo que el (T1) MS Base, fue el que mejor respondió en la formación de raíces con una media estimada de 1.73 raíces/explanto. En la formación de brotes es el (T2) MS + TDZ 0,5 µM + 0,5 µM NAA con 2.67 brotes/explanto y para formación de callos el medio (T3) MS + 9 µM 2,4-D + 4,6 µM KIN con una media estimada de 2.87 callos/explanto.

### ***Análisis histológico***

- En todos los tratamientos se observaron células meristemáticas y vasos conductores en distintos procesos de división y diferenciación, los cuales variaban en función del tratamiento aplicado, sobretodo en presencia-ausencia; además las variaciones de los vasos conductores fueron más claras en T2 y T3 observándose, en T2 aglomeraciones de vasos por todas partes y desorganizados; y en T3 los vasos fueron más desarrollados y más grandes con células pequeñas y grandes núcleos. Además se pudieron observar estructuras como células epidérmicas y parenquimáticas, mucílagos, tricomas, formación de raíces indistintamente en los distintos tratamientos.

## 6. RECOMENDACIONES

- Probar con otras concentraciones de auxinas (2-4D, NAA) y citoquininas (TDZ; Kinetina) para observar como estas responden en la formación de brotes, raíces y callos, y profundizar más en el estudio de macizos de proliferación de brotes.
- Evaluar otras etapas de crecimiento *in vitro* de los brotes, trasplantándolos a medio MS libre de reguladores de crecimiento vegetal, probando diferentes concentraciones de medio MS ( $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{1}{3}$  MS y  $\frac{1}{4}$  MS) para analizar sus respuestas de formación de brotes y raíces.
- Se recomienda utilizar el medio de cultivo MS + 9  $\mu$ M 2,4-D + 4,6  $\mu$ M KIN en otras concentraciones para la inducción de callo y evaluar el posterior desarrollo de los brotes.
- Realizar más estudios acerca de las causas de la malformación de los brotes, debido a la hiperhidricidad o por diversos factores, como consecuencia de los reguladores del crecimiento vegetal utilizados.
- Probar otros métodos y tiempos de fijación, inclusión, clarificación y de tinciones para observar mas estructuras celulares, teniendo presente el grosor de los cortes y la posición del material (Longitudinal y transversal).
- Realizar más pruebas histológicas en *H. ocamponis* a nivel *in vitro* y también con plantas aclimatadas en el invernadero para poder observar sus posibles cambios.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aimale M. & Gatti J. 2010. Universidad Nacional del Sur, disponible en: <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.aspzona=modteci>
- Albany N., Vílchez J., García L. & Jiménez E. 2005. Comparative study of morphological parameters of grand nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. Venezuela. Plant Cell. Tissue and Organ Culture (2005) 83: 357–361.
- Álvarez L. 1998. Recolección, caracterización y evaluación de papayas de altura con énfasis en papayuelos. Manizales-Colombia.
- Anderson E. 2001. The cactus family. Avances en los estudios sobre la germinación de cactáceas mexicanas. UNAM. Memorias 4º Congreso Latinoamericano y del Caribe de cactáceas y otras suculentas.
- Argüello P. & Jiménez V. 1997. Periodos prolongados de sequía en pitahaya (*Hylocereus undatus*), Tesis profesional de ingeniero agrónomo especialista en Fitotecnia. Chapingo-México. pp. 42.
- Ault J. & Blackmon W. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience 22:126-127.
- Arzarte F., Nakazaki T. & Taniska T. 1998. Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *longiflor umbyovary* slice culture. Plant Breed. 117:479-484
- Asbell C. 1977. Ultrastructural modifications during shoot formation *in vitro*. pp. 13:180.
- Bhau B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem), Cactaceae from root explants. Scientia Horticulturae. 81 (3):337-344.
- Bautista N., Peñalver D., Rodríguez R., Chiu W., López R., Terry F., Peralta M. & Martínez O. 2008. Embriogénesis somática en (*Anthurium andradeanum Lind*) variedad "Lambada". Universidad Autónoma Indígena de México Ra Ximhai. Sinaloa-México. pp. 4:135-149.
- Bailey I. 1957. Additional notes on the vesselless dicotyledon, *Amborella trichopau* Bail *Arnold Arboretum*. Jour. 38:374-378.
- Barboza S. & Caldas L. 2001. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do *abacaxizeiro* híbrido PE x SC-52. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. 36: 417-423.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. & Sánchez R. 2007. Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid-España. pp. 558.
- Bidwell R. 1979. Fisiología Vegetal. Macmillan. México. pp. 745.

- Britton N. & Rose J. 1920. The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the cactus family. Vol. II. The Carnegie Institution of Washington. Washington-USA. pp. 241.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México. Universidad Autónoma de México, UNAM. Segunda Edición. México. pp. 743.
- Bravo-Hollis H. & Scheinvar L. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 233.
- Cabrera S., Chavez V., Sandoval E., Litz R. & Cruz F. 2008. Morfogénesis *in vitro* de *Dioon Merolae* de Luca, Sabato & Vazquez-Torres (*Zamiaceae, Cycadales*) a partir de megagametofitos y embriones Cigóticos. Interciencia. Caracas-Venezuela. pp. 929-934.
- Carlquist S. 1961. Comparative plant anatomy. Biology Studies. Ed. Holt Rinehart and Winston Inc. Nueva York-USA. pp. 146.
- Castillo M., Cáliz D. & Rodríguez A. 1996. Guía técnica para el cultivo de pitahaya. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Universidad de Quintana Roo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Universidad Autónoma de Chapingo. pp 158.
- Cerón C. 2003. Manual de Botánica. Editorial Universitaria. PUCE. Quito- Ecuador. pp. 315.
- CITES. 2010. Lista de Especies CITES. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres: texto del convenio. CITES. Berna-Suiza. pp. 118.
- Colomas J. 1971. Obtention de cultures de tissue of fragments de tiges of *Pachycereus pringlei*. Paris. Acad. Sci. 272: 1380-1382.
- Cornejo S., Terrazas T., Mata L. & Trejo C. 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus querearoensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. InterCiencia. Caracas-Venezuela. pp. 83-89.
- Choreño-Tapia J., González-Rosas H., Terrazas-Salgado T. & Hernández-Livera A. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haworth Pfeiffer) a partir de aréolas. Revista Chapingo. Horticultura 8(2): 183-196.
- Clayton P., Hubstenberger J., Phillips G. & Butler-Nance S. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribu Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 337-343.
- Cuellar J. 1997. Propagación vegetativa *in vitro* a partir de hojas jóvenes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Agronomía mesoamericana. El Salvador. 8(1): 74-80.
- D' Ambrogio A. 1970. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Cátedra de Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía. Hemisferio Sur. pp. 83.

- Dávila-Figueroa C., Rosa- Carrillo M. & Molphe E. 2005. *In vitro* propagation of Eight Species or Subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 41: 540-545.
- Debergh P. & Read P. 1991. Micropropagation: Technology and Application. Dordrecht, Netherlands. Kluwer. Academic Publisher. pp 1-13.
- Debnath S. & McRae K. 2005. A one-step *in vitro* cloning procedure for cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.): The influence of cytokinins on shoot proliferation and rooting. *Small Fruits Review*. 4: 57-75.
- Duarte F., Mascarenhas A., Souza A. & Carvalho M. 2009. Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. *Brasil. Frutic. Jaboticabal*. 32: 612-617.
- Esaú K. 1985. Anatomía Vegetal, Tercera edición, Ediciones Omega S. A. Barcelona-España. pp. 760.
- Fay M. & Gratton J. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Fuentes L., Mesa A., Ruíz M., Peláez M. & Fernández M. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Matanzas-Cuba. Pastos y Forrajes*. 28:199-208
- Fortes, A.M. & Pais, M.S. 2000. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany*. 87:971
- Garcés M. 2003. Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (Cactaceae), una especie endémica de Chile en peligro de extinción. Tesis presentada como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias. Santiago-Chile. pp. 52
- George Edwin. 1993. Plant propagation by Tissue Culture: part I. Second Edition. British Library. England. pp. 478.
- George E. & Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. England. pp. 709.
- George E. 1996. Plant Propagation by Tissue Culture: part II. Second Edition. England. Exegetics Limited. pp. 903-908.
- Giusti, P., Vitti D., Fiocchetti F., Colla G., Saccardo F. & Tucci M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Godínez-Álvarez H., Valverde T. & Ortega-Báez P. 2003. Demographic Trends in the Cactaceae. *Bot. Rev.* 69: 173-203.

- Gomes F., Fernades F., Barbeta P., Facó O. & Campos F. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*. 108: 15-21.
- Gusmán E. 2005. Pautas para la introducción *in vitro* y multiplicación de *Hylocereus Triangularis* (Britton & Rose 1909) como herramienta para la conservación y el desarrollo sostenible de los bosques húmedos y secos. Loja-Ecuador. pp. 49.
- Guttenberg H. Von. 1940. Der primäre Bau der Angiospermen-wurzel. *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder Borntraeger. Berlin. 8:39.
- Glaforo J., Flores A. & Velasco C. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el Noreste de México. Monterrey-México. pp5-11
- Hubstenberger J., Clayton P. & Phillips G. 1992. Micropropagation of Cacti. (Cactaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin-Germany. pp. 49-68.
- Huetteman C. & Preece J. 1993. Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and organ culture* 33:105-11.
- Hurtado DV. & Merino M. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. 2ed. Trillas MX. Pp.230
- Jacyna T. & Barnard J. 2008. Modification of branching behavior in apical-dominant apple trees with plant growth regulators and their residual effects on tree growth after transplanting. *Journal of the American Pomological Society* 62(4):160-172.
- Johnson J. & Emino E. 1979. Tissue culture propagation in the cactaceae. USA. *Cact. Succ. J.* 51: 275-277.
- Salinas J. 2009. Métodos de propagación Vegetal. Universidad de Cudinamarca: Facultad de ciencias agropecuarias. Colombia. pp. 4.
- Kolar Z., Bartek J. & Vyskot B. 1976. Vegetative Propagation of the cactus: *Mammillaria woodsii* Craig trough tissue cultures. *Experientia* 32: 668-669.
- INTA. 1996. Catalogo de Tecnología: guía tecnológica de cultivo de pitahaya. Managua-Nicaragua. pp. 21.
- Liogier H. 1994. Descriptive Flora of Puerto Rico and Adjacent Islands. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico. pp. 306-312.
- Lira R. 2000. Fisiología Vegetal. Primera edición. Ed. Trillas. Impreso en México. pp. 275.
- López G. 2004. Belleza del Desierto: Plantas suculentas, cactus. México. pp. 1-5.
- Loza S., Terrazas T., López L. & Trejo C. 2003. Características Morfo- anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretoensis* (cactaceae). Caracas-Venezuela. pp. 83-89.

- Machado M., Mangolin C., Oliveira S. & Prioli A. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In vitro* Cell. Dev. Biol. 31: 47-50.
- Machado M., Oliveira S. & Mangolin C. 1999. Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais "*in vitro*". Editora da Universidade Estadual de Maringá. Brasil. 95pp.
- Madsen J. 1989. Flora del Ecuador: Cactaceas. Editorial Board. EEUU.
- Madsen J. 2002. Cactáceas del Sur del Ecuador. pp 289-303 en Aguirre Z., Madsen J., Cotton E. & Balslev H. (eds). Botánica Austroecuatoriana. Estudios sobre los recursos vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Eco Ciencia. Ecuador. pp. 489.
- Malda G., Backhaus R. & Martin C. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 1-9.
- Mauseth J. & Hampering W. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (cactaceae) *Amer. J. Bot.* 62(8): 869-877.
- Mauseth J. 1978. An investigation of the morphogenetic mechanisms which control the development of zonation in seedling shoot apical meristems. *Amer. J. Bot.* 65: 158-167.
- Mauseth J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile cultivation of axillary buds. *Cactus Succ. J.* 51: 186-187.
- Marín-Hernández T., Márquez-Guzmán J., Rodríguez-Garay. & Rubluo A. 1998. Early stages in the development of somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* Sanchez mejorada (Cactaceae) a severely endangered species. *Argentina*. 62(1/2):181-186.
- Marcotrigiano M., McGlew S., Hackett G. & Chawla B. 1996. Shoot regeneration from tissue-cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44:195-199.
- Martin M. 1993. Micropropagación y conservación *in vitro* de seis especies del genero *Limonium* endémicas de la Península Ibérica. Madrid-España. pp. 140-143.
- Mata-Rosas M., Monroy-De La Rosa M., Goldammer K. & Chávez-Ávila V. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glass Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 400-404.
- Mejía R. & Vittorelli C. 1988. Cultivo *in vitro* de Plantas de Papa. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agro Industrial. 109 p.
- Minocha S. & Mehra P. 1974. Nutricional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 61(2): 168 - 173.

- Moreira M., Pasqual M., Carvalho J. & Fráguas C. 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola'. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras. 7(5):1002-1005.
- Morales-Rubio M., Morales-Vallarta M., Treviño-Neávez J., Garza-Padrón R., Rodríguez-Garza R., Mar-Aguilar F., Reséndez-Pérez D., Verduzco-Martínez J., Cavazos-González R., Elizondo-Herrera A. & Barrón-González M. 2010. Actividad amebicida de extractos de tejidos *in vivo* e *in vitro* de cuatro especies de cactáceas sobre *entamoeba histolytica*. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología biomédica*. México. pp 1:2.
- Mosco A. (2009). Micro-morphology and anatomy of *Turbinicarpus* (Cactaceae) spines. *Rev. Mex. Biod.* 80, 119–128.
- Mok C., Mok D. & Armstrong D. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thiadiazuron). *Phytochemistry* .21: 1509-1511.
- Mok M., Mok D., Turner J. & Mujer C. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivates in tissue cultere systems. *HortSciencie*. 22: 1194-1197.
- Nava-Esparza V. & Yáñez L. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. México. *Cacti*. Suc. 29: 3-7.
- Nyffeler R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from TRNK/MATK and TRNL-TRNF sequences. *Am. J. Bot.* 89: 312-326.
- Nilsen E. 1995. Stem photosynthesis: extent, patterns, and role in plant carbon economy. In: *Plant stems: physiology and functional morphology*. Academic Press, San Diego. pp. 223-240.
- Nitsch J. 1951. Action du jus de tomate del sur la croissance des tissus de crown-gall cultives *in vitro*. Paris. *Acad. Sci.* 233: 1676-1677.
- Olivera-Ortega V., Gutiérrez- Espinosa A., Gutiérrez- Espinosa J. & Andrade-Rodríguez M. 2000. Cultivo *in vitro* de *Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*. 12(3): 75-80.
- Oliveira S., Pires M., Priolli A. & Mangolin C. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* MILL. (Cactaceae.) *In vitro Cellular Development. Biology Plant* 31:47–50.
- Ojeda-Zacarías M., Luna-Olvera A., Morales-Ramos L., Verde-Star M., Torres-Cepeda T., Pereyra-Alfárez B., Iracheta- Donjuan L., Olivares-Sáenz E., Salazar-Sáenz R. & Cárdenas-Cerda E. 2006. Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul. Argentina. *Botánica Experimental*. 75: 109-113.
- Ordoñez M. 2003. Propagación *In vitro* de *Mammillaria voburnensis* (Cactaceae). Universidad de San Carlos. Guatemala. pp. 17-51.

- Ortiz D., Lumbreras E. & Roselló. 2009. Flora Alactona valenciana: familia Cactaceae. *Bouteloua*. 5:148
- OIRSA. 2000. Manual Técnico de buenas prácticas de cultivo en Pitahaya. Nicaragua. pp.54
- Passey J., Barret K. & James D. (2003). Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch) using a range of explant types. *Plant. Cell Rep.* 21:397-401.
- Paniagua G. 1980. Contribución al estudio de las cactáceas del departamento de "El Progreso". Tesis de Licenciada en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala: Escuela de Biología. Guatemala pp. 146.
- Pelah D., Kaushik A., Mizrahi Y. & Sitrit Y. (2002) Organogenesis in the vine Cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 81-84.
- Pérez F., González M. & Martínez J. 2003. Introducción a la biología vegetal: Parte II: Fisiología Vegetal. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola y Universidad Politécnica de Madrid. pp. 65-72.
- Pérez E., Pérez M., Dávila C. & Villalobos E. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hortscience* 37(4): 693 – 696. 2002.
- Pérez-Molphe E., Villalobos E., Meza E., Morone L. & Lizalde J. 1998. Propagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 34: 131-135.
- Pierik M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid- España. pp. 326.
- Pietri M. 1993. Guía tecnológica para la producción de la Pitahaya (*Hylocereus undatus*). Instituto Nicaragüense de Reforma Agraria. Managua-Nicaragua. pp.71.
- Poljuha D., Balen B., Bauer A., Ljubescic N. & Karsnik-Rasol M. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 75: 117-123.
- Quiala E., Montalvo G., Matos J. & Mederos R. 2007. La biotecnología vegetal: Su aplicación para el manejo integrado de cactáceas cubanas amenazadas Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara-Cuba. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* 4(3).
- Quintana M., Ulloa L., Napoles J., Moles A. & Carbonell A. 1999. Organogénesis en *Crotalaria retusa* SE-61. Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus. Cuba.

- Ramírez G., Escobedo L., Robledo V. & Portos N. 2005. Análisis anatómico comparativo entre plantas *in vitro* y plantas de desarrollo normal de cactáceas en peligro de extinción. México. pp. 476-481.
- Ramírez-Serrano C. & Soltero-Quintana R. 2007. Optimización de la Micropropagación de cactus mediante la estimulación de aréolas dormantes en *Turbincarpus pseduomacrolele*, *Mammillaria geminispina* y *Echinocereus viridiflorus*. México.
- Ramírez F. 2006. Manual de producción de pitahaya. Puebla-México. pp.1-14.
- Ríha J. & Subik R. 1991. Enciclopédia de los Cactus. Checoslováquia. Spektrum. Brno. pp. 350.
- Rodríguez L. & Apezteguía R. 1985. Cactus y otras suculentas de Cuba. Editorial Científico-Técnica. Habana-Cuba. pp. 213.
- Rodríguez C. 2000. Pitahayas. Estado mundial de su cultivo y comercialización. Fundación Yucatán, México. Produce, A.C. Universidad Autónoma Chapingo. 153 p.
- Rodríguez C. 2006. Morfogénesis *in vitro* de nueve especies de interés botánico y ornamental pertenecientes a la familia Cactaceae. Valdivia-Chile. pp.122.
- Rout G., Samantaray S. & Das P. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuana* A. Richard. Scientia Horticulturae. 86:71-79.
- Ross M., Thorpr T. & Costerton J. 1973. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. Am. J. Bot. 60: 788-795.
- Rubluo A., Chavez V., Martinez A. & Martinez-Vazquez O. 1993 Strategies for recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Biol. Conserv. 63: 163-169.
- Rubluo A., Reyes J., Brunner I., Rodríguez B., Pimienta E., Izquierdo J. & Palomino G. 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en cactáceas para zonas áridas FAO. Santiago-Chile. pp. 345.
- Rubluo A., Marín T., Duval K., Vargas A. & Márquez J. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subculture *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada. Cactaceae. Sci. Hortic. 95:341-349.
- Ruvalcaba-Ruiz D., Rojas-Bravo D. & Valencia-Botín A. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. Guadalajara-México. Tropical and Subtropical Agro ecosystems. 12: 139-143.
- Salinas-Soto P. & Gómez-Sánchez M. 2007. Anatomía vegetativa de *Mammillaria mathildae* (Cactaceae), especie micro-endémica y en peligro de extinción. Zacatecas-México. pp. 1-4.
- Starling R. & Dodds J. 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. Bradleya. 1: 84-90.

- Terrazas T. & Mauseth J. 2002. Shoot Anatomy and Morphology. The Cacti: biology and uses. California University Press. California-USA. pp. 47-69.
- Terrazas T., Loza-Cornejo S. & Arreola-Nava H. 2005. Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus*. (Cactaceae). México. *Acta. Bot.* 28 (2): 321-336.
- Terrazas T. & Loza-Cornejo S. 2002. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: cladistic analysis bases on anatomical-morphological data. Arizona-USA. pp. 66-86.
- Tisserat B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration: in plant cell culture a practical approach. Edition Dixon. Department of Biochemistry. pp. 90.
- Torrey J. 1957. Auxin control of vascular pattern formation in regenerating pea root meristems grown *in vitro*. *Amer. Jour. Bot.* 44: 859-870.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. & Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 69(3): 233-249.
- Vyzkot B. & Jára Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science. USA.* 59(3): 449-452.
- Wakhlu A. & Bhau B. 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphanta elephantidens* (Lem). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 36: 211-214.
- Weaver J. 1926. Root development of field crops. Nueva York. pp. 26-28
- Wilhelm E. 1999. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 57: 57-60.
- Yáñez O. 2010. Evaluar el efecto de los brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* en banano (*Musa* spp). pp. 119.
- Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Deberg, P y Zimmerman, R. (eds). *Micropropagation: Technology and Application.* Kluwer Academic Publishers. pp: 45-69.