

# PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer A PARTIR DE ARÉOLAS

J. M. Choreño-Tapia<sup>1</sup>; H. González-Rosas<sup>2</sup>; T. Terrazas-Salgado<sup>3</sup>; A. Hernández-Livera<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Egresado Especialidad de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Av. Federico Gómez No. 66 Bo. San Miguel, Zumpango, Estado de México. C. P. 55600. México. Correo-e: danyapir@prodigy.net.mx (\*Autor responsable)

<sup>2</sup> Especialidad de Fruticultura. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. C. P. 56230. México

<sup>3</sup> Especialidad de Genética. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. C. P. 56230. México

<sup>4</sup> Especialidad de Botánica. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. C. P. 56230. México

## RESUMEN

La micropropagación de cactáceas a partir de la activación de aréolas ha generado una opción para la multiplicación y preservación de muchas especies, principalmente en aquellas donde la producción de semilla es limitada o cuando se carece de material vegetal. Aréolas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer, fueron sembradas, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) complementado con ácido naftalenacético (ANA) sólo y en combinación con 6-benzyladenina (BA) o cinetina (K) en concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0 y 3.0 mg-litro<sup>-1</sup>. Después de 21 días la activación de aréolas se inició en 0.3 ANA+3.0 BA mg-litro<sup>-1</sup>. A los 61 días, cuando las plántulas alcanzaron 2.5 cm de altura se subcultivaron para su multiplicación en tres condiciones: Plántulas enteras, plántulas sin ápice y plántulas fraccionadas (apical, media y basal). Después de 40 días, la mejor respuesta en número de brotes se logró con plántulas fraccionadas obteniéndose hasta 11 brotes en promedio con una altura de 0.9 cm y un diámetro de 0.6 cm, con apariencia vigorosa y sana. Posteriormente, los brotes fueron transferidos a medio sin reguladores, en donde, espontáneamente formaron raíz a los 30 días de la incubación.

**PALABRAS CLAVES ADICIONALES:** micropropagación, cultivo de tejidos, activación, cactus.

## *In vitro* PROPAGATION OF *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer FROM AREOLAS

## SUMMARY

Micropropagation of cacti from the areola has generated an important option for the multiplication and preservation of many species, especially those in which seed production is limited, or when there is no plant material available. Areolas of *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer were cultivated in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with naphthaleneacetic acid (NAA) only, and in combination with 6-benzyladenine (BA) and kinetin (K) in concentrations of 0.0, 0.3, 1.0, and 3.0 mg-liter<sup>-1</sup>. After 21 days, areola activation began with NAA 0.3 + BA 3.0 mg-liter<sup>-1</sup>, and 61 days later, when plantlets reached 2.5 cm in height, they were subcultivated for multiplication under three conditions: whole plantlets, plantlets without apex, and fractional plantlets (apical, middle, and basal). After 40 days, the best response in number of buds was achieved with fractional plantlets, obtaining 11 shoots with a height of 0.9 cm and a diameter of 0.6 cm, on average, and vigorous, healthy appearance. Later, the shoots were transferred to an environment without regulators, where they formed roots spontaneously after 30 days of incubation.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** Micropropagation, tissue culture, activation, cacti.

## INTRODUCCIÓN

La demanda de las cactáceas como plantas de ornato y su poco abastecimiento han ocasionado que muchas de ellas sean extraídas directamente del campo en forma de contrabando, por lo que las poblaciones silvestres están siendo mermadas constantemente, lo cual conlleva a estragos ecológicos irreversibles llegando prácticamente a la exterminación de algunas especies, ya que la habilidad

recolectora excede a la tasa natural de reproducción (Park, 1998). Entre estas se encuentra *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer conocida como "viejito"; especie endémica de México cuya distribución se restringe al estado de Hidalgo y parte de los estados de Guanajuato y Veracruz, en México (Bravo-Hollis, 1978).

El uso como planta de ornato ha ocasionado que esta especie se encuentre en la categoría amenazada por la

extinción, en la Norma Oficial Mexicana de Protección de Flora y Fauna Silvestre Terrestre y Acuática (NOM – 059) (Anónimo, 1994) por las causas siguientes: la extracción masiva de semillas limita su multiplicación en su hábitat, la eliminación de plantas nodrizas por sobre pastoreo, la recolección de plantas jóvenes y la extracción de partes apicales de plantas adultas (Riemman, 2000). Por esta situación, es conveniente utilizar nuevas técnicas de propagación como el cultivo *in vitro* pues puede resultar una herramienta a considerarse para el mantenimiento de poblaciones de especies amenazadas o en peligro de extinción, puesto que a partir de esta técnica se genera la proliferación masiva de plantas, con un crecimiento rápido, favoreciendo su comercialización y preservación (Sánchez, 1994).

Mediante el cultivo *in vitro* se han propagado distintas especies de cactáceas que tienen un bajo índice de reproducción. Generalmente, las cactáceas se han propagado *in vitro* mediante la germinación de semillas como lo señalan Clayton (1990) en 11 especies de cactáceas catalogadas como raras y en peligro de extinción; Raya y Nava (1995) en *Ariocarpus retusus*; y Malda *et al.* (1999a) en *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*. Martínez y Rubluo (1989) micropropagan *Mammillaria san-angelensis* y *M. haageana* empleando la zona apical. Pocas especies se han propagado empleando la activación areolar. Los trabajos que se conocen son de Vyskot y Jara (1984) en *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera* y *Astrophytum ssp* y Dabekaussen *et al.* (1991) en *Sulcorebutia alba* Rausch. Ault y Blackmon (1987) describieron el empleo de altas concentraciones de citocinina y mínimas cantidades de auxinas para activar las aréolas en *Ferocactus acathodes*. El presente estudio tiene como objetivo generar un esquema de micropropagación para la especie *Cephalocereus senilis* con la finalidad de incrementar su población así como su preservación a través de la evaluación de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento como ANA (ácido naftalenacético), BA (benciladenina) y K (cinetina) en la activación de aréolas así como determinar su efecto en el subcultivo de plántulas enteras, fraccionadas y sin ápice con relación al número de brotes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Embriogénesis perteneciente a la Especialidad de Fruticultura del Colegio de Postgraduados en Montecillos, municipio de Texcoco, Estado de México.

Se utilizaron plantas de *Cephalocereus senilis* de aproximadamente tres años de edad, con una altura de 8.0 cm y diámetro de 4.5 cm con apariencia sana adquiridas en viveros de Xochimilco, D.F., México. A las plantas se les eliminó la raíz, cerdas y espinas con tijeras previamente desinfectadas. Los tallos se remojaron en dos tiempos con

agua tibia jabonosa durante 20 minutos y se tallaron con cepillo dental de cerdas suaves tratando de no afectar las aréolas. Se enjuagaron con abundante agua de la llave y se sumergieron en una solución de fungicida 6 g-litro<sup>-1</sup> (Fungimicin 500®) durante 20 minutos, enjuagándose con agua destilada. Posteriormente se colocaron en una solución antioxidante (150 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 150 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido ascórbico) durante 20 minutos. La desinfestación se hizo colocándolos en alcohol al 70 % durante tres minutos, posteriormente en una solución de hipoclorito de calcio al 4 % por 20 minutos adicionado con 0.01 % de Tween 20, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Las aréolas se extrajeron fraccionando el tallo con un bisturí en explantes conteniendo una y tres aréolas. Cada fracción se colocó en la solución antioxidante esterilizada (150 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 150 mg-litro<sup>-1</sup> de ácido ascórbico) durante 20 minutos antes de sembrarse.

El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MS) (1962) como medio basal, complementado con glicina (2 mg-litro<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg-litro<sup>-1</sup>) tiamina HCl (0.4 mg-litro<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg-litro<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (2.0 mg-litro<sup>-1</sup>) + sacarosa 30 g-litro<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.7 ± 1. Se solidificó con 7.5 g-litro<sup>-1</sup> de agar (Sigma). Se propusieron como reguladores del crecimiento ANA (ácido naftalenacético), BA (benciladenina) y K (cinetina) solas y combinadas en concentraciones 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 mg-litro<sup>-1</sup> en la forma siguiente: ANA:BA, ANA:K.

En tubos de ensayo se sirvió 20 ml de medio de cultivo sellándose con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min. Los explantes se incubaron a temperatura de 27 °C ± 2 con fotoperiodo de 16 h de luz. La fuente luminosa estuvo dada por lámparas fluorescentes las cuales proporcionaron una intensidad luminosa de 62.5 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

El experimento consistió en determinar el mejor tratamiento con reguladores de crecimiento para inducir la activación del mayor número de aréolas, la multiplicación y la inducción de raíz. Las plántulas obtenidas (2.5 cm de altura y 1.0 cm de diámetro) se subcultivaron enteras, sin ápice y fraccionadas en partes apical, media y basal en el tratamientos 14 (ANA 0.3 + BA 3.0 mg-litro<sup>-1</sup> y ANA 0.3 + K 3.0 mg-litro<sup>-1</sup>).

El diseño estadístico empleado fue completamente al azar. Para determinar la mejor concentración de los reguladores del crecimiento se consideraron 15 tratamientos y el testigo, cada uno con 10 repeticiones (10 tubos de ensayo, un tubo como unidad experimental); de los tratamientos en donde se observó respuesta en la activación de aréolas se seleccionaron dos con 10 repeticiones, considerando en ambos casos un explante con tres aréolas, haciendo un total de 30 aréolas por tratamiento. Por el número limitado de plántulas obtenidas,

a partir del cultivo de una areola en el establecimiento del explante, sólo se pudo establecer tres tratamientos con cinco repeticiones cada uno; se consideró un frasco como unidad experimental conteniendo una plántula. Las variables evaluadas fueron: inducción callos, número de aréolas activadas, número de brotes, altura de brotes y diámetro de los brotes. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inducción de callos

#### Efecto ANA:BA

En todos los tratamientos, la formación de callo se indujo a los 21 días después de la siembra del inóculo (Cuadro 1). De estos, los tratamientos 10, 14 y 15 produjeron el mayor número de callos. Los resultados sugieren un balance favorable entre ambos compuestos como lo señalaron Starling (1985), Martínez y Rubluo (1989) y Clayton *et al.* (1990) quienes afirmaron que el efecto de BA en una mayor concentración que ANA, favorece la desdiferenciación del tejido. De hecho, en el tratamiento 13, sin auxinas, se denota que ésta es indispensable para la división celular por lo que sólo 20 % formó callo, posiblemente en función de las auxinas endógenas del tejido. La formación de callo inició a partir de un hinchamiento de la aréola, surgiendo de los lados del explante, envolviéndolo hasta formar una “masa amorfa”, compacta de color verde limón. En el tratamiento 14, además de callo, se obtuvo una respuesta en la activación aréolar, lo que podría indicar que 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA promueve la diferenciación de los meristemos areolares.

#### Efecto ANA:K

Con los tratamientos 10, 14 y 15 se obtuvo un 100 % en la inducción de callos a los 21 días después de la siembra del explante (Cuadro 1). La combinación de la auxina a niveles de 0.3 y 1.0 mg·litro<sup>-1</sup> (tratamiento 10) y 1.0 y 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> de K (tratamiento 15) señalaron que con una mayor cantidad de cinetina se tienen mejores resultados, similares a lo encontrado por Ault y Blackmon (1985, 1987), en las especies *Echinocereus pectinatus*, *Ferocactus covillei*, *F. acanthodes* y *F. wislizenii*.

La cinetina es un estimulante de la división celular que aunado a las auxinas promueven e inducen la desdiferenciación, y en algunos casos la neoformación de yemas (Berkaloff, 1984). Esto puede explicar el porqué el efecto del tratamiento 14, que además de callo, estimuló la activación de aréolas.

**CUADRO 1. Formación de callos con ácido naftalenacético (ANA), benciladenina (BA) y kinetina (K) en explantes aréolares de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.**

Tratamiento	Concentración (mg·litro <sup>-1</sup> )		Número de Callos	
			ANA:BA	ANA:K
2	0.3	0.0	0.600 b <sup>2</sup>	0.500 b
3	1.0	0.0	0.900 ab	0.500 b
4	3.0	0.0	0.300 c	0.200 c
5	0.0	0.3	-	0.400 b
6	0.3	0.3	0.900 ab	0.500 b
7	1.0	0.3	0.700 b	0.200 c
8	3.0	0.3	-	0.300 c
9	0.0	1.0	-	0.200 c
10	0.3	1.0	1.000 a	1.000 a
11	1.0	1.0	0.600 b	0.200 c
12	3.0	1.0	0.600 b	-
13	0.0	3.0	0.200 c	-
14	0.3	3.0	1.000 a	1.000 a
15	1.0	3.0	1.000 a	1.000 a

<sup>2</sup>Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

### Activación de aréolas

La inducción de brotes, tanto en los explantes de la planta inicial como en los de plántulas fraccionadas subcultivadas, se presentó a los 21 días iniciando con un hinchamiento de la aréola y emergiendo el nuevo brote (Cuadro 2). Es importante mencionar que el crecimiento del callo fue más rápido que el brote, llegándolo a cubrir por completo, por lo que fue necesario removerlo. El tratamiento 14 (ANA 0.3 + BA 3.0 mg·litro<sup>-1</sup>) promovió la activación de las aréolas con el 70 %, más que con cinetina (Figura 1 y 2). Por los resultados obtenidos se puede suponer que las citocininas son necesarias para este efecto, lo que corresponde a lo señalado por Mauseth y Halperin (1975) y Mauseth (1976) quienes encontraron efectos positivos con BA (10 mg·litro<sup>-1</sup>) en *Opuntia polycantha*. Así mismo, Mauseth (1979) considera que, las concentraciones óptimas de BA oscilan entre 1 y 10 mg·litro<sup>-1</sup>. Por su parte, Dabekaussen *et al.* (1991) al trabajar con *Sulcorebutia alba* encontraron que la activación de aréolas no requirió de la adición de una auxina. Vyskot y Jara (1984) indicaron que en *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus spachianus* se debe utilizar cinetina o BA en concentraciones que están entre los 0.5 y 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> en combinación con 0.5 a 5.0 mg·litro<sup>-1</sup> ANA. Estas concentraciones se acercan a los resultados de la especie estudiada. Por otra parte, cuando el explante contiene aréolas y son puestos en un medio preparado con la concentración apropiada de citocininas, los meristemos axilares se activan, produciendo brotes (Mauseth y Halperin, 1975). Además, estos últimos autores

señalaron que es posible que el BA actúe directamente en el meristemo de la aréola y que ANA lo haga en la yema que contiene procambium, pero también es posible que los reguladores de crecimiento actúen en diferentes sitios produciendo una sustancia que estimula los respectivos meristemos.

CUADRO 2. Número de aréolas activadas por tratamiento de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer (tratamientos 14).

Concentraciones (mg·litro <sup>-1</sup> )	Áréolas por tratamiento	Areolas activadas	Medias
ANA 0.3:BA 3.0	30	20	2.0 a <sup>2</sup>
ANA 0.3:K 3.0	30	6	0.6 b

<sup>2</sup>Valores con la misma letra dentro de columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una P≤0.05. ANA: ácido naftaleno, BA: bencilanina, K: kinetina.



Figura 1. Activación de una aréola de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer con ácido naftalenacético y kinetina.



Figura 2. Activación de dos aréolas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer con ácido naftakenacético y kinetina.

Multiplicación de brotes

En plántulas enteras se encontró que en la concentración de 0.3 mg·litro<sup>-1</sup> de ANA y 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA se indujeron el mayor número de brotes en la parte basal con 18, seguido de la parte media con seis y la apical con cuatro (Cuadro 3). Se puede suponer que esta respuesta está relacionada con la mayor acumulación de citocininas de la zona basal y va disminuyendo hacia el ápice.

CUADRO 3. Altura y diámetro de los brotes obtenidos en plántulas enteras subcultivadas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.

Número de plántulas	Número de brotes			Altura (cm)	Diámetro (cm)
	apical	media	basal		
1	1			0.30	0.40
		4		0.43 ± 0.17 <sup>2</sup>	0.50 ± 0.22
			3	0.60 ± 0.40	0.73 ± 0.28
2	0				
		0			
			2	1.35 ± 0.21	0.95 ± 0.07
3	0				
		0			
			8	0.69 ± 0.46	0.80 ± 0.28
4	3			0.40 ± 0.10	0.40 ± 0.10
		2		0.50 ± 0.0	0.65 ± 0.07
			4	0.45 ± 0.23	0.53 ± 0.39
5	0				
		0			
			1	1.0	0.80
Total	4	6	18		

<sup>2</sup>Media ± desviación estándar.

El diámetro promedio de los brotes basales (Figura 3) fue de 0.7 cm, 75 % de diferencia de los brotes medios con 0.5 cm.



Figura 3. Brotes generados de plántulas subcultivadas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer en ácido naftalenacético:benciladenina.

La altura promedio de los brotes fluctuó de 0.3 cm en la parte apical hasta 1.3 cm en la parte basal. Los brotes que se obtuvieron en la parte basal fueron 43.2 % más grandes que los de la sección media. La respuesta obtenida podría deberse a que la parte basal es la que mayor contacto tiene con el medio y por ende con los reguladores adicionados, por lo que la asimilación de las mismas puede ser más rápida y distribuirse más lentamente hacia el ápice de la planta, siendo esta parte la que mayor gasto de energía requiere para asimilarlos. Clayton *et al.* (1990), Rodríguez y Rubluo (1994) y Malda *et al.* (1999 b) señalaron que, en



distintas especies de cactáceas, concentraciones altas de BA y bajas de ANA inducen la brotación, datos que concuerdan con las concentraciones en las cuales se indujo la brotación (ANA 0.3:BA 3.0 y ANA 0.3:K 3.0 en mg·litro<sup>-1</sup>).

Al fraccionar la plántula, la mayor proliferación de brotes se presentó en la parte media con 38 brotes en total, 52.7 % más que la parte basal (Cuadro 4), con 18 brotes y en la parte apical no se obtuvieron brotes, sólo se indujo crecimiento de callo. La mayor altura de los brotes se presentó en la parte basal alcanzando 1.5 cm en promedio a diferencia de los brotes medios con 0.8 cm, correspondiendo al 54 % de diferencia con la parte basal. En cuanto al diámetro, la mayor ganancia se observó en los brotes basales con un promedio de 0.8 cm, en comparación de los 0.6 cm de la parte media. Las diferencias encontradas entre los dos tipos de explante coinciden con lo señalado por Dabekaussen *et al.* (1991), Rodríguez y Rubluo (1994) considerando que la tasa de multiplicación está relacionada con el genotipo, tipo de explante, así como por el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento.

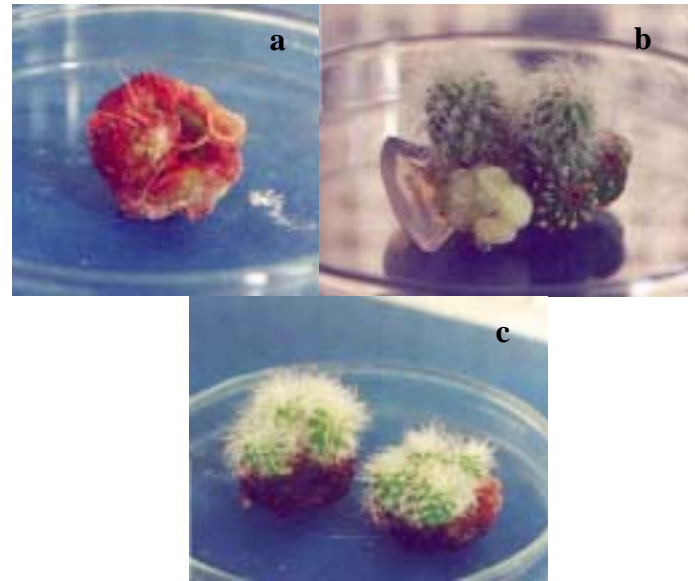
El explante apical contenía al meristemo apical, estructura en la cual se sintetizan las auxinas (Figura 4a). Estos reguladores estimulan especialmente el alargamiento celular del tallo e inhibe el crecimiento de las yemas laterales, de tal forma que al eliminar la dominancia apical, se estimula la formación de brotes a partir de la activación areolar, en la parte basal. Al interrumpir la dominancia propia del ápice, es posible que las citocininas endógenas junto con los niveles de citocininas exógenas causaran la activación de las aréolas induciendo la brotación, formándose brotes más grandes y anchos (Figura 4b).

**CUADRO 4.** Altura y diámetro de los brotes, originados al fraccionar las plántulas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.

Número de plántulas	Número de brotes			Altura (cm)	Diámetro (cm)
	apical	media	basal		
1	0	9		0.92 ± 0.18 <sup>2</sup>	0.62 ± 0.14
			4	1.38 ± 0.48	0.90 ± 0.34
2	0	6		0.85 ± 0.18	0.60 ± 0.19
			3	1.57 ± 0.65	0.76 ± 0.15
3	0	8		0.76 ± 0.15	0.59 ± 0.13
			3	1.70 ± 0.40	0.87 ± 0.15
4	0	7		0.73 ± 0.14	0.59 ± 0.15
			4	1.33 ± 0.47	0.73 ± 0.34
5	0	8		0.80 ± 0.15	0.60 ± 0.16
			4	0.42 ± 1.73	0.85 ± 0.12
Total	0	36	18		

<sup>2</sup> Medias ± desviación estándar.

En cuanto a la parte media, se supone que al eliminarse la "competición" de los dos extremos, la zona meristemática tiene mejor contacto con los reguladores del crecimiento exógeno por lo que se expresa en mayor grado el efecto del meristemo areolar, sin embargo, la diferencia en el tamaño de los brotes es notoria (Figura 4c). La presencia de brotes en la parte media es mayor, pero son más pequeños y con menor diámetro que los obtenidos en la parte basal. Estos resultados fueron similares a los mencionados por Rodríguez y Rubluo (1994) en *Aztekium ritleri*.



**Figuras 4.** Brotes generados de la parte apical (a), basal (b) y media (c) del subcultivo de plántulas fraccionadas de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.

La eliminación del ápice de las plántulas, causó brotes más vigorosos (Cuadro 5), la altura promedio de éstos fue de 1.8 cm con un diámetro de 0.9 cm (Figura 5). Esta respuesta se presenta, porque antes de realizar el corte, el meristemo apical es activo. Los meristemos situados en las aréolas no se desarrollan con tanta rapidez, si se suprime el meristemo apical, las aréolas entran en crecimiento inmediatamente, puesto que se elimina la inhibición del crecimiento, y al aplicarse las auxinas exógenas al medio en combinación de la citocinina probablemente activa la brotación.



**Figura 5.** Brotes generados de plántulas subcultivadas sin ápice de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.

**CUADRO 5. Altura, diámetro y número de brotes en plántulas sin ápice de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer.**

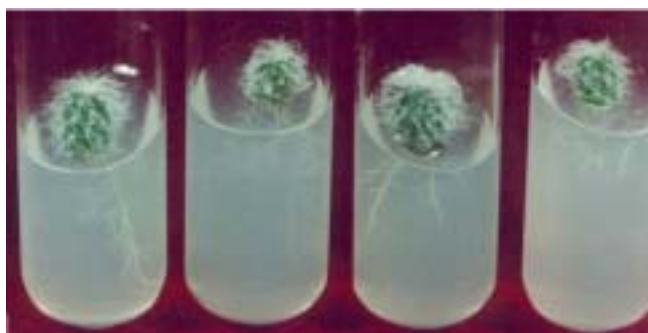
Plántula	Altura (cm)	Diámetro (cm)	Brotes basales (número)
1	2.10 ± 0.1 <sup>z</sup>	1.0 ± 0.10	3
2	1.80 ± 0.16	0.80 ± 0.12	4
3	1.90 ± 0.15	0.95 ± 0.05	4
4	1.56 ± 0.32	0.90 ± 0.10	3
5	1.78 ± 0.33	0.90 ± 0.18	4
Total			18

<sup>z</sup> Media ± desviación estándar.

Es importante indicar que con los tres métodos empleados, la cantidad de brotes es considerable y que se obtienen a partir de la combinación de los reguladores ANA (0.3 mg·litro<sup>-1</sup>) y BA (3.0 mg·litro<sup>-1</sup>) y en menos proporción con ANA:K. Por un lado, la diferencia en cuanto al número, vigor y tamaño de los brotes depende de la parte de la planta que se emplee como explante y de acuerdo a esto se tendrá que determinar si se quiere un mayor número de brotes, aunque éstos sean pequeños, o si se desean más grandes para acortar el tiempo de otros subcultivos. Por otro lado, podemos suponer que la diferencia en el número de brotes entre las plantas completas y las fraccionadas pueda deberse a la presencia o eliminación de la dominancia apical, esta planta es de crecimiento monopodial, lo cual ocasiona la síntesis de citocininas y éstas activan las areolas y el crecimiento de brotes. En general, los brotes tuvieron una apariencia sana, en los cuales, sin duda, intervinieron otros factores como la luminosidad y la temperatura, así como la morfología de la propia planta.

### Enraizamiento

El enraizamiento de los brotes se obtuvo a los 30 días (Figura 6), al ser transferidos a un medio sin reguladores para mantener su crecimiento. Este resultado coincide con lo mencionado por Clayton *et al.* (1990) quienes mencionaron que brotes de 11 especies de cactáceas generaron espontáneamente raíces en un medio sin reguladores. Las raíces fueron blancas, fibrosas y con numerosas raicecillas. Las longitudes promedio oscilaron entre 2 y 4 cm. Las plantas se transfirieron a suelo en condiciones de invernadero.



**Figura 6. Enraizamiento de brotes de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer en medio MS sin reguladores del crecimiento.**

### CONCLUSIONES

Los callos obtenidos presentaron un crecimiento rápido.

La activación de aréolas se logró con la combinación ANA 0.3:BA 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> en un lapso de 21 días.

Un mayor número de brotes se logró obtener al fraccionar la plántula en los segmentos, basal y media.

El número de brotes se incrementa a partir del segundo subcultivo.

Se detectó la presencia de raíz sin la adición de reguladores de crecimiento.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar y apoyar los estudios de postgrado del primer autor; al Colegio de Postgraduados por el apoyo en recursos humanos e instalaciones.

### LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-CRN-001-ECOL/1993 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, su protección. Diario Oficial 16 de mayo 1994. D.F. México.
- AULT, J. R.; BLACKMON, W.J. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species. HortScience 20: 541.
- AULT, J. R.; BLACKMON, W.J. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience 22: 126-127
- BERKALOFF, D. 1984. Biología y Fisiología Celular. Ed. Omega, Barcelona, España. 389 p.
- BRAVO, H. H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 103-699.
- DABEKAUSSEN A.; PIERIK, M.; HOCK, J. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Sci. Hort. 46: 283-294.
- CLAYTON, P.; HUBSTENBERT, J.; PHILLIPS, G.; BUTLER, S. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. HortScience 115(2): 337-343.
- MALDA, G.; SUZÁN, H.; RALPH, B. 1999a. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Hort. 81: 71-87.
- MALDA, G.; BACKHAUS, R.; MARTIN, C. 1999b. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. Plan Cell Tissue and Organ Culture 58: 1-9.
- MARTÍNEZ, V.O.; RUBLUO, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. HortScience 64(1): 99-105.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 5: 473-97.

- MAUSETH, J. D. 1976. Cytokinin-and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia policantha* (Cactaceae). *American Journal Botany* 63: 1295-1301.
- MAUSETH, J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus Succulent Journal* 51: 186-187.
- MAUSETH, J. D.; HALPERIN, W. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal Botany* 62: 869-877.
- PARK, S. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. D. F., México. 211 p.
- RAYA, G.; NAVA, A. 1995. Obtención de brotes *in vitro* en dos cactáceas del género *Ariocarpus*: *A. agavoides* y *A. retusus*. VI. Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Dirección General de Educación Tecnológico Agropecuaria, Roque, Celaya, Guanajuato, México. 83 p.
- RIEMMAN, H. 2000. Ecología de los desiertos. *Revista de diálogo cultural entre las Fronteras de México*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. pp. 1-6
- RODRÍGUEZ, G. B.; RUBLUO, A. 1994. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekum ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal* 64: 116-119.
- SÁNCHEZ, M. 1994. Avances en la propagación *in vitro* de cactáceas. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro, México. Folleto 39 p.
- STARLING, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus Succulent Journal* 57: 114-115.
- VYSKOT, B.; JARA, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 59(3): 449-452.