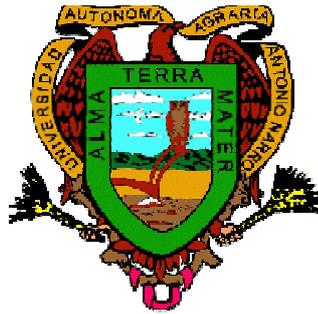


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Aclimatización de *Turbinicarpus valdezianus* propagada *in vitro*

Por:

OBDULIA MARINA ESPITIA HERNANDEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

Ingeniero en Agrobiología

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Enero 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Aclimatización de *Turbinicarpus valdezianus* Propagada *in vitro*

Por:

OBDULIA MARINA ESPITIA HERNANDEZ

Que somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

Ingeniero en Agrobiología

Aprobada por:

MC. Leticia Escobedo Bocado
Presidente del jurado

MC. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Enero 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

Aclimatización de *Turbinicarpus valdezianus* propagada in vitro

Realizado por:

OBDULIA MARINA ESPITIA HERNANDEZ

Que somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

Ingeniero en Agrobiología

Aprobada por:

**M.C. Leticia Escobedo Bocardo
Presidente del Jurado**

M.C. Ricardo Requejo López

M. C. Francisca Ramírez

Godina

Sinodal

Sinodal

**M.C. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía**

Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Enero 2005.

DEDICATORIA

A mis padres:

Isidro Espitia Yañez

y

Maria Luisa Hernández Pérez

Por darme la vida, su amor, su comprensión, apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, por ser uno de los motivos para seguir adelante y seguir luchando por lo que quiero.

A mis hermanas: Isabel, Martha, Amalia, Gaby, por darme su confianza, apoyo y cariño durante mi vida.

A mi hermano Julio (seco), por su amistad, cariño y respeto.

A mi hermana y amiga Pilar, por estar siempre a mi lado en todo momento de mi vida, por su apoyo y cariño ¡Gracias!.

A mis sobrinos Roberto, Eduardo, Paola, Ricky, Fabian, Alex, Diana, Junior, Fernanda, Carlos, Ramon, Ricardo, Dafne, por su cariño, ternura y por enseñarme a sonreír.

A Natalia Ramos por ser una persona importante en mi vida, por seguir conmigo a pesar de todas las adversidades, del tiempo y la distancia, “por ser esa persona especial. tq”.

A Paola Ordóñez, por formar parte de mi vida y ser una persona muy especial para mí. ¡Gracias!.

A mis AMIGOS de generación: José Luis, Fernando, Álvaro T, Elliott, Rogelio, Ricardo, Juan Carlos, José Gildardo, Marvella, Elizaida, Paty, Diana, ¡Gracias por compartir conmigo el hermoso tesoro que es la amistad!

A Gloria Inés por su apoyo moral e incondicional durante toda mi carrera.

A Evelyn Castañeda por brindarme su amistad sincera, su apoyo incondicional en todos los momentos difíciles.

A Leonarda por su valiosa amistad, respeto y apoyo incondicional en los tiempos difíciles.

A mis amigas: Maricela y Sarah por apoyarme durante mi investigación y brindarme su amistad.

A mi amigo y hermano Fabio por brindarme su amistad y permanecer a mi lado en los tiempos difíciles.

Obdulia Marina Espitia Hernández.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en la vida y enseñarme a vivir cada día como si fuera el último.

A mi "ALMA TERRA MATER" por darme la oportunidad de superarme como ser humano y profesionalista.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocado por guiarme durante la realización de este trabajo de tesis, por sus sugerencias, aportaciones y brindarme su amistad.

Al M.C. Ricardo Requejo López por orientarme con sus valiosos conocimientos.

A la M.C. Francisca Ramírez Godina por su disponibilidad en la culminación de este trabajo.

A la Biol. Hermila García Osuna por el apoyo brindado en desarrollo de este trabajo.

A la Lic. Esperanza de la Peña por su valiosa amistad, apoyo, cariño, comprensión y confianza en todo momento.

A la Biol. Ana María Ochoa por su amistad y apoyo que me brindo durante todo este tiempo.

A todos aquellos que me ayudaron a mi formación como profesionalista.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología por el impulso y apoyo financiero para desarrollar este trabajo.

RESUMEN

El trabajo se desarrolló en dos fases, la primera en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales del departamento de Fitomejoramiento y la segunda en el Invernadero ubicado al lado del Departamento de Ciencias del Suelo, ambos situados en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

De las plántulas obtenidas en la etapa de micropropagación se seleccionaron vitroplantas con 2 cm de altura y 1 cm de grosor para su enraizamiento al medio nutritivo de Murashige y Skoog adicionado con 0.08 g l^{-1} de Sulfato de adenina, 0.0004 g l^{-1} de Niacina, 30 g l^{-1} de sacarosa y 9 g l^{-1} de agar, con un pH de 5.5.

Se seleccionaron 120 vitroplantas, 60 con raíz y 60 sin raíz para aclimatarlas en el invernadero. Las vitroplantas se sacaron de los frascos y se les eliminó el medio adherido a las raíces con agua corriente. Se sumergieron en una solución que contenía bactericida y fungicida por 3 minutos y finalmente se colocaron en una solución de raizal por 2 minutos. Se preparó el sustrato con peat moss (turba), perlita y arena de arroyo en proporción 4:4:1 y se esterilizó durante 2 horas a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en la autoclave.

Las vitroplantas se sembraron en macetas de 2 pulgadas de diámetro, Las macetas fueron acomodadas en charolas de plástico de 40 x 60 cm, estas se colocaron en el interior de una cámara plástica.

Las plantas se regaron cada semana con soluciones nutritivas, dos corresponden a las soluciones nutritivas recomendadas por Sonneveld (1994), la tercera al medio de Murashige y Skoog (MS al 50%).

Se obtuvieron plantas de *Turbinicarpus valdezianus* enraizadas *in vitro* utilizando el medio nutritivo MS adicionado con sulfato de adenina y niacina, de las cuales se seleccionaron aquellas que tenían 2 cm de altura y 1 cm de grosor para establecer la fase de aclimatización.

Para altura de la planta de *Turbinicarpus valdezianus* a los 35 y 45 días, las plantas con raíz y regadas con el medio nutritivo MS al 50% constituyeron el mejor tratamiento, alcanzando una altura promedio de 1.2 cm.

En cuanto a diámetro de las plantas de *Turbinicarpus valdezianus* a los 35 y 45 días el mejor tratamiento correspondió a plantas con raíz regadas con el medio nutritivo de MS al 50% resultado un diámetro de 0.87 cm.

El más alto porcentaje de sobrevivencia fue de un 90% en *Turbinicarpus valdezianus* y se obtuvo utilizando plantas con raíz regadas con la solución nutritiva para *Dianthus*.

INDICE DE CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Clasificación Taxonómica de <i>Turbinicarpus valdezianus</i>	4
Descripción del Genero <i>Turbinicarpus</i>	4
Descripción de <i>Turbinicarpus valdezianus</i>	5
Fisiología y Morfología de Raíces de Cactáceas	6
Cultivo de Tejidos	8
Micropropagación	8
Fase 0: Preparación de la planta madre	10
Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia	11
Fase II: Multiplicación de brotes	11
Fase III: Elección de un medio de enraizamiento de los explantos	11
Fase IV: Aclimatización de los explantos enraizados	12
Enraizamiento <i>in vitro</i>	13
Reguladores de Crecimiento	15

Aclimatizacion	16
Importancia de las Raíces en el Proceso de Aclimatización	17
Factores que Influyen en el Proceso de Aclimatización	18
luz	18
Humedad relativa	19
Soluciones Nutritivas	20
Importancia del Calcio y Fosforo en las Plantas	22
Calcio	22
Fósforo	23
Sustratos	24
MATERIALES Y METODOS	27
Enraizamiento <i>in vitro</i>	27
Composición del medio Murashige y Skoog	27
Trasvase del explante	29
Aclimatización en el invernadero (ex vitro)	29
Preparación de soluciones nutritivas	31
Análisis estadístico	35
RESULTADOS Y DISCUSION	36
<i>Aclimatización <i>Turbinicarpus valdezianus</i></i>	36
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
PAGINAS WEB CONSULTADAS	51

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Composición basal del medio nutritivo de Murashige y Skoog 1962.	28
Cuadro 2. Humedad relativa en el proceso de aclimatización de <i>T. valdezianus</i> . Diciembre de 2004.	30
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para la aclimatización en invernadero de vitroplantas de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> . Noviembre de 2004.	31
Cuadro 4. Soluciones ideales para <i>Anthurium</i> (A) y <i>Dianthus</i> (D)	31
Cuadro 5. Solución de MS al 50%.	31
Cuadro 6. Combinación de elementos para la solución nutritiva recomendada para <i>Anthurium</i> . Noviembre de 2004.	32
Cuadro 7. Cantidades necesarias para la preparación de macronutrientes de solución nutritiva recomendada para	32

***Anthurium*. Noviembre de 2004.**

Cuadro 8.	Cantidades necesarias para la preparación de micronutrientes de solución nutritiva recomendada para <i>Anthurium</i>. Noviembre de 2004.	32
Cuadro 9.	Combinación de elementos para la solución nutritiva recomendada para <i>Dianthus</i>. Noviembre de 2004.	33
Cuadro10.	Cantidades necesarias para la preparación de macronutrientes de solución nutritiva recomendada para <i>Dianthus</i>. Noviembre de 2004.	33
Cuadro 11.	Cantidades necesarias para la preparación de micronutrientes de solución nutritiva recomendada para <i>Dianthus</i>. Noviembre de 2004.	33
Cuadro 12.	Análisis de varianza para altura de planta a los 35 días de aclimatización de <i>T. valdezianus</i> en invernadero. Diciembre de 2004.	37
Cuadro 13.	Análisis de varianza para altura de planta a los 45 días de aclimatización de <i>T. valdezianus</i> en invernadero. Diciembre de 2004.	37
Cuadro 14.	Prueba de medias (DMS 0.05) para altura de planta de <i>T. valdezianus</i> de solución nutritiva a los 35 y 45 días de	38

aclimatización. Diciembre de 2004.

- Cuadro 15.** Prueba de medias (DMS 0.05) para altura de planta de *T. valdezianus* en la interacción soluciones nutritivas y plantas con y sin raíz a los 35 días y 45 días de aclimatización. Diciembre 2004. 39
- Cuadro 16.** Análisis de varianza para diámetro de planta a los 35 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004. 39
- Cuadro 17.** Análisis de varianza para diámetro de planta a los 45 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004. 40
- Cuadro 18.** Prueba de medias (DMS 0.05) para diámetro de planta de *T. valdezianus* de solución nutritiva a los 35 y 45 días de aclimatización. Diciembre de 2004. 41
- Cuadro 19.** Prueba de medias (DMS 0.05) para diámetro de planta de *T. valdezianus* en la interacción entre soluciones nutritivas y plantas con y sin raíz a los 40 y 50 días de aclimatización. Diciembre de 2004. 41
- Cuadro 20.** Porcentaje de sobrevivencia de aclimatización de plantas de *T. valdezianus* con y sin raíz a los 35 y 45 días. Diciembre de 2004. 42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de <i>Turbinicarpus valdezianus</i> con raíz y sin raíz a los 35 y 45 días de aclimatización de soluciones nutritivas para <i>Anthurium</i>, <i>Dianthus</i> y MS al 50%.	43

INTRODUCCION

En México existe una gran variedad de flora y fauna, que hacen posible la diversidad de los ecosistemas, entre ellos encontramos los desiertos al que pertenecen las cactáceas.

Las cactáceas son una familia vegetal originaria del continente americano, cuenta con 110 géneros y 1500 especies aproximadamente. Aproximadamente 52 géneros y 850 especies se encuentran en nuestro país, lo que coloca a México como el país con mayor variedad y riqueza de cactáceas a nivel mundial (1).

Las cactáceas son plantas perennes, suculentas, generalmente con espinas, las que son variables en tamaño, forma consistencia, color y disposición; presentan un fruto seco o jugoso con numerosas semillas; sorprenden por las formas extraordinarias de sus tallos y hermosura de sus flores, por la anatomía de sus estructuras, las modalidades de su fisiología, indicadoras ambas de su admirable adaptación a la sequía, son de gran interés científico debido a la variedad de sustancias que se pueden extraer de ellas, las que tienen un amplio uso en la industria alimentaria, farmacéutica y química (2).

En el estado de Coahuila se encuentran 188 especies de cactáceas y 61 variedades comprendidas en 20 géneros, cuenta con una extraordinaria variabilidad morfológica y de adaptación como respuesta a las condiciones

climáticas y ecológicas existentes, por lo que se ubica como una de las áreas cactológica mas importantes del país (Elizondo et. al., 1990).

Las principales causas de presión sobre las especies que consideramos amenazadas o en peligro de extinción son: el crecimiento de las poblaciones rurales y su alto índice de marginalidad, la oportunidad de tener acceso a recursos limitados a través de la venta de ejemplares colectados en los ecosistemas naturales y el cambio de uso del suelo. *Turbinicarpus valdezianus* es una especie sujeta a protección especial según la Norma Oficial Mexicana (Nom-059-ECOL-2001) la cual trata sobre la Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre (1).

Una de las formas de preservación en las cactáceas es la propagación vegetativa la cual puede ser por medio de esqueje, hijuelo o injerto, sin embargo, existen especies en las que ninguno de estos métodos puede usarse y la propagación debe hacerse por semilla, pero en muchos casos las semillas son difíciles de obtener y muchas de ellas no germinan bien por este método (Enríquez, 1994). Para evitar la extinción de muchas especies así como la protección de las mismas se utiliza una técnica de propagación *in vitro* la cual bajo condiciones controladas genera plántulas más grandes en menor tiempo y espacio, por tal razón, es importante conocer el comportamiento que tienen las plántulas al ser trasladadas gradualmente a sus condiciones naturales con mayor eficiencia, aumentado el porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatización al mismo tiempo que se lleve a cabo la reducción de costos.

Considerando lo anterior con el presente trabajo se pretende el objetivo general:

- ◆ Lograr el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.

Objetivos específicos

- ◆ Enraizamiento *in vitro* de *Turbinicarpus valdezianus*.
- ◆ Evaluar el efecto de tres soluciones nutritivas sobre la aclimatización de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.
- ◆ Determinar la importancia de las raíces durante el proceso de aclimatización de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*.

Así mismo se plantea la siguiente hipótesis: Es posible bajo condiciones de invernadero, determinar la solución nutritiva que favorece la sobrevivencia de *Turbinicarpus valdezianus* en el proceso de aclimatización así como determinar el efecto de las raíces en este proceso.

REVISION DE LITERATURA

Clasificación Taxonómica de *Turbinicarpus valdezianus*

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Embryophyta
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Cactales
FAMILIA	Cactaceae
TRIBU	Cacteae
GENERO	<u><i>Turbinicarpus</i></u>
ESPECIE	<u><i>valdezianus</i></u>

(3).

Descripción del Genero *Turbinicarpus*

Son plantas pequeñas más o menos globosas, generalmente simples, provistas de tubérculos, areolas monomorfas, espinas escasas, suaves, no pungentes. Flores en las areolas del ápice de tallo, blancas o de color rosa, pericarpelo desnudo, a veces con una escama diminuta hacia su porción superior; estambres numerosos. Fruto una baya irregularmente deciente. Semillas de 1 a 1.5 mm de longitud; testa negra y verrugosa, sin arillo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Descripción de *Turbinicarpus valdezianus*

Turbinicarpus valdezianus es de origen mexicano (Coahuila, San Luís Potosí), generalmente es una cactáceas de crecimiento reducido y lento, de vida solitaria, ya que rara vez se le encuentra agrupado, son plantas simples. Tallo tuberculado, globoso de alrededor de 5 cm de altura y 3 cm de diámetro de color verde grisáceo. Areolas circulares hasta elípticas, de 2 a 3 mm de diámetro. Espinas radiales y centrales bien definidas. Espinas radiales de 15 a 17, de alrededor de 5 mm de longitud, aciculares, blancas, vítreas, algo plumosas, radiadas horizontalmente en torno de la areola, entrelazadas con las de las areolas vecinas, ocultando en parte el tallo, espina central 1, de cerca de 1.5 cm de longitud, gruesa, de 1 mm de diámetro, con la superficie escabrosa provista de diminutos tricomas, blanquecina, erecta, pero torcida y curva, cubriendo el ápice, flores y frutos no vistos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

A pesar de que estas cactáceas no crecen demasiado producen flores grandes, bonitas y muy vistosas de diferentes colores dependiendo de la variedad (4).

Fisiología y Morfología de las Raíces en Cactáceas

Las raíces son muy importantes para todas las plantas ya que a través de ellas se obtiene el agua y los nutrientes necesarios para que las plantas se puedan fijar al suelo.

Existen varios tipos de raíces, las raíces principales que se originan en el tallo tienden a ser largas, exploran gran volumen de suelo para obtener agua y nutrientes. Las raíces laterales delgadas se originan en las raíces principales e incrementan mucho el área de contacto entre el sistema radial y las partículas del suelo y esto facilita la toma de agua de nutrientes del suelo (Nobel, 1998, Rodríguez y Apezteguia, 1980).

Algunas ocasiones debajo del tallo hay una raíz pivotante y no solo pueden anclar a la planta sino también almacenar grandes cantidades de agua y carbohidratos. Existen algunas especies que crecen con raíces trepadoras y rastreras (raíces adventicias) cuyas funciones son las mismas cuando sus puntas entran en contacto con la tierra. Otras especies grandes como la *Carnegiea*, tiene una raíz en forma absoluta de estaca, esta penetra profundamente en la tierra y tiene raíces laterales fuertes y ramificadas. Las raíces en forma de fascículos se hallan, sobre todo en géneros como *Aylostera*, *Notocactus* y *Rebutia*, que pueden encontrarse en lugares con césped y tierras relativamente húmedas. En lugares secos, algunos géneros como *Ferocactus* y *Melocactus* desarrollan un sistema radial muy extenso, cuyos mechones y ramificaciones se deslizan a pocos centímetros de la superficie, para poder captar enseguida la escasa lluvia o el rocío.

Las lluvias ligeras que caracterizan a las zonas áridas y semiáridas, por lo general no humedecen al suelo a gran profundidad, así que las raíces someras están idealmente situadas para responder a las lluvias ligeras (Nobel, 1998, Rodríguez y Apezteguia, 1980).

Dubrovsky (1997) señala que el crecimiento indeterminado de las raíces es característicos de la mayoría de las plantas, debido a este tipo de crecimiento se mantiene la actividad prolifera de los meristemos apicales. Sin embargo, algunas cactáceas como *Ferocatus peninsulae*, *Stenocereus gummosus*, poseen crecimiento determinado de su raíz primaria, caracterizado por un corto periodo de actividad prolifera en el meristemo. Al cesar la actividad meristemática en el meristemo apical de la raíz primaria se da la inducción de la formación de raíces laterales.

Dubrovsky (1999) al estudiar el desarrollo de adaptaciones de las raíces en el desierto, encontró en muchas cactáceas que el primer sistema radial es relativamente pequeño (caracterizado por crecimiento determinado y raíces laterales) pero suficiente para un rápido establecimiento, toma de agua y sobrevivencia de la planta y no requiere de una gran cantidad de carbono y agua para su construcción y desarrollo.

Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en un medio que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo. Esta técnica se basa en la "totipotencialidad celular" que parte de la premisa: "toda célula viviente de un organismo multicelular es capaz de desarrollarse si se le dan las condiciones externas apropiadas. La célula tiene la habilidad de desarrollarse, regenerando un organismo entero". La nueva planta será genéticamente idéntica a la planta madre, el desarrollo de ésta se dá en un período corto (Pérez et. al., 1999).

Micropropagación

Es una técnica de propagación vegetativa basada en la capacidad de multiplicación que poseen las células vegetales cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuadas y son estimuladas con determinados reguladores de crecimiento. Es una técnica, que debe realizarse en instalaciones específicas, donde se mantienen condiciones asépticas en todas las manipulaciones para evitar las contaminaciones por hongos y bacterias, que se desarrolla fuera del ambiente natural, en cámaras de ambiente controlado en las que se mantienen a niveles óptimos para el crecimiento, en la que no participan los órganos reproductores de la planta, sino que se realiza por medio de una estimulación de la inducción de yemas, que dan lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, forman las nuevas plantas (Otero y Dolam , 1998).

Pierik (1990), menciona que con la micropropagación se pueden producir y transportar plantas libres de enfermedades, tiende a ser mucho más rápida en comparación con otros métodos de multiplicación vegetativa y permite la propagación vegetativa donde es difícil o imposible por técnicas convencionales.

Actualmente existen muchas técnicas para la modificación genética de plantas *in vitro*. Estas técnicas también dependen de la micropropagación tanto para la regeneración como para la multiplicación de nuevas características (George, 1996).

Torres (1996), menciona que el proceso de la micropropagación esta constituido por 5 etapas:

FASE 0: Preparación de la planta madre

FASE I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

FASE II: Multiplicación de brotes

FASE III: Enraizamiento

FASE IV: Aclimatización

Fase 0: Preparación de la Planta Madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado.

Para obtener estos explantos es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses, en un invernadero, en el que se va a cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición, del fotoperíodo y de la irradiación recibida.

Fase I: Establecimiento del Cultivo en Condiciones de Asepsia

Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantos. Antes de extraer los explantos se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

Ya en condiciones de asepsia (se trabajará en cabinas de flujo laminar) se extraerán los explantos del material vegetal y se pondrán en cultivo en un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantos.

Fase II: Multiplicación de los Brotes

Durante esta fase se espera que los explantos que sobrevivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar.

Fase III: Elección de un Medio de Enraizamiento de los Explantos

Para enraizar los explantos se utilizan principalmente dos métodos:

◆ **Enraizamiento *in vitro***

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser mas flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis.

◆ **Enraizamiento *ex vitro***

Los explantos se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita.

Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse. Los explantos deben de plantarse en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en el laboratorio, o ponerlos en 'multipots' dentro de un invernadero en un área sombreada con "fog-system" o "mist-system".

Fase IV: Aclimatización de los Explantos Enraizados

Los explantos recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación.

Tanto si los explantos fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantos de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explanto. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantos deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (5).

Enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento *in vitro* aprovecha los brotes diferenciados de la etapa anterior, colocándolos en un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas, vitaminas y reguladores de crecimiento de modo que dichos brotes emitan raíces, en esta etapa se debe lograr también el desarrollo de estomas funcionales y del aparato fotosintético, además de lograr su pre-acondicionamiento para incrementar su resistencia a la deshidratación (Hudson, 1992).

En el enraizamiento *in vitro*, en general se ha observado que la iniciación de raíz y la posibilidad de enraizamiento pueden aumentar de manera significativa al disminuir los niveles de sales minerales en el medio nutritivo, esto se debe a que los requerimientos de nitrógeno de la plántula disminuyen. A su vez se debe incrementar la concentración de sacarosa del 2 al 5 %, pues su presencia es esencial para el enraizamiento *in vitro* de muchas especies y su posterior aclimatización en invernadero (Pierik et al., 1988).

Las condiciones ambientales del cultivo tienen mucho que ver en el enraizamiento *in vitro* de los brotes; Pierik (1990), observó que en las plantas enraizadas *in vitro*, la zona de transición entre la raíz y el tallo era anormal, con unas conexiones vasculares débiles y malformadas, lo que producía problemas en la absorción y circulación de agua desde las raíces al tallo. Esta disfunción se corrige, al menos parcialmente, tras una adecuada aclimatización. En otras ocasiones el problema estriba en que las raíces que crecen en agar son defectuosas por la falta de aireación, carecen de pelos radicales y se necrosan

al transplantar las plántulas, lo que provoca una parada en el crecimiento de la planta (Pierik, 1990).

Las raíces formadas *in vitro* son gruesas y con pelos radicales engrosados y anormales, con sistemas vasculares anómalos, en comparación con raíces formadas en un sustrato arenoso. En las raíces que no mueren durante el proceso de trasplante se producen nuevas raíces laterales y adventicias normales durante el proceso de aclimatación y crecen activamente, por ello la razón raíz: tallo siempre es más alta en plantas enraizadas *ex vitro* que *in vitro*. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración. Es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible, cuando pasan a las condiciones *in vivo*, esto se logra usando humedad relativa alta del 100-95 % durante el período de aclimatización, la cual se va reduciendo gradualmente hasta alcanzar el nivel normal (50 –60%) en invernadero o campo (Pierik, 1990).

El enraizamiento puede ser *in vivo* o *in vitro*, la ventaja del primero radica en que a la vez que se está llevando a cabo el enraizamiento, los brotes se adaptan a las condiciones ambientales en las cuales crecen y se desarrollan las plantas; sin embargo con este método existe una probabilidad muy alta de que el número de plantas sobrevivientes sea bajo, ya que estas aún no desarrollan raíces para realizar sus funciones de absorción y transporte nutrimental (Pierik, 1990).

Efecto de los Reguladores de Crecimiento (fitorreguladores)

Weaver (1996), menciona que los fitorreguladores son todos los compuestos orgánicos (no considerados nutrientes) que en pequeñas cantidades son capaces de fomentar, inhibir o modificar cualquier proceso fisiológico de la planta. El término fitorregulador puede incluir un rango amplio de compuestos, puede aplicarse en los dos casos tanto para los compuestos naturales producidos dentro de la planta, como para los compuestos sintetizados artificialmente, el término hormona vegetal o fitohormona únicamente se limita al primer caso.

Los efectos de los fitorreguladores no son absolutamente específicos, su respuesta hacia los cultivos *in vitro* depende del tipo de explante y del genotipo de la planta. El desarrollo y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción entre el balance de fitorreguladores adicionados al medio y las fitohormonas producidas internamente (George, 1996)

Algunos de los reguladores de plantas mas utilizadas en los medios de cultivo son las auxinas y citocininas.

Las auxinas sintéticas mas usadas son: el ácido naftalenacético (NAA) utilizadas en concentraciones de 0.1 a 5 mg^l⁻¹, el ácido indolbutírico (IBA) de 0.1 a 5 mg^l⁻¹, los ácidos 4-clorofenoxiacético (CPA) y 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) de 0.05 a 0.5 mg^l⁻¹ y el ácido indolacético (IAA) de 1 a 50 mg^l⁻¹. Las auxinas participan ampliamente en un sinnúmero de procesos, sin embargo los principales son el alargamiento y la división de las células, la formación de brotes, raíces y tejidos callosos (Hurtado, 2000)

En forma natural, las concentraciones mas altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento, sin embargo también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por la planta, sin duda provenientes de las regiones meristematicas. La auxina natural mas común es el acido indolacetico (AIA) pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos como son el acido 4-cloroindol-3-acético y el Acido indol-3-acrílico (Pérez, et. al., 1999)

Aclimatización

Una de las etapas que reviste gran importancia dentro de la técnica de propagación *in vitro* es el transplante de plántulas al suelo, así como la adaptación de estas al medio ambiente, esta etapa es llamada aclimatización, la cual consiste en colocar los cultivos durante una o dos semanas bajo un ambiente donde se controla la intensidad lumínica, la temperatura y el fotoperiodo de acuerdo a las necesidades de cada cultivo para tener una mayor sobrevivencia de las plantas.

Durante este proceso la humedad relativa, densidad de flujo de fotones fotosintéticos y la temperatura son factores ambientales que más afectan la supervivencia y la fotosíntesis neta de las plantas, al respecto Kirdmanee, et. al., (1994) y Preece y Sutter (1991), consideran que la desecación de las plantas, debida a la pérdida de agua foliar y restringida toma de agua por las raíces es la principal causa de muerte de plantas en condiciones *ex vitro*.

Para aumentar la tasa de crecimiento o evitar el daño o muerte de las vitroplantas después de la aclimatización, se debe controlar el ambiente en la última etapa de aclimatización para simular las condiciones ambientales bajo las que se cultivaran las plantas en el campo, además el crecimiento y la fotosíntesis se deben promover durante la aclimatización con una pérdida mínima de plantas (Kozai, 1991; Kozai, et. al., 1991).

En la micropropagación convencional, frecuentemente el proceso de aclimatización consiste en 1) colocar las plantas en condiciones de alta humedad relativa y 2) la disminución de humedad relativa y el incremento gradual de la intensidad de luz a través del tiempo (Donnelly, et. al., 1985, Preece y Sutter, 1991).

Se realizó un proyecto para la propagación *in vitro* de cactáceas en peligro de extinción, donde se incluyó el género *Turbinicarpus* del cual se tuvo el 100% de plantas enraizadas a los 25 días y el 95% de éxito en aclimatización utilizando como sustrato el peat moss (6).

Importancia de las Raíces en el Proceso de Aclimatización.

Las raíces pueden ser inducidas bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro* por las auxinas, pero las producidas *ex vitro* están mejor adaptadas para sobrevivir la etapa de aclimatización. Las que se forman en los medios con agar son, por lo general, adventicias y con conexiones vasculares pobremente desarrolladas, por ello su contribución inmediata a la supervivencia de las plantas es

inconclusa y depende de la técnica usada y de la especie (Preece y Sutter, 1991).

La carencia de tejido funcional, con pobre conexión entre tallo y sistema radical frecuentemente restringe la toma de agua (Grout y Aston, 1977). Las raíces *in vitro* contienen numerosos granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertrofiados, con una longitud muy grande y tejido vascular primario, mientras que las raíces *ex vitro* presentan células mas uniformes y compactos, con tejidos vasculares primarios y secundarios (McClelland, et. al., 1990).

Factores que Influyen en el Proceso de Aclimatización

Luz

El control de la intensidad lumínica es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con baja intensidad y son transferidas a uno con alta intensidad (Van Huylenbroeck, et. al., 1995), y puede causar quemaduras severas del follaje, fotoinhibición y fotodegradación de las clorofilas (Van Huylenbroeck, 1994).

Para disminuir el efecto de la luz se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombra durante las primeras semanas, estas gradualmente se retiran hasta que las plantas son expuestas al mayor

porcentaje de luz posible, lo cual incrementa su adaptación a condiciones de campo (Agramante, et. al., 1998).

González, et. al. (1999) evaluando el manejo de la luz en cultivos de caña se azúcar y piña durante la aclimatización encontraron que las plantas son muy dependientes de la intensidad lumínica en las cuales son colocadas. La caña presentó un crecimiento y desarrollo continuo y con altos porcentajes de supervivencia (superior al 95 %), cuando fue cultivada en condiciones de gradientes inversos de humedad relativa y de intensidades de luz decreciente y creciente respectivamente.

Humedad relativa

Las plantas provenientes del cultivo *in vitro* no son capaces de regular su economía hídrica, por los desordenes ya antes mencionados, estas deben ser mantenida en condiciones de alta humedad relativa en el periodo inicial de aclimatización (Van Huylenbroeck y De Rieck, 1995). En etapas posteriores la humedad relativa tiende a disminuir gradualmente hasta alcanzar los niveles del ambiente externo (González, et. al., 1999).

Santana, et. al. (1996) alcanzaron altos porcentajes de supervivencia (superiores al 95 %) en vitroplantas de cafeto que provenían de embriones somáticos con solo manejar la cubierta de los umbráculos que le proporcionaban altos niveles de humedad en condiciones de vivero, mientras que en condiciones de invernadero sin cubierta alcanzaron un 16 %.

Soluciones Nutritivas

Una solución nutritiva se define como una mezcla de sales en solución acuosa que contiene todos los elementos esenciales en concentraciones adecuadas, además puede ser modificada de acuerdo a los requerimientos específicos de cada planta (7).

Los elementos esenciales para la planta son 16, al principio del ciclo solo se aceptaban 10 y estos son: Carbono, Hidrogeno, Oxigeno, Fósforo, Potasio, Nitrógeno, Azufre, Calcio, Fierro y Magnesio; a estos se les llama elementos mayores (macroelementos) a excepción del Fierro y los elementos menores (microelementos) son: Boro, Cobre, Manganeso, Molibdeno, Zinc y cloro (California Fertilizar Association, 1995).

Un elemento esencial es cuando: 1) la ausencia del elemento origina daño o desarrollo anormal, impide que complete su ciclo vital o causa la muerte de la planta, 2) ningún otro elemento puede sustituirle, 3) al realizar pruebas con el elemento en gran número de especies de plantas, se comprueba que en todas son indispensables (7).

Existen otros factores importantes con respecto a las soluciones nutritivas. La temperatura de la solución debe estar dentro del rango correcto. Si la solución es muy fría, la tasa metabólica de la raíz baja y la absorción de nutrientes también. Esto tiene un efecto de retardo en el crecimiento de la planta por debajo de lo deseado. También existen problemas cuando la temperatura es muy alta y esto afecta la absorción mineral. El mejor rango de temperatura está entre 18 y 25 °C para la mayoría de cultivos (8).

La temperatura es importante porque determina la cantidad de oxígeno que puede estar disuelto dentro de la solución. El agua en solución nutritiva fría puede disolver más oxígeno que el agua en solución caliente, ya que la cantidad total de oxígeno disuelto puede estar limitado y en el mejor de los casos, es importante mantenerlo en un punto alto. Las raíces como cualquier órgano vivo necesita oxígeno para trabajar apropiadamente. Es posible "ahogar" las raíces si no hay suficiente oxígeno disuelto en la solución. Otra razón por la cual la solución debe estar bien oxigenada es por los patógenos (organismos que causan enfermedades) (8).

El pH y la conductividad eléctrica (CE) de una solución nutritiva deben ser revisados. El pH es la forma de medir el grado de acidéz de una solución nutritiva. Hidropónicamente, la planta se comporta mejor si la solución es ligeramente ácida; esto significa un pH entre 5,5 y 6,5. Fuera de este rango algunos minerales, aunque estén presentes en la solución, no estarán disponibles para ser absorbidos por las raíces. Esto por supuesto afectará a la planta. Si el pH de la solución está lejos del rango recomendado, entonces algunos de los minerales de la solución nunca estarán disponibles para la planta. La CE de una solución nutritiva es una medida de fuerza de la solución. El nivel de CE recomendado es de $1,8 \text{ mScm}^{-1}$ (8).

El agua dura presenta problemas cuando se le utiliza para preparar soluciones nutritivas; para empezar, los niveles de calcio y magnesio son muy elevados para la planta. Si se utiliza una concentración normal de nutrientes con agua dura, los niveles de calcio y magnesio serán tan altos que el nutriente estará desbalanceado. Otro problema

adicional con el bicarbonato es que es alcalino (lo opuesto a la acidéz) y cuando se encuentra en la solución nutritiva, el pH se incrementará por encima del rango recomendado. La respuesta usual es bajar el pH agregando más agua (no-dura), aunque con el agua dura para bajar el pH se necesitaría una cantidad excesiva de agua y podría causar problemas de toxicidad (8).

Importancia del Calcio y el Fósforo En Las Plantas

Calcio

El calcio juega un importante papel en la vida de las plantas, desde la germinación hasta la madurez; interviene en el crecimiento de las raíces y en la absorción de los demás elementos nutritivos, participa en la actividad de muchas enzimas, actúa en el transporte de los carbohidratos y proteínas, neutraliza los ácidos que se forman en el metabolismo vegetal y proporciona una mayor consistencia a los tejidos. Es poco dentro de la planta, por lo cual la escasez de este elemento se detecta en que las partes más jóvenes retardan su desarrollo. La parte más afectada, es quizás el sistema radical, con lo cual se altera la absorción de los elementos nutritivos por las raíces, se absorbe bajo la forma Ca^{2+} (Fuentes, 1999)

La deficiencia de calcio detiene el crecimiento de las raíces y origina clorosis, sobre todo en las hojas jóvenes. Las personas y animales que

consumen plantas deficitarias en calcio como base de su alimentación tienen deficiencias en el esqueleto y en la dentadura (Fuentes, 1999).

Fósforo

El fósforo forma parte de todos los tejidos de la planta, en una proporción cuyo valor medio puede situarse entre el 0.5 y el 1% de la materia seca (expresada esa proporción en P_2O_5) (Fuentes, 1999).

Es un elemento catalítico, puesto que es un constituyente de muchas coenzimas. Participa ampliamente en la construcción de los compuestos encargados del transporte y almacenamiento de la energía precisa para realizar procesos vitales. Al igual que el nitrógeno es un elemento que interviene prácticamente en todos los procesos importantes del metabolismo (Fuentes, 1999).

Las plantas absorben la mayor parte del fósforo bajo la forma de $PO_4H_2^-$, y en menor proporción bajo la forma PO_4H^{2-} , en pequeñas cantidades también se puede absorber en forma de fosfatos orgánicos solubles (Fuentes, 1999).

Dado que el fósforo interviene en los procesos de crecimiento y síntesis de los componentes de las plantas, su deficiencia ocasiona un desarrollo débil, tanto del sistema radical como de la parte aérea. Las hojas son de menor tamaño que en circunstancias normales, con los nervios pocos pronunciados y coloración anormal: tonalidad azul verdosa oscura con tintes bronceados o púrpuras. Las hojas más viejas son las que presentan mayores síntomas de deficiencia, debido a que este elemento se mueve con rapidéz dentro de la

planta y emigra desde las hojas más viejas a las más jóvenes, la madurez del fruto se retrasa y disminuye el rendimiento de la cosecha (Fuentes, 1999).

Las alteraciones por exceso no suelen darse en la práctica únicamente en caso de aportaciones masivas y reiteradas de fertilizantes fosforitos se pueden presentar deficiencias de hierro, por insolubilidad de este último elemento en el suelo (Fuentes, 1999).

Sustratos

El término sustrato se aplica a todo material sólido distinto del suelo *in situ*, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radical, desempeñado por tanto un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta (9).

Tipos de Sustratos

Arena: consiste en pequeños granos de roca, de 0.05 a 2.0 mm de diámetro, formados como resultado de la interperización de diversas rocas, dependiendo su composición mineral de aquella de la roca madre. La arena de cuarzo, que esta formada en su mayor parte por un complejo de sílice, es la que en general se usa para fines de propagación. La arena es el más pesado de los materiales que se utilizan como medio de crecimiento de las raíces,

pesando alrededor de 1290 kgm^{-3} . De preferencia debe ser fumigada o tratada con calor antes de usarla. La arena prácticamente no contiene nutrientes minerales ni capacidad de amortiguamiento químico. (Hartman y Kester, 1998).

Perlita: es un mineral silíceo de color blanco grisáceo, es de origen volcánico y se extrae de escurrimientos de lava. El mineral crudo se tritura, criba y se calienta en hornos a $760 \text{ }^\circ\text{C}$, a cuya temperatura la pequeña cantidad de humedad que existe en las partículas se convierte en vapor, expandiendo las partículas a formar pequeños granos esponjosos que son muy livianos, pesando sólo de 80 a 130 kgm^{-3} . La alta temperatura de procesamiento proporciona un producto estéril. Absorbe de 3 a 4 veces su peso de agua. En esencia es neutra, con un pH de 6.0 a 8.0, pero sin capacidad de amortiguamiento químico. No tiene capacidad de intercambio catiónico y no contiene nutrientes minerales. Es muy útil para aumentar la aeración de las mezclas. En combinación con el musgo turboso, la perlita es un medio muy popular para enraizar (Hartman y Kester, 1998).

Turba o Peat moss: están formadas por restos de musgos y otras plantas superiores que se hallan en proceso de carbonización lenta. Conservan largo tiempo su estructura anatómica por que están fuera del contacto con el oxígeno y por el exceso de agua. Los residuos vegetales pueden depositarse en diferentes ecosistemas lo que daría lugar a la formación de dos tipos de turba: *Sphagnum* u *oligotróficas* y *herbáceas* o *eutróficas*. Según Hartman y Kester (1998), varía en color, de pardo claro o pardo oscuro. Tiene una alta capacidad para retener humedad (15 veces su peso seco), una acidéz elevada

(pH de 3.2 a 4.5) y contiene una pequeña cantidad de nitrógeno (1 %), pero poco o nada de fósforo o potasio. Las turbas *Sphagnum* son los componentes orgánicos más utilizados en la actualidad para medios de cultivos que crecen en macetas, debido a sus excelentes propiedades físico-químicas, sin embargo y a pesar de que durante casi 30 años las turbas han sido los materiales más utilizados como sustratos, en los últimos tiempos han sido sustituidos por los inorgánicos debido a alteraciones microbiológicas e interacciones con la disolución nutritiva, rápida descomposición, aireación reducida, etc., además las reservas de turba son limitadas y no renovables, por lo que su uso indiscriminado puede originar un impacto medioambiental de importancia (Vázquez, 2004).

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se desarrolló en dos fases, la primera en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento y la segunda en el Invernadero ubicado al lado del Departamento de Ciencias del Suelo, ambos situados en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Enraizamiento *in vitro*

De las plántulas obtenidas en la etapa de micropropagación se seleccionaron vitroplantas de 2 cm de altura y 1 cm de grosor, de color verde intenso y tejido firme, para después ser trasvasadas al medio nutritivo de Murashige y Skoog adicionado con 0.08 g l⁻¹ de sulfato de adenina, 0.0004 g l⁻¹ de niacina, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 9 g l⁻¹ de agar, con un pH de 5.5, para inducir al enraizamiento.

Composición del medio nutritivo de Murashige y Skoog

En el Cuadro 1 se describe la composición basal del medio nutritivo de Murashige y Skoog 1962 (MS).

Cuadro 1. Composición basal del medio nutritivo de Murashige y Skoog 1962.

COMPUESTOS	mg/l	g/l ⁻¹	Para 10 litro (g)
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	1650.00	1.65	16.5
KNO ₃	1900.00	1.9	19g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440.00	0.44	4.4
KH ₂ PO ₄	170.00	0.17	1.7
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370.00	0.37	3.7
Micronutrientes			
KI	0.83	0.00083	0.0083
H ₃ BO ₃	6.20	0.0062	0.062
MnSO ₄ . 4H ₂ O	12.00	0.02	0.12
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60	0.0086	0.086
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.250	0.00025	0.025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.000025	0.00025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.000025	0.00025
Sol. de Fierro			
Na ₂ EDTA	37.30	0.0373	0.373
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.80	0.0278	0.278
Vitaminas			
Inositol	100.00	0.1	1
Ac- nicotínico	0.50	0.0005	0.005
Piridoxina-HCl	0.50	0.0005	0.005
Tiamina-HCl	0.10	0.0001	0.001
Sulfato de Adenina	80.00	.08	.8
Niacina	0.40	0.0004	.004
Carbohidratos			
Sacarosa		30	
Solidificante.			
Agar		9	
PH		5.5	

Trasvase del explante

El trasvase se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, para evitar la contaminación, primeramente se desinfectó la campana con QRY , en la campana limpia se colocaron los instrumentos necesarios para la siembra: el bisturí y pinzas dentro de un frasco de alcohol, cajas petri previamente esterilizadas, mecheros de alcohol, material vegetal y frascos con medio nutritivo; con la ayuda de las pinzas y el bisturí se tomaron las plántulas y se colocaron en una caja petri donde se les eliminó la base, cuidando de no lastimar a la plántula y se colocaron de 3 a 4 plántulas por frasco con medio para enraizamiento, el número de frascos para esta etapa fue de 60.

Aclimatización en el invernadero (*ex vitro*)

Una vez obtenidas las vitroplantas en el laboratorio se procedió a la aclimatización, el número de planta fue de 120, de ellas 60 con raíz y 60 sin raíz.

Se llevaron las vitroplantas al invernadero, se sacaron de los frascos y se eliminó el medio adherido a las raíces con agua corriente. Se sumergieron en una solución que contenía bactericida y fungicida por 3 minutos para prevenir enfermedades y finalmente se colocaron en una solución de raizal por 2 minutos.

Se preparó el sustrato con peat moss (turba), perlita y arena de arroyo en proporción 4:4:1 y se esterilizó durante 2 horas a 120 °C en la autoclave y se colocó en macetas de 2 pulgadas de diámetro.

Las vitroplantas se sembraron en las macetas formando un hueco en el centro del sustrato donde la planta fue sembrada. Las macetas fueron acomodadas en charolas de plástico de 40 x 60 cm, que se colocaron en el interior de una bolsa de polietileno transparente para mantener los niveles de humedad arriba del 90%. Cada tres días se hicieron en promedio 10 perforaciones durante 25 días, al termino de los cuales se abrieron completamente las bolsas. Lo anterior permitió bajar gradualmente la humedad hasta igualarla con la humedad ambiental (cuadro 2).

Cuadro 2. Humedad relativa en el proceso de aclimatización de *T. valdezianus*. Diciembre de 2004.

Lecturas realizadas												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H.R. (%)	98	96	90	88	85	80	75	70	68	65	60	55

Para regar las plántulas se manejaron tres soluciones nutritivas, dos recomendadas por Sonneveld (1994) y la tercera correspondió al medio de Murashige y Skoog (MS al 50%), que se consideró como testigo. Las soluciones se cambiaron cada semana, cada uno de los tratamientos constó de 5 repeticiones y cada repetición de 4 plantas, dando un total de 20 vitroplantas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para la aclimatización en invernadero de vitroplantas de *Turbinicarpus valdezianus*. Noviembre de 2004.

Soluciones Nutritivas	Con Raíz/Sin Raíz
T1 A	Con
	Sin
T2 B	Con
	Sin
T3 C	Con

	Sin
--	-----

Preparación de las soluciones nutritivas

Se prepararon 3 soluciones nutritivas dos recomendadas por Sonneveld (1994) que son soluciones ideales para *Anthurium* y para *Dianthus*, y el medio nutritivo MS al 50% (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Soluciones ideales para *Anthurium* (A) y *Dianthus* (D)

	meq l ⁻¹							mg l ⁻¹					
	NH ₄	K	Ca	Mg	NO ₃	SO ₄	H ₂ PO ₄	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo
A	0.8	3	2	1.4	4.5	2	0.7	0.84	0.2	0.22	0.22	0.03	0.05
D	0.75	4	3.3	1.2	7.0	1.4	0.8	1.1	0.28	0.20	0.22	0.04	0.05

Cuadro 5. Solución de MS al 50%

mg l ⁻¹						
NH ₄ NO ₃	H ₃ BO ₃	CaCl ₂	CoCl ₂	CuSO ₄	FeSO ₄	MgSO ₄
1650	6.3	440	0.025	0.025	27.8	370
mg l ⁻¹						
MnSO ₄	KI	KNO ₃	KPO ₄	Na ₂ EDTA	Na ₂ MoO ₄	Zn SO ₄
16.9	0.83	1900	170	37.3	0.25	8.6

Primero se realizaron los cálculos para poder determinar y preparar las soluciones nutritivas (Cuadros 6-11).

Cuadro 6. Combinación de elementos para la solución nutritiva recomendada para *Anthurium*. Noviembre de 2004.

meq l ⁻¹	NO ₃	H ₂ PO ₄	SO ₄	Total
NH ₄	0.8			0.8

K	0.7	0.7	1.6	3
Ca	3			3
Mg			0.4	0.4
H				
Total	4.5	0.7	2	7.2

Cuadro 7. Cantidades necesarias para la preparación de macronutrientes de solución nutritiva recomendada para *Anthurium*. Noviembre de 2004.

	meq l ⁻¹	Pe en g	Factor g l ⁻¹	Para 10 litros (g)
NH₄NO₃	0.8	80	0.08 x 0.8 = 0.064	0.64
KNO₃	0.7	101	0.101 x 0.7 = 0.0707	0.707
Ca(NO₃)₂	3	164	0.164 x 3 = 0.492	4.92
KH₂PO₄	0.7	135	0.135 x 0.7 = 0.0945	.945
K₂SO₄	1.6	174	0.174 x 1.6 = 0.278	2.78
MgSO₄	0.4	120	0.120 x 0.4 = 0.048	0.48

Cuadro 8. Cantidades necesarias para la preparación de micronutrientes de solución nutritiva recomendada para *Anthurium*. Noviembre de 2004.

	meq l ⁻¹	g l ⁻¹	g 10 l ⁻¹
Fe	0.84	0.0084	0.084
Mn	0.2	0.002	0.02
Zn	0.22	0.0022	0.022
B	0.22	0.0022	0.022
Cu	0.03	0.0003	0.003
Mo	0.05	0.0005	0.005

Cuadro 9. Combinación de elementos para la solución nutritiva recomendada para *Dianthus*. Noviembre de 2004.

meq l ⁻¹	NO ₃	H ₂ PO ₄	SO ₄	Total
NH₄	0.5		0.2	0.7
K	3.2	0.8		4
Ca	3.3			3.3
Mg			1.2	1.2
H				
Total	7	0.8	1.4	9.2

Cuadro 10. Cantidades necesarias para la preparación de macronutrientes de solución nutritiva recomendada para *Dianthus*. Noviembre de 2004.

	meq l ⁻¹	Pe en g	Factor g l ⁻¹	g 10 l ⁻¹
NH₄NO₃	0.5	80	0.08 x 0.5 = 0.04	0.4
KNO₃	3.2	101	0.101 x 3.2 = 0.323	3.23
Ca(NO₃)₂	3.3	164	0.164 x 3.3 = 0.541	5.41
KH₂PO₄	0.8	135	0.135 x 0.8 = 0.108	1.08
(NH₄)₂SO₄	0.2	132	0.132 x 0.2 = 0.026	0.26
MgSO₄	1.2	120	0.120 x 1.2 = 0.144	1.44

Cuadro 11. Cantidades necesarias para la preparación de micronutrientes de solución nutritiva recomendada para *Dianthus*. Noviembre de 2004.

	meq l ⁻¹	g l ⁻¹	g 10 l ⁻¹
Fe	1.1	0.0011	0.011
Mn	0.28	0.0028	0.028
Zn	0.20	0.0020	0.020
B	0.22	0.0022	0.022
Cu	0.04	0.0004	0.003
Mo	0.05	0.0005	0.005

Procedimiento

Para la obtención de las soluciones nutritivas de *Anthurium* y *Dianthus* se elaboraron soluciones madre estériles de la siguiente manera:

- 1) Pesarse cada uno de los reactivos marcados en los cuadros 7, 8, 10 y 11.

- 2) Colocar en tres frascos, uno de macronutrientes sin el calcio, otro exclusivamente para el calcio para evitar precipitados y en el último los micronutrientes.
- 3) Disolver en agua destilada.
- 4) Tomar las cantidades necesarias para preparar un litro de medio.
- 5) Ajustar el pH a 5.7 - 5.8 para cada solución, con 1.0 N de NaOH y 1.0 N de HCl.

MS al 50%

La preparación de la solución de MS al 50% fue similar a la descrita anteriormente, solo que el medio se diluyó al 50% de su concentración original sin adicionarle agar ni azúcar.

Se evaluaron altura, diámetro y porcentaje de sobrevivencia de las plantas. El porcentaje de sobrevivencia del material vegetal consistió en realizar el conteo de plantas vivas. La evaluación se realizó a los 35 y 45 días después del trasplante.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó un Diseño Completamente al Azar con Arreglo Factorial, donde el factor A correspondió a soluciones nutritivas, el factor B a plantas con y sin raíz, cada tratamiento constó de 5 repeticiones.

Sea el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \lambda_k + \alpha\lambda_{ik} + \beta\lambda_{jk} + \alpha\beta\lambda_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

$i = 1, 2, 3 \dots a$
 $j = 1, 2, 3 \dots b$
 $k = 1, 2, 3 \dots c$
 $l = 1, 2, 3 \dots r$

Donde:

- Y_{ijkl} : variable respuesta correspondiente al i – ésimo tratamiento y a la l – ésima repetición.
- μ : Media general (efecto general)
 - α_i : Efecto del i – ésimo tratamiento
 - β_j : Efecto del j – ésimo tratamiento
 - $\alpha\beta_{ij}$: Efecto del ij – ésimo tratamientos
 - λ_k : Efecto del k – ésimo tratamiento
 - $\alpha\lambda_{ik}$: Efecto del ik – ésimo tratamientos
 - $\beta\lambda_{jk}$: Efecto del jk – ésimo tratamientos
 - $\alpha\beta\lambda_{ijk}$: Efecto del ijk – ésimo tratamientos
 - ϵ_{ijkl} : Error aleatorio, error experimental, variación debida al azar o variación del muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el enraizamiento *in vitro* de *Turbinicarpus valdeziianus* se generaron plántulas con raíz, de las cuales se seleccionaron 60 para establecer la fase de aclimatización.

Aclimatización de *Turbinicarpus valdeziianus*

Una vez concluido el trabajo de aclimatización de las vitroplantas de *T. valdeziianus* se procedió al análisis de los datos colectados que se describen a continuación:

El análisis de varianza para altura de planta a los 35 días de aclimatización de *T. valdeziianus* en invernadero (Cuadro 12), mostró un Coeficiente de Variación del 14.40 %, lo que indica que los resultados obtenidos son válidos estadísticamente. El factor A (MS al 50% soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*) presentó significancia, el factor B (plantas con y sin raíz) no fue significativo. En la interacción A x B no hubo significancia alguna.

Cuadro 12. Análisis de varianza para altura de planta a los 35 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004.

FV	GL	SC	CM	F
FACTOR A	2	.294048	0.147024	5.8412 *
FACTOR B	1	.000023	.000023	.0009 NS
INTERACCION	2	.006203	.003101	.1232 NS
ERROR	24	.604084	.025170	
TOTAL	29	.904358		
C.V. = 14.40%			NS= 0.05 – 0.01	

*CV. Coeficiente de varianza.

*NS. Nivel de Significancia

El análisis de varianza para altura de planta a los 45 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero (Cuadro 13), mostró un Coeficiente de Variación del 14.56 %, lo que indica que los resultados obtenidos son válidos estadísticamente. El factor A (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*) presentó significancia, el factor B (plantas con y sin raíz) no fue significativo, así como también la interacción del factor A (MS al 50% soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*) y el factor B (plantas con y sin raíz) no tuvo significancia alguna.

Cuadro 13. Análisis de varianza para altura de planta a los 45 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004.

FV	GL	SC	CM	F
FACTOR A	2	.313946	.156973	5.9396 *
FACTOR B	1	.000401	.000401	.0152 NS

A X B	2	.000671	.000336	.0127 NS
ERROR	24	.634277	.026428	
TOTAL	29	.949295		
C.V. = 14.56 %			NS= 0.05 – 0.01	

La prueba de medias DMS (0.05) para altura de planta de *T. valdezianus* del factor A (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*) a los 35 y 45 días de aclimatización mostró diferencia significativa entre tratamientos, encontrando plantas mas altas (1.2 cm.) en el tratamiento (MS al 50%)¹, seguidas del tratamiento 2 (solución nutritiva para *Anthurium*) y por último el tratamiento 3 (solución nutritiva para *Dianthus*) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Prueba de medias (DMS 0.05) para altura de planta de *T. valdezianus* de solución nutritiva a los 35 y 45 días de aclimatización. Diciembre de 2004.

Altura de planta (cm) a los 35 días			Altura de planta (cm) a los 45 días		
T1	1.241	A	T1	1.261	A
T2	1.040	AB	T2	1.045	B
T3	1.023	B	T3	1.043	B
DMS= .2071			DMS= .2122		

La prueba de medias DMS (0.05) para altura de planta de *T. valdezianus* en la interacción A x B (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* y plantas con y sin raíz) a los 35 y 45 días de aclimatización, indicó que el mejor tratamiento fue MS al 50% en plantas sin raíz y con raíz, siendo los peores las soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Prueba de medias (DMS 0.05) para altura de planta de *T. valdezianus* en la interacción soluciones nutritivas y plantas con y sin raíz a los 35 días y 45 días de aclimatización. Diciembre 2004.

Altura de planta (cm) a los 35			Altura de planta (cm) a los 45 días		
T2	1.2560	A	T2	1.2680	A
T1	1.2260	AB	T1	1.2540	AB
T4	1.0460	BC	T4	1.0520	BC
T5	1.0420	BC	T5	1.0460	BC
T3	1.0340	BC	T6	1.0400	C
T6	1.0040	C	T3	1.0300	C
DMS= .2071			DMS= .2122		

El análisis de varianza para diámetro de planta a los 35 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero (Cuadro 16), mostró un Coeficiente de Variación del 13.043 %, lo que indica que los resultados obtenidos son válidos estadísticamente. El factor A (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*), presentó alta significancia, el factor B (plantas con y sin raíz) no fue significativa, mientras que en las interacciones A x B (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* y plantas con y sin raíz), no mostraron significancia.

Cuadro 16. Análisis de varianza para diámetro de planta a los 35 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004.

FV	GL	SC	CM	F
FACTOR A	2	.174797	.087399	8.8359 **
FACTOR B	1	.000145	.000145	.0147 NS
A X B	2	.056910	.028455	2.8768 NS
ERROR	24	.237391	.009891	

TOTAL	29	.469242		
C.V. = 13.04 %			NS= 0.05 – 0.01	

El análisis de varianza para diámetro de planta a los 45 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero (Cuadro 17), mostró un coeficiente de variación del 12.26 %, lo que indica que los resultados obtenidos son válidos estadísticamente. El factor A (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*), presentó alta significancia, el factor B (plantas con y sin raíz) así como las interacciones A x B (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* y plantas con y sin raíz), no mostraron significancia.

Cuadro 17. Análisis de varianza para diámetro de planta a los 45 días de aclimatización de *T. valdezianus* en invernadero. Diciembre de 2004.

FV	GL	SC	CM	F
FACTOR A	2	.199867	.099934	10.9128 **
FACTOR B	1	.002527	.002527	.2760 NS
A X B	2	.053455	.026728	2.9187 NS
ERROR	24	.219780	.009157	
TOTAL	29	.475630		
C.V. = 12.26 %			NS= 0.05 – 0.01	

La prueba de medias DMS (0.05) para diámetro de la planta de *T. valdezianus* del factor A (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*) a los 35 y 45 días de aclimatización, mostró diferencias significativas entre tratamientos, encontrando diámetros de hasta .86 cm. en el tratamiento 1 (MS al 50%), seguidas del tratamiento 3 (Solución nutritiva para *Anthurium*) y por ultimo el tratamiento 2 (Solución nutritiva para *Dianthus*) (Cuadro 18).

Cuadro 18. Prueba de medias (DMS 0.05) para diámetro de planta de *T. valdezianus* de solución nutritiva a los 35 y 45 días de aclimatización. Diciembre de 2004.

Diámetro de planta (cm) a los 35 días			Diámetro de planta (cm) a los 45 días		
T1	.8635	A	T1	.8925	A
T3	.7450	AB	T3	.747	B
T2	.6790	B	T2	.701	B
DMS= .1298			DMS= .1249		

La prueba de medias DMS (0.05) para diámetro de planta de *T. valdezianus* en la interacción A x B (MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* y diámetros plantas con y sin raíz) a los 35 y 45 días de aclimatización, indicó que los mejores tratamientos fueron: T2 y T1, MS al 50% en plantas sin raíz y con raíz, siendo que a los 35 días los peores tratamientos fueron T3, T5 y T6, (Solución nutritiva para *Anthurium* en plantas con raíz, solución nutritiva para *Dianthus* en plantas con raíz y solución nutritiva para *Dianthus* en plantas sin raíz), a los 45 días de aclimatización los tratamientos peores fueron los tratamiento 4 y 6, (Solución nutritiva para *Anthurium* en plantas sin raíz y solución nutritiva para *Dianthus* en plantas sin raíz), (Cuadro 19).

Cuadro 19. Prueba de medias (DMS 0.05) para diámetro de planta de *T. valdezianus* en la interacción entre soluciones nutritivas y plantas con y sin raíz a los 35 y 45 días de aclimatización. Diciembre de 2004.

Diámetro de planta (cm) a los 35 días			Diámetro de planta (cm) a los 45 días		
T2	.9230	A	T2	.9600	A
T1	.8040	AB	T1	.8250	B
T5	.7520	BC	T5	.7560	BC

T6	.7380	BC	T3	.7320	BC
T3	.7250	BC	T6	.7300	BC
T4	.6330	C	T4	.6700	C
DMS= .1298			DMS= .1249		

Sobrevivencia de las Plantas de *Turbinicarpus Valdezianus* a los 35 y 45

Días de Aclimatización en Invernadero

Se evaluó la sobrevivencia de las plantas de *T. valdezianus* a los 35 y 45 días después de la siembra en cada tratamiento (Cuadro 20). Para ambas lecturas se obtuvieron los siguientes resultados para solución de MS al 50%, se encontró una sobrevivencia del 75% en ambos casos, en plantas con y sin raíz, la solución nutritiva para *Anthurium* se obtuvo una sobrevivencia de 90% en plantas con raíz y un 80% en plantas sin raíz, en la solución nutritiva para *Dianthus* los porcentajes de sobrevivencia fueron mayores ya que alcanzo un 90% en plantas con raíz y un 85% en plantas sin raíz, así podemos decir que la sobrevivencia fue mayor en el tratamiento con solución para *Dianthus*.

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de plantas de *T. valdezianus* con raíz y sin raíz a los 35 y 45 días de aclimatización, MS al 50%, soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus*, en el se puede observar que la solución nutritiva para *Dianthus* fue la que presentó altos porcentajes de sobrevivencia en plantas con raíz y sin raíz y MS al 50% presentó baja sobrevivencia.

Cuadro 20. Porcentaje de sobrevivencia de aclimatización de plantas de *T. valdezianus* con y sin raíz a los 35 y 45 días. Diciembre de 2004.

Soluciones Nutritivas	35 días		45 días	
	% c/r	% s/r	% c/r	% s/r
MS 50 %	75	75	75	75
<i>Anthurium</i>	90	80	90	80
<i>Dianthus</i>	90	85	90	85

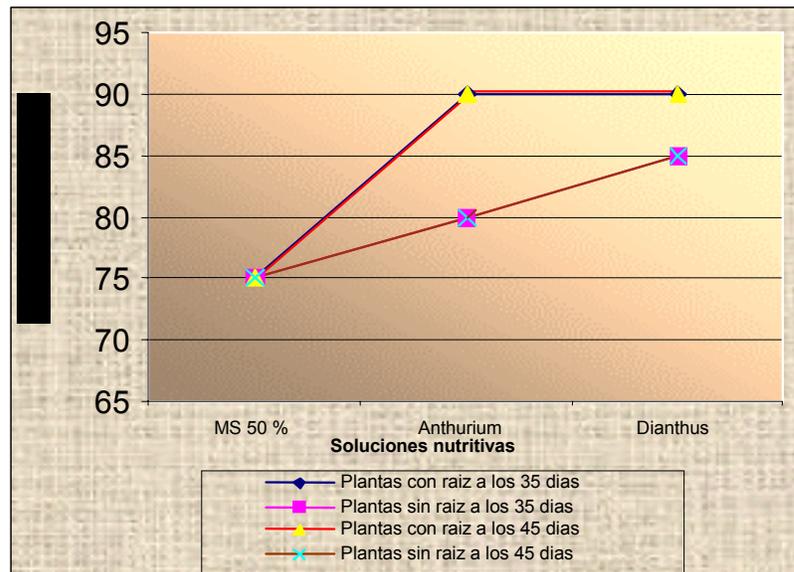


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de *Turbinicarpus valdezianus* con raíz y sin raíz a los 35 y 45 días de aclimatización de soluciones nutritivas para *Anthurium*, *Dianthus* y MS al 50%.

En este estudio se encontró que la altura de las plantas de *T. valdezianus* a los 35 y 45 días se vieron favorecidas con la presencia de plantas con raíz esto coincide con lo reportado con Soltero (1990) que menciona que la mayoría de las especies de cactus propagados producen raíces espontáneamente en medios de cultivos sin reguladores de crecimiento y el proceso de adaptación es relativamente fácil comparado con otro tipo de plantas.

La utilización de las soluciones nutritivas para *Anthurium* y *Dianthus* así como la presencia de las raíces permitieron un mayor aumento en grosor de las plantas de *T. valdezianus* durante el proceso de aclimatización a los 35 y 45 días, Imas (1999) menciona que el fertirriego permite adecuar la cantidad y concentración de los nutrientes de acuerdo a la demanda de nutrientes durante el ciclo de crecimiento del cultivo y que además el abastecimiento de nutrientes a los cultivos va de acuerdo a la etapa fisiológica, considerando que las características climáticas y del suelo, resulta en altos rendimientos y excelente calidad de los cultivos, por el contrario Pierik (1990) menciona que las raíces que crecen en agar son defectuosas por la falta de aireación, carecen de pelos radicales y se necrosan al transplantar lo que provoca una parada en el crecimiento de la planta.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron plantas de *Turbinicarpus valdezianus* enraizadas *in vitro* utilizando el medio nutritivo MS adicionado con sulfato de adenina y niacina, de las cuales se seleccionaron aquellas que tenían 2 cm de altura y 1 cm de grosor para establecer la fase de aclimatización.

Para altura de la planta de *Turbinicarpus valdezianus* a los 35 y 45 días, las plantas con raíz y regadas con el medio nutritivo MS al 50% constituyeron el mejor tratamiento, alcanzando una altura promedio de 1.2 cm.

En cuanto a diámetro de las plantas de *Turbinicarpus valdezianus* a los 35 y 45 días el mejor tratamiento correspondió a plantas con raíz regadas con el medio nutritivo de MS al 50% resultado un diámetro de 0.87 cm.

El más alto porcentaje de sobrevivencia fue de un 90% en *Turbinicarpus valdezianus* y se obtuvo utilizando plantas con raíz regadas con la solución nutritiva para *Dianthus*.

BIBLIOGRAFÍA

Agramante, D.; F. Jiménez; M. A. Dita. 1998. Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (ed). Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Geo. Pp. 193-201.

Bravo, H y H. Sánchez-Mejorada, 1991. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2° ed. Vol 3. Pp. 404.

California Fertilizer Association. Soil Improvement Committee. 1995. Manual de fertilizantes para horticultura. 1a. edición. Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores. Mexico. Pp. 297.

- Donnelly, D. J; W. E. Vidaver; K. Lee. 1985. The anatomy of tissue culture red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 4:43-50.
- Dubrovsky, J. G. 1997. Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; it's organizations, cellular basis and ecological significance. *Planta* 203: 85-92.
- Dubrovsky, J. G. 1999. Developmental adaptations of root in desert Cactaceae (p: 22). In Marco Antonio Vázquez Dávila (editor), *Cactáceas y otras Plantas Suculentas*. II Congreso Mexicano y I Congreso Latinoamericano y del Caribe. Memorias, Oaxaca, México, 1999.
- Elizondo, E. J. L.; J. Valdez y A. Rodríguez. 1990. Cactáceas vulnerables y en peligro de extinción para Coahuila. México. *BIOTAM* 2(2): 17-22.
- Enríquez. 1994. Micropropagación y aclimatización de cactáceas. Tesis de Licenciatura. Saltillo, Coahuila, México.
- Fuentes Yague José Luís. 1999. El suelo y los fertilizantes. 5ª. edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp. 352.
- George E. F. 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1 The Technology. 2nd Edition. British Library Edigton. England. Pp. 4-7.
- Gonzáles, J. L.; R. Rodríguez, y. Rodríguez.; E.Yanez.; M. Escalona. 1999. Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de

plántulas de piña y caña de azúcar. Libro de Reportes Cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Pp. 174-176.

Hartman, H y Kester D. E. 1988. Propagación de Plantas. Editorial Continental S.A. de C.V. 2° Edición. México. Pp. 760.

Hudson T. T H. 1992. Propagación de plantas, principios y prácticas. 3ª Edición. Editorial CECSA. México D.F. Pp 596-601.

Hurtado y Merino M. M. E. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México. D.F. Pp 49-57, 67-80.

Kirdmanee C.; C. Kitaya; T. Kozai. 1994. Rapid acclimatization on *in vitro* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity *ex vitro*. In: T. Kozai; Y. Kitaya; C. Kubota. (eds). Collected papers on environmental control in micropropagated. Editorial Gemhua Niu. 3: 957-958.

Kozai, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants. En: P. S. Bajaj (ed). Biotechnology in Agricultura and Forestry High Tech and Micropropagation I, Springer Verlag. Pp. 157-171.

Kozai, T.; K. Fujiwara; G. Giacomelly. 1991. Environmental control in micropropagation. Ann. Amer. Soc. Agr. Eng. Meeting. 9115111: Pp. 13.

- McClelland, M. T.; M. A. L. Smith; Z. B. Carothers. 1990. The effects of *in vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in the woody plants. *Plants. Plan Cell Tissue and Organ Culture*. 23: 115-123.
- Nobel, P.S. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Editorial Trillas, México, p. 95-114.
- Otero, M.L.; Dolam Po, D.M. (1998). Micropropagation of olive (*Olea eurpaea* L) cv. Arbequina from juvenile cuttings. *Phyton* 63 (1/2): 133-140.
- Pérez, M. E.; et. al.1999. Introducción al cultivo de tejidos Vegetales. Editorial Departamento de Procesos Gráficos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Mexico. Pp. 179.
- Pierik R. N. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp. 326.
- Pierik, R. L. M., J. L. Jansen, A. Maasdam y C. M. Binnendijk. 1988. Optimalization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. *Sci. Hort.* 3: 351-357.
- Preece, J. E. ; E. G. Sutter. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P.C.; R. H. Zimmermon (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academia Publishers. Pp. 71-93.
- Rodríguez, G. L. y R. R. Apezteguia. 1980. Cactus y otras Suculentas en Cuba. Editorial Científico – Tecnia, Habana, Cuba. Pp. 31.

- Santana, N.; S. Cortéz; J. V. Martín; S. Montes. 1996. Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de cafeto (*Coffea arabica* L.) variedad Catimor (9722). *Cultivos Tropicales* 17(2): 83-85.
- Sonneveld, C. y Straver, N. 1994. Soluciones nutritivas para los vegetales y flores en agua o sustratos. 10ª edición. Editorial Onder Glas Te Naaldwijk, 45 p.
- Torres B. C. 1996. El proceso de adaptación de plantas micropropagadas a condiciones de invernadero. Memoria. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo Coahuila, México; Pp. 17-20.
- Van Huylenbroeck, J. M. 1994. Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets. En: P.C. Struik (eds.). *Plant Production on the Threshold of a New Century*. Kluwer Academic Publishers. P.p. 451-453.
- Van Huylenbroeck, J. M.; J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "petite" plantlets. *Plant Science* 111: 19-25.
- Vázquez Pérez Rogelio. 2004. Producción de tomate bola (*Lycopersicon esculentum*, Mill) bajo diferentes sustratos hidropónicos. Tesis Licenciatura. Saltillo Coahuila, México.

Weaver J. R.1996. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura.
Editorial Trillas. México, D.F. Pp. 17-22.

PAGINAS WEB CONSULTADAS

1. Mayen P. 2002. Norma Oficial Mexicana.
www.espanol.geocities.com/pmayen
2. http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/act_permanentes/conciencia/biologica/acertijos_biologicos/acertijos01-02/res8.htm
3. http://www.viveropasohondo.cl/web/Pag%20taxonomia/clasificacion_taxonomica.htm
4. Faucon, 2005.

http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.desert-tropicals.com/Plants/Cactaceae/Turbincarpus_valdezalbi.html.

5. <http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm>

6. Instituto Tecnológico de Querétaro. 1982.

http://www.gro.itesm.mx/servicios_int/bioingenieria/introduccion.htm

7. Gutiérrez C. R. 1998. Estudio de las soluciones nutritivas en el desarrollo de variedades de frijol. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Perú.

(<http://www.monografias.com/trabajos15/cultivo-frijol/cultivo-frijol.shtml#REVISION>)

8. Soluciones Nutritivas. 2002.

www.oni.escuelas.edu.ar/2002/buenos_aires/hidroponia/variables_y_soluciones_nutritivas.htm

9. Tipos de Sustrato de Cultivo. 2004.

www.infoagro.com/industria_auxilir/tipo_sustratos3.asp