

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Morfogénesis *in vitro* de nueve especies de interés botánico y
ornamental pertenecientes a la familia Cactaceae.**

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía

Claudia Cristina Rodríguez Cárdenas
Valdivia-Chile
2006

PROFESOR PATROCINANTE:

Peter Seemann F.
Ing. Agr., Dr. rer. hort.

PROFESORES INFORMANTES:

Magaly Rivero G.
Prof. Biol y Quim., Dr. Cs

Laura Böhm S.
Ingeniero. Agrónomo.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa, solamente tengo palabras de agradecimiento hacia las personas que de una u otra forma hicieron posible que se cumpliera esta meta; especialmente, a mi profesor patrocinante, Sr. Peter Seemann, por su gran disposición y consejos tanto académicos como humanos.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral, quienes compartieron su experiencia y simpatía en forma desinteresada. En especial a Gloria e Inés, quienes me apoyaron en el trabajo experimental realizado.

De igual forma deseo agradecer a las profesoras Magaly Rivero y Laura Böhm, por los consejos, comentarios y aportes en esta tesis.

En forma especial, a mis amigos Carolina Giovannini, Carolina Fuenzalida, Rodrigo Mardones Carola Villalobos, Claudia Salas, Felipe Leiva, Cristián Vázquez y Luis Pérez, quienes me apoyaron en todo momento con gran cariño y paciencia, en esta última etapa de trabajo.

Por último, a mis padres Cristina y Juan, a mis hermanos Karol y Oscar, quienes son grandes responsables de lo que he podido obtener.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Características generales de la familia <i>Cactaceae</i>	3
2.1.1	Origen y distribución	3
2.1.2	Clasificación botánica	4
2.1.3	Morfología	4
2.1.3.1	Raíces	5
2.1.3.2	Tallos y cladodios	6
2.1.3.3	Areolas	7
2.1.3.4	Espinas, flores y frutos	8
2.1.4	Fisiología	10
2.1.5	Métodos de propagación tradicionales	12
2.2	Descripción de las especies en estudio	13
2.2.1	<i>Copiapoa chaniaralensis</i> Ritter.	13
2.2.2	<i>Copiapoa hypogaea</i> Ritter.	14
2.2.3	<i>Eriosyce sandillon</i> (Remy.) Phil.	14
2.2.4	<i>Loxanthocereus aureispinus</i> (F. Ritter) F. Buxbaum.	15
2.2.5	<i>Neoporteria napina</i> (Phil.) Bckbg.	15
2.2.6	<i>Mammillaria elongata</i> DC.	16
2.2.7	<i>Opuntia berteri</i> (Colla) A.E.Hoffm.	16
2.2.8	<i>Opuntia</i> sp.	17
2.2.9	<i>Trichocereus</i> sp.	17
2.3	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	18

2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales en la familia <i>Cactaceae</i>	20
2.4.1	Medio de cultivo y concentración de fitohormonas	21
2.4.2	Origen y tipos de explantes	25
2.4.3	Inducción de callo	26
2.4.4	Activación de yemas axilares	26
2.4.5	Genotipos raros y con problemas de conservación	27
2.4.6	Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> en cactus	28
2.4.7	Factores de afectan el cultivo <i>in vitro</i> en cactus	29
2.4.7.1	Contaminación	30
2.4.7.2	Oxidación fenólica	30
2.4.7.3	Vitrificación	31
2.4.7.4	Variabilidad genética	32
2.4.8	Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de cactus en Chile	33
3	MATERIAL Y MÉTODO	34
3.1	Material	34
3.1.1	Ubicación de los ensayos	34
3.1.2	Material vegetal	34
3.1.3	Material de laboratorio	34
3.2	Método	34
3.2.1	Descripción del ensayo	34
3.2.2	Obtención de explantes	35
3.2.3	Desinfección	35
3.2.4	Siembra	36
3.2.5	Condiciones ambientales	36
3.2.6	Variables de evaluación	36
3.2.7	Diseño experimental	37
3.2.8	Análisis estadístico	38
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39

4.1	Sobrevivencia	39
4.2	Vitrificación	45
4.3	Pardeamiento	49
4.4	<i>Copiapoa chaniaralensis</i> y <i>Eriosyce sandillon</i>	55
4.5	<i>Loxanthocereus aureispinus</i> y <i>Neoporteria napina</i>	58
4.6	<i>Copiapoa hypogaea</i>	61
4.6.1	Inducción de callo	61
4.6.2	Brotación y rizogénesis	64
4.6.2.1	Número de brotes por explante	65
4.6.2.2	Longitud de brotes	68
4.7	<i>Mammillaria elongata</i>	69
4.7.1	Inducción de callo	69
4.7.2	Brotación y rizogénesis	72
4.7.2.1	Número de brotes por explante	74
4.7.2.2	Longitud de brotes	76
4.8	<i>Opuntia berteri</i>	77
4.8.1	Inducción de callo	77
4.8.2	Brotación y rizogénesis	80
4.8.2.1	Número de brotes por explante	82
4.8.2.2	Longitud de brotes	83
4.9	<i>Opuntia sp.</i>	84
4.9.1	Inducción de callo	85
4.9.2	Brotación y rizogénesis	86
4.10	<i>Trichocereus sp.</i>	88
4.10.1	Inducción de callo	88
4.10.2	Brotación y rizogénesis	91
4.10.2.1	Número de brotes por explante	92
4.10.2.2	Longitud de brotes	94
5	CONCLUSIONES	95

6	RESUMEN	97
	SUMMARY	98
7	BIBLIOGRAFÍA	99

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación de diversas especies de cactáceas.	23
2	Tratamientos utilizados en los ensayos.	35
3	Porcentaje de sobrevivencia, mortalidad y contaminación en los ensayos.	40
4	Porcentaje de vitrificación de las nueve especies en estudio.	47
5	Porcentajes de pardeamiento en las nueve especies en estudio.	51
6	Porcentaje de inducción de callo en la especie <i>Neoporteria napina</i> , durante el período de cultivo	59
7	Porcentaje de inducción de callo <i>Copiapoa hypogaea</i> , a lo largo del periodo de cultivo <i>in vitro</i>	63
8	Porcentaje de brotación para la especie <i>Copiapoa hypogaea</i> , a lo largo de todo el periodo de cultivo <i>in vitro</i>	65
9	Porcentaje de inducción de callo en la especie <i>Mammillaria elongata</i> , durante el periodo de cultivo	70
10	Porcentaje de brotación en la especie <i>Mammillaria elongata</i> , durante el período de cultivo	73
11	Porcentaje de inducción de callo para la especie <i>Opuntia berteri</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i>	78
12	Porcentaje de brotación para la especie <i>Opuntia berteri</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i>	81

13	Porcentaje de inducción de callo para la especie <i>Opuntia sp.</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i> .	85
14	Porcentaje de brotación para la especie <i>Opuntia sp.</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i>	86
15	Porcentaje de inducción de callo para la especie <i>Trichocereus sp.</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i>	89
16	Porcentaje de brotación para la especie <i>Trichocereus sp.</i> , durante el período de cultivo <i>in vitro</i>	91

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Hábitos de crecimiento en la familia <i>Cactaceae</i> .	5
2	Tipos de raíces presentes en la familia <i>Cactaceae</i>	6
3	Tipos de tallos (izquierda) y cladodio (derecha) típico del género <i>Opuntia</i>	7
4	Areolas presentes en la familia <i>Cactaceae</i>	8
5	Esquema de espinas centrales y marginales (a) y gloquidio (b) presentes en la familia <i>Cactaceae</i> .	9
6	Tipos de flores presentes en la familia <i>Cactaceae</i>	10
7	Vitrificación en brotes de <i>Copiapoa hypogaea</i> (a), <i>Opuntia berteri</i> (b) y <i>Trichocereus sp.</i> (c)	46
8	Pardeamiento en explantes de <i>Copiapoa hypogaea</i>	55
9	Ejemplares de <i>Copiapoa chaniaralensis</i> (a) y <i>Eriosyce sandillon</i> (b), de más de cinco años de edad utilizados en los ensayos.	56
10	Areolas de <i>Copiapoa chaniaralensis</i> (a), y <i>Eriosyce sandillon</i> (b), sin inducción de callo al finalizar la 4ª semana de postsiembra.	56
11	Inducción de callo en areolas de <i>Copiapoa chaniaralensis</i>	57
12	Ejemplares de <i>Loxanthocereus aureispinus</i> (a) y <i>Neoporteria napina</i> (b); areola de <i>Loxanthocereus aureispinus</i> (c).	58
13	Inducción de callo en la especie <i>Neoporteria napina</i> , a partir de la 4ª semana de cultivo	60

14	Ejemplar de <i>Copiapoa hypogaea</i> (a), de dos a tres años de edad utilizado en el ensayo y callo inducido en explantes cultivados <i>in vitro</i> (b).	62
15	Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie <i>Copiapoa hypogaea</i> .	64
16	Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante, en la especie <i>Copiapoa hypogaea</i> .	66
17	Brotación en <i>Copiapoa hypogaea</i> .	67
18	Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes, en la especie <i>Copiapoa hypogaea</i> .	68
19	Ejemplar de <i>Mammillaria elongata</i> (a), de tres a cuatro años de edad y callo formado en explantes cultivados <i>in vitro</i> (b y c)	69
20	Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie <i>Mammillaria elongata</i> .	71
21	Brotación simple (a) y múltiple (b) en <i>Mammillaria elongata</i> ., al finalizar la 20ª semana de cultivo	74
22	Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante, en la especie <i>Mammillaria elongata</i>	75
23	Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie <i>Mammillaria elongata</i>	76
24	Ejemplar de <i>Opuntia berteri</i> de dos a tres años de edad (a) y callo formado en areolas cultivadas <i>in vitro</i> (b y c) en la 8ª semana de cultivo	79
25	Brotación múltiple (a) y rizogénesis (b) en <i>Opuntia berteri</i>	81
26	Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes por explante en la especie <i>Opuntia berteri</i> .	82
27	Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie <i>Opuntia berteri</i> .	84

28	<i>Opuntia sp.</i> (a) y explantes con brotes y raíces cultivados <i>in vitro</i> .	88
29	<i>Trichocereus sp.</i> , de dos a tres años de edad utilizado como planta madre (a) y callo formado en explantes cultivados <i>in vitro</i> (b y c)	89
30	Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie <i>Trichocereus sp.</i>	90
31	Brotación múltiple en explante de <i>Trichocereus sp.</i> , cultivados en el tratamiento B.	92
32	Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante en la especie <i>Trichocereus sp.</i>	93
33	Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie <i>Trichocereus sp.</i>	94

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Composición del medio basal MURASHIGE y SKOOG (1962, mod).	109
2	Test de Krukal Wallis para la variable vitrificación en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 12ª semana de cultivo	109
3	Test de Krukal Wallis para la variable vitrificación en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 8ª semana de cultivo	110
4	Test de Krukal Wallis para la variable vitrificación en <i>Opuntia berteri</i> , en la 12ª semana de cultivo	110
5	Test de Krukal Wallis para la variable vitrificación en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo	110
6	Test de Krukal Wallis para la variable vitrificación en <i>Neoporteria napina</i> , en la 8ª semana de cultivo	110
7	Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en <i>Neoporteria napina</i> , en la 4ª semana de cultivo	111
8	Test de Kruskal Wallis para la variable inducción de callo en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 8ª semana de cultivo.	111
9	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable inducción de callo en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 12ª semana de cultivo	111
10	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 20ª semana de cultivo	112
11	Test de Krukal Wallis para la variable número de brotes por explante en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 20ª semana de cultivo	112

12	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable número de brotes en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 20ª semana de cultivo.	112
13	Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en <i>Copiapoa hypogaea.</i> , en la 20ª semana de cultivo	113
14	Test de Comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable longitud de brotes en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 20ª semana de cultivo.	113
15	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en <i>Copiapoa hypogaea</i> , en la 20ª semana de cultivo.	113
16	Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 12ª semana de cultivo	114
17	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable inducción de callo en <i>Mammillaria elongata</i> DC., en la 12ª semana de cultivo	114
18	Prueba “t” de Student para la variable número de brotes en e <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo	114
19	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable número de brotes en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo.	115
20	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo.	115
21	Análisis descriptivo según Tratamiento para la variable longitud de brotes en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo	116
22	Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo	116

23	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable longitud de brotes en <i>Mammillaria elongata</i> , en la 20ª semana de cultivo	116
24	Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo	117
25	Prueba “t” de Student para la variable número de brotes por explante en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo	117
26	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable número de brotes por explante en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo	117
27	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo.	118
28	Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo	118
29	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable longitud de brotes en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo.	118
30	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en <i>Opuntia berteri</i> , en la 20ª semana de cultivo.	119
31	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en <i>Opuntia sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo..	119
32	Análisis descriptivo para la variable longitud de brotes mayor (cm) en <i>Opuntia sp.</i> , en la 8ª semana de cultivo.	120
33	Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	120

34	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable inducción de callo en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	120
35	Prueba “t” de Student para el número de brote por explante en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	121
36	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable inducción de callo en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo	121
37	Análisis descriptivo según Tratamiento para la variable número de brotes por explante en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	121
38	Prueba “t” de Student para la variable longitud de brote en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	122
39	Test de comparaciones múltiples de Dunn y ranking de tratamientos para la variable longitud de brotes en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	122
40	Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en <i>Trichocereus sp.</i> , en la 20ª semana de cultivo.	122

1 INTRODUCCION

Durante el siglo XX la aplicación de biotecnología en la floricultura, como la técnica de propagación *in vitro* ha permitido evaluar muchas especies, con el fin de conservar estos recursos genéticos, diversificar el rubro de plantas ornamentales y así abrir nuevas alternativas de comercialización.

La versatilidad de las técnicas de propagación *in vitro* ha favorecido la micropropagación de especies de zonas áridas y semiáridas, siendo la familia *Cactaceae* una de las principales representantes de este grupo de plantas con importancia ornamental.

El creciente interés de los floricultores por los cactus se debe principalmente a su extraordinaria adaptabilidad frente al medio ambiente, lo que origina una gran diversidad de formas, colores y estructuras que conforman todos sus órganos, además de la belleza de sus flores.

En la actualidad la amenaza de extinción de numerosas especies de cactus ha despertado el interés de muchas instituciones por investigar y desarrollar tecnologías que permitan su conservación.

Chile no está ajeno a este problema ya que todos los cactus chilenos se encuentran incluidos en el apéndice II o “Libro Rojo” de Especies de Flora con Problemas de Conservación, que ubica a todas las especies de la familia en la categoría “En Peligro” (HOFFMANN, 1989). La importancia de esto radica en que en Chile las cactáceas son una de las familias botánicas más ricas en endemismos, de las 160 especies descritas y clasificadas presentes en territorio

chileno, hoy en día cerca de 145 se encuentran exclusivamente en territorio chileno.

Se plantea como hipótesis que la aplicación de técnicas de propagación *in vitro* en cactáceas representa una alternativa factible de utilizar, ya que permite una multiplicación de genotipos importantes, proporcionando a la flora nacional ventajas como:

- Disponer de un stock de germoplasma de difícil acceso.
- Contribuir a la conservación de especies de importancia cultural para el país.

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar los estudios preliminares del cultivo *in vitro* para nueve especies de la familia *Cactaceae*, para ser utilizado como una metodología alternativa de multiplicación para estas especies, de las cuales cinco son especies nativas (autóctonas) con problemas de conservación y cuatro son especies exóticas, con importancia botánica y ornamental.

Con el propósito de lograr este objetivo se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la eficiencia de la morfogénesis *in vitro* de nueve cactáceas, con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal.
- Inducir el desarrollo de brotes y raíces en los explantes.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Características generales de la familia *Cactaceae*.

Las cactáceas se adaptan muy bien a un clima de tipo mediterráneo. Las temperaturas ideales para su desarrollo oscilan entre 10°C y 25°C; sin embargo, existen especies, como por ejemplo *Tephrocactus lagopus* (Schumann) Backeberg., que vive a 4.000 m.s.n.m en la Cordillera de los Andes, tolerando temperaturas de 20°C bajo cero. Otra excepción, son los cactus tropicales que no toleran temperaturas inferiores a 10°C, por ejemplo *Rhipsalis houlletiana* Lem. (CULLMANN, 1976).

La humedad del aire y del suelo son factores climáticos importantes para su desarrollo. Por ello, presentan diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas para aprovechar con mayor eficiencia el recurso hídrico. En cuanto a los requerimientos edáficos, las cactáceas son más bien rústicas, solo necesitan un sustrato o suelo libre de acidez y humedad excesiva (CULLMANN, 1976).

En la actualidad las poblaciones de cactus han mermado considerablemente en su hábitat natural, debido fundamentalmente a la colecta excesiva y al crecimiento desproporcionado de las ciudades. Despertando el interés en su rescate y conservación.

2.1.1 Origen y distribución. PEÑA (1942), señala que las cactáceas son de origen americano. Según STRASBURGER (1994), se ubican principalmente en México y el suroeste de los Estados Unidos. Por su parte, HOFFMANN (1989) afirma que el centro de origen es México, ya que es la zona con mayor densidad y diversidad de cactus.

De acuerdo con HOFFMANN (1989), la distribución se extiende desde Canadá hasta la Patagonia, desde las costas del océano Pacífico hasta las costas del océano Atlántico, abarcando gran parte del continente americano. Además, se pueden encontrar ejemplares de cactáceas hasta los 4.500 m.s.n.m, en la cordillera de los Andes o en otros cordones montañosos continentales.

En Chile su distribución es desde el límite norte del país, abarcando el sector costero, la precordillera andina y mesetas altiplánicas, hasta el paralelo 38° Latitud Sur y desde la cordillera de la Costa hasta la cordillera de los Andes (HOFFMANN, 1989).

2.1.2 Clasificación botánica. Según MARSDEN (1960) y HOFFMANN (1989), los cactus provienen de la palabra griega “kaktos”, que sencillamente significa planta espinosa, siendo mencionada en la literatura clásica para denominar al cardo pequeño (*Cynara cardunculus* L., *Asteraceae*). Sin embargo, ambos autores concuerdan que en la actualidad al referirse a los cactus se piensa en plantas suculentas con espinas o púas.

La familia botánica *Cactaceae* pertenece a la división *Spermatophyta*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonea*, subclase *Caryophyllidae* y orden *Caryophyllales* (STRASBURGER, 1994). Está compuesta por alrededor de 86 géneros y más de 2.000 especies conocidas (HOFFMANN, 1989).

2.1.3 Morfología. Como se ilustra en la Figura 1, los cactus se describen como plantas simples, arborescentes, de crecimiento alargado que a veces alcanzan unos metros de altura, arbustivas, esféricas o cilíndricas, siendo esta última la más difundida (HOFFMANN, 1989).

Estas plantas tienen una amplia ramificación ya sea a nivel del suelo como bajo él, existen además formaciones en cojinetes con ramificaciones abundantes, enredaderas y formas epífitas representadas por los géneros *Ephiphyllum* y *Rhysalis*. Esta última forma de vida no la presentan especies autóctonas chilenas, siendo característica de la flora tropical, todas ellas con hábito xerófito en su gran mayoría (STRASBURGER, 1994).

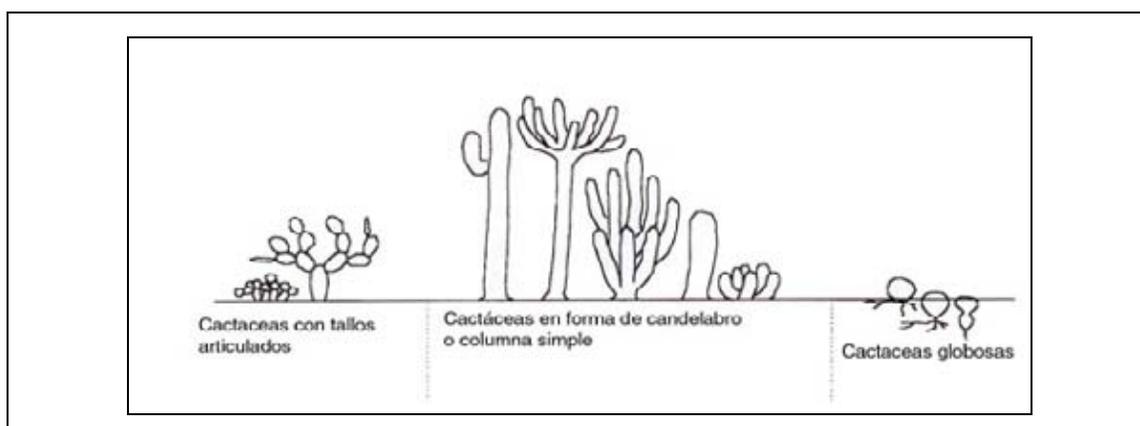


FIGURA 1 Hábitos de crecimiento en la familia *Cactaceae*.

FUENTE: TEILLIER (2005).

Los cactus presentan cuerpos suculentos, los cuales pueden estar segmentado constituyendo cada segmento un cladodio, el cual, al igual que el cuerpo de la planta, puede ser plano, como en la tuna (*Opuntia ficus – indica* Mill.), cilíndricas, como los quiscos (*Neoporteria spp*) o globosos, como la mayoría de los cactus chilenos. Además presentan costillas longitudinales o esféricas con protuberancias, poseen casi siempre espinas foliares y a menudo fascículos de las mismas, denominadas areolas que presentan vástagos axilares y primordios foliares transformados (HOFFMANN, 1989 y STRASBURGER, 1994).

2.1.3.1 Raíces. El sistema radical de los cactus, es un organismo de reserva ya sea de agua o de nutrientes, importante en algunas especies. Según

HOFFMANN (1989), el sistema radical en general es superficial y ramificado. Sin embargo, algunas especies desarrollan una raíz principal napiforme o tuberosa y muy engrosada con algo de ramificación y a menudo estas son de mayor tamaño que el tallo principal y visible de los cactus, como se muestra en la Figura 2 (MARSDEN, 1960).

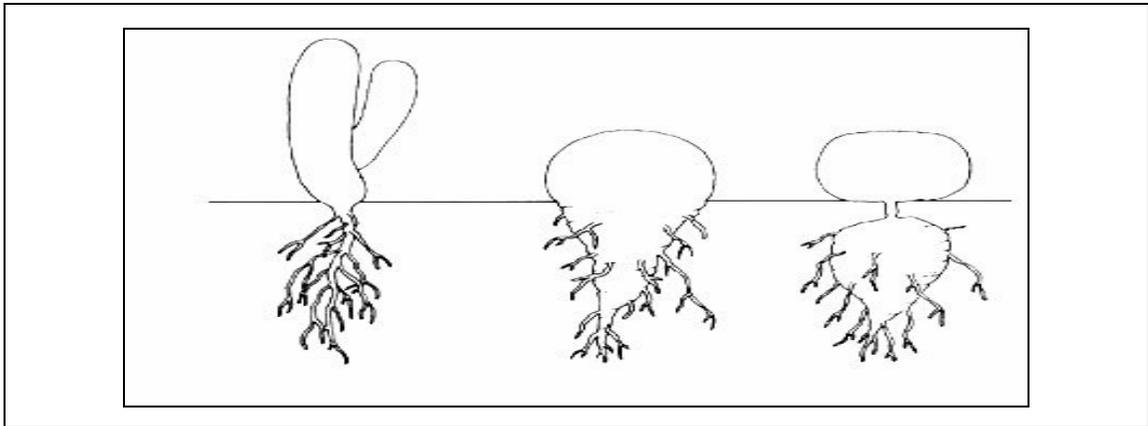


FIGURA 2 Tipos de raíces presentes en la familia *Cactaceae*. (De izquierda a derecha, raíz fasciculada, engrosada y engrosada con cuello angosto).

FUENTE: HOFFMANN (1989).

2.1.3.2 Tallos y cladodios. Los tallos, por lo general, son suculentos y de coloración verde, durante los estados juveniles, sin embargo al alcanzar el estado adulto se lignifican. En su totalidad están recubiertos por una cutícula cerosa, gruesa, la cual es una adaptación para acumular agua al disminuir la transpiración, (HOFFMANN, 1989).

Los tallos en su mayoría presentan hendiduras longitudinales denominadas costillas, que otorgan a los cactus resistencia a la flexión; además, esta superficie irregular permite a la planta encogerse en períodos de sequía y así soportar la pérdida de agua. Las costillas producen crestas sobresalientes denominadas tubérculos o mamilas, la cantidad y forma de estas

es de gran valor taxonómico (Figura 3). Al igual que los cladodios cuentan con areolas en su superficie (HOFFMANN, 1989).

Los cladodios según Buxbaum (1955), citado por SUDZUKI (1999) son órganos tipo tallo o segmentos de este, que por lo general tienen areolas con pelos y espinas, y no presentan hojas foliadas (Figura 3).

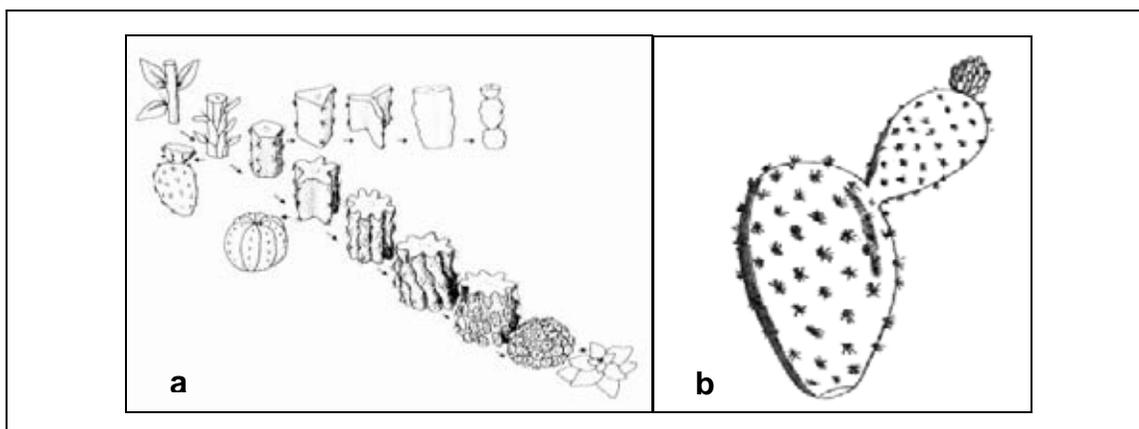


FIGURA 3 Tipos de tallos (a) y cladodio (b) típico del género *Opuntia*.

FUENTE: HOFFMANN (1989); WATSON y DALLWITZ (2005).

2.1.3.3 Areolas. Según ROWLEY (2003), “Areola” es una palabra proveniente del latín, cuyo significado es, “área pequeña o espacio abierto”. En la actualidad una de las definiciones botánicas más conocida para areola es “almohadilla espinosa de un cactus”, sin embargo existen diversas definiciones y descripciones para estas estructuras.

De acuerdo con HOFFMANN (1989), tienen la forma de pequeñas almohadillas y frecuentemente se encuentran recubiertas con pelitos cortos o cerdillas, sobre las cuales nacen las espinas, como se muestra en la Figura 4. Por otro lado, SUDZUKI (1999) señala que las areolas son yemas axilares por donde nacerán nuevos cladodios, flores o raíces si las condiciones ambientales son las adecuadas.

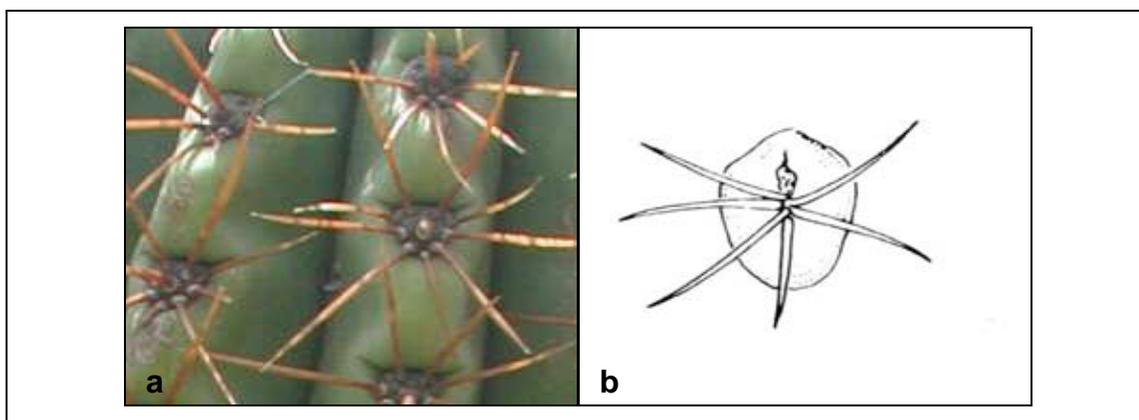


FIGURA 4. Areolas presentes en la familia *Cactaceae*. (Areolas de *Trichocereus validus* (Monv.) Backeb (a) y esquema de una areola (b)).

FUENTE: HOFFMANN (1989) y BOTANICAL (2005).

Según lo señalado por Buxbaum (1950), citado por ROWLEY (2003), existen dos tipos morfológicos de areolas de acuerdo a su simetría; las areolas radiales que presentan espinas expandidas alrededor del crecimiento central y las areolas unilaterales, donde la yema crece sobre el racimo de espinas. Además, las areolas poseen dos tipos de meristemas, un meristema que genera espinas y un meristema que da origen a cladodios y flores. Por otro lado, las areolas pueden presentar más centros de crecimiento, desarrollando dos o más flores pequeñas a partir de una areola simple, como es el caso de algunas especies de los géneros *Rhipsalis* y *Eriosyce*.

2.1.3.4 Espinas, flores y frutos. Robinson (1974) y Boke (1944), citados por SUDZUKI (1999), señalan que las espinas tienen gran relevancia taxonómica y existen dos tipos: las espinas y los pelos espinosos o gloquidios. La representación esquemática de estos dos tipos de espinas, se muestran en la Figura 5.

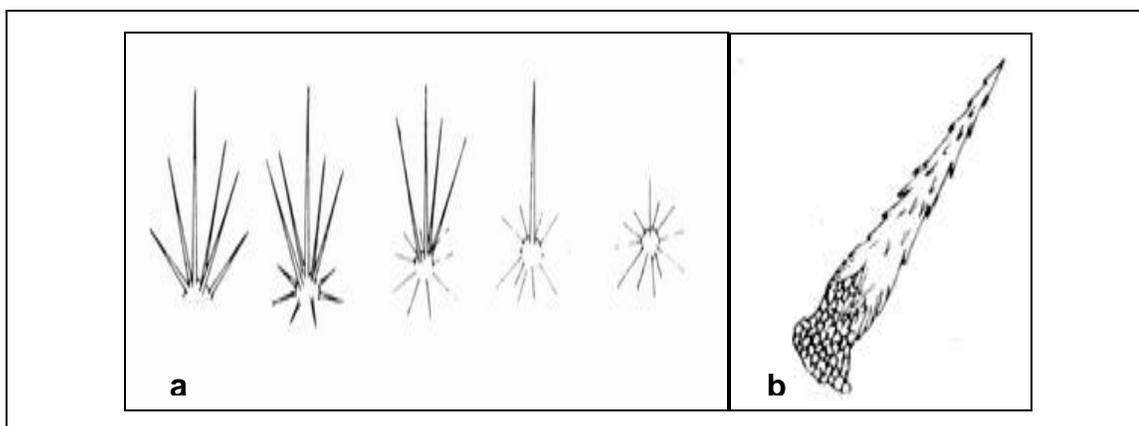


FIGURA 5 Esquema de espinas centrales y marginales (a) y gloquidio (b) presentes en la familia *Cactaceae*.

FUENTE: HOFFMANN (1989).

De acuerdo con HOFFMANN (1989), las espinas son consideradas como equivalentes de las hojas o bien hojas metamorfoseadas. Es por ello que MARSDEN (1960), señala que un abundante desarrollo de espinas en especies expuestas constantemente al sol, les proporciona cierta protección al tallo al otorgarle sombra.

Otra de las funciones de las espinas es proteger contra la depredación de los animales, debido a lo suculento de sus tallos, más aún en condiciones desérticas donde los cactus son abundantes y apetecidos (HOFFMANN, 1989).

Respecto a los frutos CULLMANN (1976) señala, que los cactus presentan diversas formas, tamaños, colores, texturas y distribución en la planta. Comúnmente son carnosos como las bayas dehiscentes y en menor medida, secos o indehiscentes.

Según lo señalado por HOFFMANN (1989), los frutos al igual que el resto de la planta pueden estar cubiertos o envueltos por distintas estructuras como areolas, espinas, gloquidios, etc, siendo este aspecto relevante para la

clasificación de algunas cactáceas. Otra característica de los frutos, es que forman gran cantidad de semillas, como es el caso del Copao (*Eulychnia sp*), el cual es un típico fruto del valle del Elqui.

Las flores de los cactus tienen una amplia gama de tamaños (STRASBURGER, 1993). Existen flores que miden 0,5 cm y hasta 40 cm (CULLMANN, 1976). Su coloración abarca todos los colores, solamente el azul puro está excluido, aunque formando parte de manchitas en los pétalos (STRASBURGER, 1993). Con respecto a su morfología cuentan con flores solitarias, sésiles, ampliamente actinomorfas (polisimétricas) o levemente zigomorfas (monosimétricas), como se muestra en la Figura 6, pueden ser laterales, terminales u ordenadas como corona en el ápice, etc. (CULLMANN, 1976 y STRASBURGER, 1993).

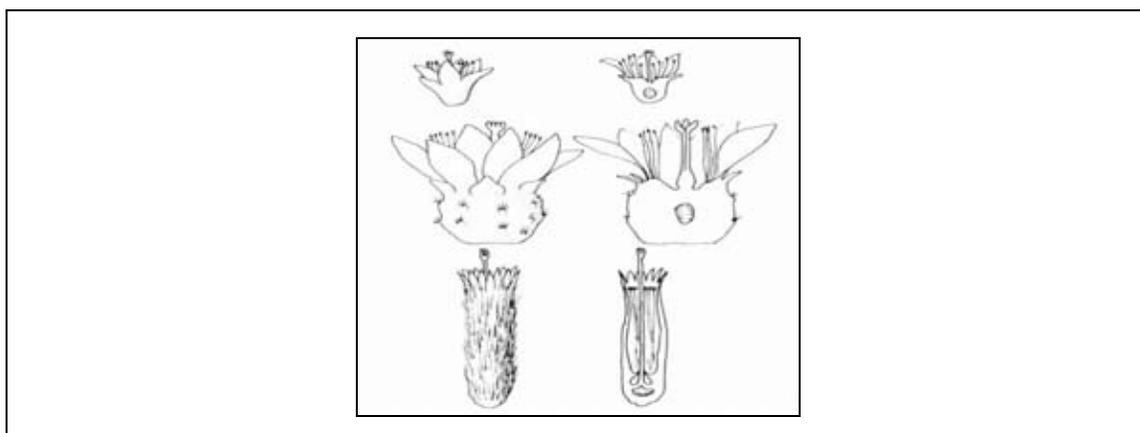


FIGURA 6 Tipos de flores presentes en la familia Cactaceae

FUENTE: HOFFMANN (1989).

2.1.4 Fisiología. BUSTAMANTE (1996), señala que las cactáceas presentan una marcada especialización fisiológica, sobre todo respecto al balance hídrico y al metabolismo del carbono. De esta manera, dichas características han llevado a los cactus a ser típicos y representativos de variados ambientes ecológicos en el continente americano.

Los Cactus pertenecen a un grupo de plantas que realizan el “Metabolismo Ácido Crassulaceo” (CAM), denominado así por su descubrimiento original en la familia *Crassulaceae*. A partir de ese momento el metabolismo ácido crassulaceo ha sido encontrado en un gran número de plantas, principalmente en familias de angiospermas como; *Agavaceae*, *Asteraceae*, *Bromeliaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, entre otras (VILLALOBOS, 1999 y GARCÉS, 2003).

Las plantas CAM tienen la capacidad de seleccionar la ruta metabólica a seguir durante la fotosíntesis. Una de las rutas a seguir es el “Ciclo de Calvin”, denominada también ruta C₃, ya que el primer compuesto detectable en la fotosíntesis es de tres carbonos, el ácido 3-fosfoglicérico (PGA). La otra ruta se denomina “Hatch-Slack” o ruta C₄, debido a que los ácidos orgánicos en donde se atrapa el dióxido de carbono (CO₂) tienen cuatro carbonos (VILLALOBOS, 1999 y GARCÉS, 2003).

La selección de la vía metabólica a seguir se realiza según las condiciones ambientales imperantes, como escasez de agua, alta temperatura o elevada salinidad, siendo más eficientes en el uso de la humedad disponible (SIVORI, 1980). Durante el metabolismo CAM el CO₂ captado durante la noche activa la carboxilasa en los tejidos vegetales, la cual es transformada en ácidos orgánicos, durante el día y cuando los estomas aún se encuentran cerrados, finalmente el CO₂ es transferido a la ruta normal C₃ para ser utilizado en el resto de la planta (KIMBAL, 1986; VILLALOBOS, 1999; GARCÉS, 2003).

En la práctica, la vía metabólica tiene relación con la competencia vegetal, ya que indica la jerarquía de las plantas en el ambiente árido (KIMBALL, 1986). Por ello donde las condiciones son normales y en particular con un nivel regular de precipitaciones, las plantas C₃ son las más abundantes, a medida que las precipitaciones se hacen más irregulares, las plantas C₄ se

asientan en los espacios abiertos (VILLALOBOS, 1999 y GARCÉS, 2003). Es así como, las plantas CAM aparecen cuándo las condiciones de aridez aumentan (KIMBALL, 1986). Sin embargo, aunque las plantas C₄ y CAM son más evolucionadas, tradicionalmente sólo han tenido un valor especial y limitado en tierras áridas (VILLALOBOS, 1999 y GARCÉS, 2003).

El metabolismo ácido crasuláceo de las cactáceas puede ser alterado en condiciones de cultivo artificiales, especialmente en el cultivo *in vitro*. Se modifica el patrón de absorción de carbono, afectando el crecimiento de las plantas. La alta humedad en los frascos de cultivo, permite que los estomas permanezcan abiertos durante el período de luz, realizándose una continua fijación de CO₂ durante ambos períodos, de luz y oscuridad. Finalmente las plantas presentan un crecimiento continuo y rápido (MALDA *et al.*, 1999ab), por ello CLAYTON *et al.* (1990), señalan que las cactáceas micropropagadas son comparables en tamaño y madurez con cactus producidos desde semillas de varios años de edad.

2.1.5 Métodos de propagación tradicionales. Según HOFFMANN (1989), los cactus se propagan mediante la reproducción sexual a través de semillas o en forma asexual a partir de esquejes, cladodios individuales o brazos, trozos de tallos, etc. Por otro lado, hay que considerar que la mayoría de las especies de cactus son alógamas o autoestériles, debiendo contar con dos plantas que florezcan al mismo tiempo, por lo que se hace difícil su reproducción por semillas (MARSDEN, 1960).

Las semillas no presentan receso, es decir tienen plena capacidad germinativa después de la cosecha, aunque se prefiere guardarlas hasta primavera para que en los invernaderos alcancen temperaturas de 20°C a 27°C óptimas para la germinación (MARSDEN, 1960 y HOFFMANN, 1989).

La propagación vegetativa es imprescindible cuando se trata de multiplicar características particulares como forma de plantas, colores, o bien ciertos cultivares, híbridos valiosos, etc. (MARSDEN, 1960; CULLMAN, 1976; HOFFMANN, 1989).

La propagación por medio de esquejes y rebrotes, es muy sencillo, hay que obtener los esquejes en primavera – verano, ya que el crecimiento es más vigoroso, la localización del corte va a depender de la especie. Las precauciones que se deben tomar con esta práctica cultural son las mismas que para cualquier método de propagación vegetativa; se deben desinfectar los implementos de trabajo y aplicar desinfectantes en las heridas, luego se procede a enraizar el material en un sustrato con buen drenaje, entre los que se nombran a la vermiculita y la arena gruesa (MARSDEN, 1960).

2.2 Descripción de las especies en estudio.

Entre las cactáceas en estudio se encuentran especies endémicas chilenas con problemas de conservación y especies exóticas, ambos grupos de gran interés botánico y ornamental.

2.2.1 *Copiapoa chaniaralensis* Ritter. El cactus *C. chaniaralensis*, cuyo nombre común es “Copiapoa de Chañaral”, es una especie endémica (autóctona) catalogada como RARA en su hábitat por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza. Se encuentra en la Tercera Región de Atacama específicamente en la ciudad de Chañaral (HOFFMANN, 1989).

Según HOFFMANN (1989), presenta un cuerpo esférico solitario de color verde oscuro y ápice hundido con fieltro blanquecino. Llega a medir unos 4 - 7 cm de diámetro. Presenta una raíz pivotante, con cuello delgado. Las espinas son aciculares o derechas de coloración marrón o negras, las cuales miden de 0,8 – 3,0 cm de largo. Las flores miden unos 3,8 cm de ancho, siendo los

tépalos alineados y amarillos, con manchas rojas en los extremos y muy aromáticas. El fruto es de coloración verde, con aproximadamente diez escamas largas y rojas.

2.2.2 *Copiapoa hypogaea* Ritter. El cactus *C. hypogaea*, se conoce con el nombre común de “bajo tierra”, es una especie endémica (autóctona), clasificada como RARA en su hábitat natural por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza, con advertencia de NO COLECTAR. Se encuentra en la Tercera Región de Atacama específicamente en los cerros costeros de Chañaral (HOFFMANN, 1989).

De acuerdo con HOFFMANN (1989), presenta un cuerpo esférico, con diez a catorce costillas, rara vez dividido, cuya epidermis es de una coloración gris – verdosa, llega a medir 3,0 - 6,5 cm de diámetro, su ápice presenta un fieltro blanquecino. La raíz es engrosada con cuello delgado. Presenta areolas hundidas y las espinas son casi inexistentes, por lo general negras, aciculares de 0,2 - 0,4 cm de largo. Respecto a las flores CULLMANN (1976) señala, que miden 2 cm de largo y 4 cm de ancho, presentan tépalos en forma de espátula, de color amarillo y rojo, las cuales abren solo un día. Los frutos son pequeños y redondeados (HOFFMANN, 1989).

2.2.3 *Eriosyce sandillon* (Remy.) Phil. El cactus *E. sandillon*, cuyos nombres comunes son “sandillón” y “asiento de la suegra”, conocido también como: *Echinocactus sandillon* Remy, *Echinocactus ceratistes* Otto, y *Eriosyce ceratistes* Britton et Rose, es una especie endémica (autóctona), clasificada como VULNERABLE en su hábitat natural por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza. Crece a unos 2.000 m de altura en cerros de la Cordillera de los Andes en Santiago, Aconcagua y Coquimbo (HOFFMANN, 1989).

Según CULLMANN (1976) y HOFFMANN (1989) presenta un cuerpo grande, esférico y solitario, el que puede llegar a medir hasta 50 cm de diámetro, puede llegar a tener treinta costillas o más. Las areolas son grandes y ovaladas y las espinas son algo curvadas, de color negro o amarillo, de 2,5 a 3,5 cm de largo. Las flores son amarillas a rojizas, miden aproximadamente 3,5 cm de longitud, cuyo tubo floral está cubierto de lanosidad densa y cerdas clavadoras y el fruto es seco de 4 cm de largo.

2.2.4 *Loxanthocereus aureispinus* (F. Ritter) F. Buxbaum. El cactus *L. aureispinus*, cuyo nombre común es “Cola de Ratón”, conocido también como; *Cleistocactus winteri* (F. Ritter) DR Hunt, *Winteria aureispina* F. Ritter, *Hidewintera aureispina* Ritt., *Winterocereus aureispinus* (Ritter) Backeb., es una especie exótica. Se encuentra en Argentina y Uruguay (CULLMANN, 1976).

Según CULLMANN (1976), es de hábito arborescente, alcanzando 1,5 m de altura y 6 cm de diámetro. Las espinas dorsales son de color amarillo y las flores de color anaranjado – rosadas, las cuales llegan a medir de 4 - 6 cm de largo y a veces 5 cm de ancho, siendo abundantes y llamativas.

2.2.5 *Neoporteria napina* (Phil.) Bckbg. El cactus *N. napina*, cuyo nombre común es “Napín”, conocido también como: *Echinocactus napinus* Phil., *Malacocarpus napinus* (Phil) Britton et Rose., *Notocactus napinus* (Phil) Berg., *Neochilenia napina* (Phil) Back., *Hildmannia napina* Phil, *Thelocephala napina* (Phil) Ito. y *Chileorebutia napina* (Phil) Ritter., es una especie endémica (autóctona) catalogada como especie EN PELIGRO en su hábitat natural por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza. Se encuentra en la Tercera Región de Atacama, desde el río Choros hasta Tocalma, en la provincia de Huasco (HOFFMANN, 1989).

De acuerdo con CULLMANN (1976) y HOFFMANN (1989) es un cactus geófito de tallo pequeño de unos 10 cm de alto y 5 cm de ancho, que alcanza 20 cm de altura al estar en cultivo. Presenta hábito de crecimiento simple o con algunas ramificaciones. El tallo o cuerpo es redondo o aplanado, de color gris – verdoso y presenta catorce costillas con mamilas espiraladas, cuyo ápice es hundido y desnudo. La raíz engrosada y napiforme. Las espinas son cortas de 3 mm no más, encorvadas en la superficie de la planta, amarillentas a negras. Las flores son apicales de 3 - 4 cm y ásperas. El fruto es seco al madurar.

2.2.6 *Mammillaria elongata* DC. EL cactus *M. elongata*, conocido también como *Leptochladodia elongata* D.C, es una especie exótica de origen Mexicano, se encuentra principalmente al noreste de México y Texas (CULLMANN, 1976).

Es una planta de hábito arbustivo, tallo cilíndrico, 20 cm de longitud y 3 cm de ancho. Presenta espinas lisas, rígidas, rectas o encorvadas generalmente de color amarillo, a veces blanquecinas o rojizas a lo menos en la base o en la punta. Las Flores miden alrededor de 1,0 - 1,5 cm de longitud, son de color amarillo o amarillo verdoso y el fruto es rojo escarlata o rosado (CULLMANN, 1976).

2.2.7 *Opuntia berteri* (Colla) A.E.Hoffmann. El cactus *O. berteri*, cuyos nombres comunes son perrito, gatito, puskeye, conocido también como *Cactus berteri* Colla., *Echinocactus berteri* (Colla) Remy., *Tephrocactus berteri* (Colla) Ritter. y *Cumulopuntia berteri* (Colla) Ritter., es una especie nativa (autóctona), catalogada como FUERA DE PELIGRO en su hábitat natural por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza. Se encuentra desde Montenegro (lat. 33°) en la zona central, hasta el norte de Arequipa (Lat. Sur. 16°) en el Perú, hasta 3.500 m.s.n.m (HOFFMANN, 1989).

De acuerdo con HOFFMANN (1989), presenta hábito de crecimiento arbustivo, en cojinetes que alcanzan 10 - 20 cm de altura, tallos esféricos o alargados, de color verde o gris – azulado. Las areolas presentan cerdillas blancas, las cuales tienen haces de gloquidios con cinco a doce espinas aciculares, derechas y divergentes, de largo variable. Las flores son laterales o apicales, de color amarillo, doradas o anaranjadas, de 3,5 cm en promedio de longitud y fruto relativamente seco.

2.2.8 *Opuntia sp.* El cactus *Opuntia sp.*, es una especie exótica de hábito arborescente, puede llegar a medir de 2 - 6 m de altura con 15 cm de diámetro, con o sin espinas. Las ramificaciones de su copa son ovales, estrangulados en la base, de unos 10 - 30 cm de largo y 8 - 15 cm de ancho, la coloración de la epidermis es verde oscuro, las areolas presentan abundante cantidad de gloquidios de color café claro, las espinas miden de 1 - 4 cm y su color varía de amarillo a rojo oscuro. Las flores presentan una gama de colores desde amarillo a rojo, miden aproximadamente 9 cm de diámetro (MARSDEN, 1960; CULLMANN, 1976; HOFFMANN, 1989).

2.2.9 *Trichocereus sp.* El género *Trichocereus* actualmente se incluye en el género *Echinopsis*. Está representado por plantas rastreras, arbustivas e incluso arbóreas, cuyas dimensiones fluctúan entre los 0,3 m hasta 15 m de altura, de 5 - 50 cm de diámetro. Presentan cuerpos o tallos cilíndricos, con gran número de costillas pequeñas. Ápice frecuentemente simétrico. Aréolas ubicadas en el borde de las costillas, con abundante lanosidad cuando jóvenes. Espinas numerosas, flexibles o rígidas, de pocos milímetros a más de 15 cm, con la base bulbosa. Flores solitarias o formando una corona en el ápice de los tallos, a veces una por areola, infundibuliformes laterales o apicales (BUSTAMANTE, 1996; PINTO, 2002)

La especie en estudio es de tipo columnar, presenta ramificaciones desde la base, a veces de crecimiento horizontal, habita las tierras alto andinas de Perú, Bolivia y Argentina (CULLMANN, 1976).

2.3 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una técnica basada en la totipotencialidad de la célula vegetal, mediante el uso de conglomerados celulares, tejidos u órganos procedentes de la planta (SEEMANN, 1993). Este principio fue demostrado por Haberlandt en 1902, enunciado por los botánicos Schleiden y Schwann en 1938 y ratificado por Skoog y Miller en 1957, al demostrar el requerimiento de un adecuado balance de auxinas y citoquininas, lo cual determina el tipo de crecimiento o morfogénesis *in vitro* del material vegetal (HEWSTONE y REYES, 1999).

Hoy en día, se reconoce una amplia gama de usos en relación a la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que incluye desde el mejoramiento genético y manipulación de células, obtención de material vegetal libre de virus y patógenos, preservar material genético deseable (germoplasma) y micropropagación de una especie (CRISOSTO y RODRÍGUEZ, 1984; BOTTI, 1987)

La propagación *in vitro* se relaciona con la multiplicación rápida y masiva de plantas, conservando el genotipo específico y evitando la segregación de caracteres genéticos. A menudo se describe como un método práctico y rentable para la producción de determinado material vegetal (SOLAR, 1985 y BOTTI, 1989)

En la actualidad la micropropagación está siendo aplicada con fines comerciales, con gran éxito en muchas especies vegetales, algunas de las cuales juegan un rol importante en la economía de países en desarrollo,

abarcando cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y forestales. Además, es una técnica que ha cobrado importancia en la conservación de la flora en peligro de extinción (BOTTI, 1989; MUÑOZ, 1989; SEEMANN, 1985).

Este sistema presenta numerosas ventajas frente a un proceso de propagación tradicional como por ejemplo: rapidez en la multiplicación, obtención de gran número de plantas a partir de un genotipo específico, control fitosanitario, reducción del espacio de almacenamiento, definición de programas de producción durante todo el año sin problemas estacionales, entre otras (BOTTI, 1989)

Según BOTTI (1989), la micropropagación tradicionalmente se debe realizar bajo condiciones totalmente artificiales, asépticas y controladas, en un medio nutritivo balanceado que permita la división y multiplicación celular, desarrollo de órganos y con ello de un nuevo individuo capaz de crecer en forma autótrofa bajo condiciones *ex vitro* (*ex vitro*).

De acuerdo con ARENAS y MARTINEZ (2002), el proceso de multiplicación *in vitro* cuenta con las siguientes etapas: selección y preparación de plantas madres, desinfección de los explantes y su posterior adaptación al medio artificial de cultivo, obtención masiva de brotes para generar nuevos explantes hasta obtener el número deseado de plantas, obtención definitiva de una planta, debido a que se obtiene la formación de raíces en los brotes logrados y la adaptación de las plantas cultivadas *in vitro* al ambiente en donde crecerán definitivamente.

Narayanaswamy (1977) citado por SEEMANN (1985), señala que los medios de cultivo utilizados contienen macro y micro elementos que forman parte del componente inorgánico del medio; sin embargo, muchos medios también incluyen compuestos orgánicos como aminoácidos entre los cuales se

mencionan: asparagina, glicina, glutamina y tirosina y vitaminas, principalmente, tiamina, piridoxina, biotina y el ácido nicotínico. Además, estos medios tienen como fuente energética un carbohidrato, el más usado es la sacarosa, debido a su rápida metabolización. Por ello MOLINA (2002), señala que son medios artificiales obtenidos gracias a la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, existiendo una gran gama de estos y de los cuales el más utilizado es el de MURASHIGE y SKOOG (1962).

2.4 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en la familia *Cactaceae*.

Según Narayanaswamy (1977) citado por MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO (1989), la familia *Cactaceae* en comparación con otros grupos taxonómicos, durante la primera mitad del siglo XX no captó la atención de las entidades involucradas con el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Sin embargo, a partir de 1962 se han realizado muchas investigaciones con distintos grados de éxito (STEINHART, 1962; JOHNSON y EMINO, 1979a), registrándose recientemente resultados muy satisfactorios (STARLING y DOOS, 1983; STARLING, 1985).

Las primeras investigaciones relacionadas con la propagación *in vitro* de cactáceas, tuvieron objetivos muy específicos (MAUSETH, 1977). Tales como la biosíntesis de alcaloides; por ejemplo en *Trichocereus spachianus* (Riccob.), siendo uno de los primeros intentos para cultivar fragmentos de brotes, provenientes de un cactus de dos a tres años de edad, cultivado *ex vitro* (STEINHART, 1962); además se realizaron experimentos para evaluar la influencia del balance hormonal sobre la morfogénesis *in vitro* (MAUSETH, 1977).

No obstante, el objetivo principal de muchos de estos estudios iniciales, fue la propagación *in vitro* de algunos cactus, a través de la inducción de callo (MINOCHA y MEHRA, 1974; JOHNSON y EMINO, 1979a). Sin embargo, en

investigaciones más recientes, se ha logrado la formación de brotes, a través de la activación hormonal de yemas axilares o areolas (PEREZ *et al.*, 2002; PEREZ y DÁVILA, 2002; RUBLUO *et al.*, 2002). De esta manera se evita la variación somaclonal, asociada a la formación de callo (MACHADO y PRIOLI, 1996; MALDA *et al.*, 1999a).

2.4.1 Medio de cultivo y concentración de fitohormonas. El medio MS ha sido utilizado ampliamente en el cultivo *in vitro* de cactus con excelentes resultados (MINOCHA y MEHRA, 1974; JOHNSON y EMINO, 1979b; LAZARTE *et al.*, 1982; STARLING, 1985; CLAYTON *et al.* 1990). Por otro lado, se ha probado un amplio rango de concentraciones y tipos de fitohormonas; entre las auxinas se pueden mencionar ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido indolbutírico (AIB) y entre las citoquininas se tiene la benzilaminopurina (BAP) y 6-furfurilaminopurina o kinetina (KIN).

Sin embargo, se han documentado resultados muy exitosos con la acción combinada de las fitohormonas BAP y ANA, sobre la formación de nuevas plantas en miembros de la familia *Cactaceae* (LAZARTE *et al.*, 1982; STARLING y DODDS, 1983; VYSKOT y JÁRA, 1984; STARLING, 1985; MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989). No obstante, sólo en pocas ocasiones una misma concentración y combinación de fitohormonas han demostrado ser exitosa para más de una especie (CLAYTON *et al.*, 1990 y GIUSTI *et al.*, 2002). Al respecto JOHNSON y EMINO (1979 a) señala que cada especie de cactus podría requerir una combinación única de reguladores de crecimiento vegetal.

En el Cuadro 1 se resumen algunas de las investigaciones que se han llevado a cabo en la familia *Cactaceae*. Entre los primeros trabajos se pueden mencionar los realizados por MINOCHA y MEHRA (1974), que obtuvieron callo friable en *Neomammillaria prolifera* Miller, incubada en el medio MS

suplementado con 10 – 20 mg/L de 2,4-D y 1 - 2 mg/L KIN, sin lograr diferenciación de brotes. Por su parte, JOHNSON y EMINO (1979b) en *Mammillaria elongata* indujeron callo en el medio MS con 2 – 10 mg/L de 2,4 – D y 1 – 2 mg/L de KIN ó 2iP, mientras que con 10 mg/L de 2iP y 1mg/L de AIA se produjo brotación, finalmente la iniciación de raíces se logró con 60 mg/L ANA o AIB.

A partir de la década de los ochenta hubo un aumento en la micropropagación de cactáceas, debido a la creciente demanda por material vegetal saludable con potencial ornamental. Es así como, en *Epiphyllum chrysocardium* Alexsan., se obtuvo brotación en el medio MS suplementado con 0,1 mg/L BAP y 0,1 mg/L ANA y la formación de raíces con 0,01 mg/L de AIB (LAZARATE *et al.*, 1982).

En *Leuchtenbergia principis* Hook., el medio MS con 10 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA produjo 25 brotes por explantes (STARLING, 1985). *Sulcorebutia alba* Rausch., fue propagada con éxito en el medio MS con 0,25 – 1,0 mg/L de BAP, sin la necesidad de ANA (DABEKAUSSEN *et al.*, 1991). También se indujo formación de callo y brotación en *Gymnocalycium buldiamur* L. y *Mammillaria bocasana* L en un medio MS con 4 mg/L de BAP (PASQUAL y HOSHIKA, 1992). En *Cereus peruvianus* Mill., se indujo brotación en el medio MS con 1 mg/L de BA y 1 mg/L de AIA o ANA (OLIVEIRA *et al.*, 1995; MACHADO y PRIOLI, 1996).

Investigaciones más recientes buscan lograr protocolos de micropropagación con fines comerciales y el rescate de especies en peligro de extinción. De esta manera, *Mammillaria san angelensis* Sánchez – Mejorada fue propagada en forma masiva y exitosa con explantes laterales en un medio MS con 1 mg/L de BAP o en combinación con 0,01 mg/L de ANA (MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; RUBLUO *et al.* 2002).

Cuadro 1 Medios de cultivo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación de diversas especies de cactáceas.

Autor	Especie	Medio de cultivo	Fitohormonas	M ⁽¹⁾
Minocha y Mehra, 1974	<i>Neomammillaria prolifera</i>	Murashige y Skoog (MS)	10 - 20 mg/L 2,4 - D +1 – 2, mg/L KIN	C ⁽²⁾
Johnson y Emimo, 1979a	<i>Mammillaria elongata</i>	MS	2 -10 mg/L 2,4 - D +1 – 2 mg/L 2iP 10 mg/L 2iP + 1 mg/L AIA 60 mg/L ANA o AIB	C B ⁽³⁾ R ⁽⁴⁾
Lazarte <i>et al.</i> , 1982	<i>Epiphyllum chrysocardium</i>	MS 50%	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA 0,01mg/L AIA Sin hormonas	B R R
Starling y Hutson, 1984	<i>Epithelantha micromeris</i>	MS	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA	B
Martínez - Vázquez y Rubluo, 1984	<i>Mammillaria san - angelensis</i>	MS	1 mg/L BAP con o sin 0,01 mg/L ANA	B
Starling, 1985	<i>Leuchtenbergia principis</i>	MS	10 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA	B
Smith <i>et al.</i> , 1991	<i>Coryphantha macromeris</i>	MS	10 mg/L BAP + 0,1 mg/L 2,4 - D Sin hormonas	C y B B y R
Dabekaussen <i>et al.</i> , 1991	<i>Sulcorebutia alba</i>	MS 1.5	0,25 – 1,0 mg/L BAP	B
Pasqual y Hoshika, 1992	<i>Gymnocalycium buldiamur</i> <i>Mammillaria bocassana</i>	MS	4 mg/L BAP Sin hormonas 0,1 ó 1,0 mg/L ANA	B R R
Oliveira <i>et al.</i> , 1995	<i>Cereus peruvianus</i>	MS	4 mg/L BAP + 6 mg/L KIN 4 mg/L 2,4 - D +4 mg/L KIN	C y B R
Machado y Prioli, 1996	<i>Cereus peruvianus</i>	MS	1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA	B y R
Pérez <i>et al.</i> , 1998	<i>Astrophytum myriostigma</i> <i>Mammillaria sphaclata</i>	MS	1 mg/L BAP + 0,01 mg/L ANA 0,5 – 1,0 mg/L AIA o AIB	B R
Pérez <i>et al.</i> , 1998	<i>Mammillaria candida</i> , <i>Stenocactus coptonogonus</i>	MS	1 mg/L BAP 0,5 mg/L AIA o AIB	B R

Continuación Cuadro 1

Autor	Especie	Medio de cultivo	Fitohormonas	M ⁽¹⁾
Pérez <i>et al.</i> , 1998	<i>Mammillaria formosa</i> <i>Mammillaria obscura</i>	MS	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA 0,5 – 1,0 mg/L AIA o AIB	B R
Pérez <i>et al.</i> , 1998	<i>Nyctocereus serpentinus</i>	MS	2 mg/L BAP 0,5 mg/L AIA	B R
Bhau, 1999	<i>Coryphantha elephantidens</i>	MS	2 mg/L 2,4 - D + 1 mg/L KIN 0,5 mg/L 2,4 - D + 1 mg/L KIN Sin hormonas	C B R
Malda <i>et al.</i> , 1999	<i>Obregonia denegrii</i> <i>Coryphantha minima</i>	MS	0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA 5 mg/L AIA o AIB	B R
Llamoca - Zarate <i>et al.</i> , 1999	<i>Opuntia ficus - indica</i>	MS	0,5 mg/L 2,4 - D + 0,2mg/L KIN	C
Mata <i>et al.</i> , 2001	<i>Turbincarpus laui</i>	MS MS 50%	2 – 3 mg/L BAP + 0,0 – 0,5 mg/L ANA Sin hormonas	B R
Pérez y Dávila, 2002	<i>Pelecypora aselliformis</i> <i>Pelecypora strobiliformis</i>	MS	2 mg/L BAP	B
Pérez <i>et al.</i> , 2002	<i>Carnegieia gigantea</i> <i>Pachycereus pringlei</i> <i>Stenocereus thurberi</i>	MS	2 mg/L BAP 1 mg/L BAP 1 mg/L AIB	B B R

¹Morfogénesis²Callo³Brote⁴Raíz

En *Turbincarpus laui* Glass et Foster. se obtuvo gran número de brotes adventicios en un medio MS con 2 – 3 mg/L de BAP y 0 – 0,5 mg/L de ANA (MATA *et al.*, 2001). En *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *Pelecyphora strobiliformis* Werdermann se produjeron 12,4 y 13,7 brotes por explante respectivamente, en un medio con 2 mg/L de BAP (PEREZ y DÁVILA, 2002). Por su parte, GIUSTI *et al.* (2002) obtuvo buena formación de brotes en *Escobaria minima* (Baird) D. Hunt y *Mammillaria pectinifera* (Ruempler) F. A. C Weber. en un medio con 0,01 – 0,1 mg/L de ANA y 5 mg/L de BAP (GIUSTI *et al.* 2002).

2.4.2 Origen y tipos de explantes. En las cactáceas los explantes utilizados en la propagación *in vitro* pueden ser aislados desde plántulas germinadas en un medio estéril o bien a partir de plantas adultas cultivadas *ex vitro*, ya sea desde plantas silvestres o cultivadas en invernadero (MAUSETH, 1977; LAZARTE *et al.* 1982; CLAYTON *et al.* 1990).

En la actualidad el cultivo *in vitro* ha demostrado ser exitoso en varios miembros de la familia *Cactaceae*, mediante la formación de brotes axilares y adventicios (MALDA *et al.*, 1999), utilizando diferentes tipos de explantes (JOHNSON y EMINO, 1979a y CLAYTON *et al.*, 1990), entre los cuales se mencionan: ápices de brotes (STARLING, 1985; SMITH *et al.*, 1991; MACHADO y PRIOLI, 1996; MALDA *et al.*, 1999), segmentos de cotiledones (OLIVEIRA *et al.*, 1995; LLAMOCA *et al.*, 1999), o de epicotilos (GIUSTI *et al.*, 2002), segmentos de tallos o cladodios (STEINHART, 1962; LAZARTE *et al.*, 1982; LASSOCINSKI, 1985; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; DABEKAUSSEN *et al.*, 1991; PEREZ *et al.*, 2002; PÉREZ y DÁVILA, 2002), microexplantes de plantas silvestres (HAVEL y KOLAR, 1983), órganos florales (MINOCHA y MEHRA, 1974) y segmentos radicales de plantas cultivadas *in vitro* (PASQUAL y HOSHIKA, 1992; BHAU, 1999), etc.

2.4.3 Inducción de callo. Según MALDA *et al.* (1999a), el cultivo de tejido mediante la inducción de callo se ha desarrollado con gran éxito en muchas especies de cactus. Entre las que se incluyen *Neomammillaria prolifera* (MINOCHA y MEHRA, 1974), *Opuntia polycantha* Haw. P. e *Hylocereus calcaratus* (A. Berger) Brito & Ros. (JOHNSON y EMINO, 1979a) y *Mammillaria elongata* (JOHNSON y EMINO, 1979b), entre otras.

Sin embargo, la formación de brotes a partir de tejido calloso es considerado genéticamente inestable (MALDA *et al.*, 1999a), ya que en este tipo de tejido genera algún grado de variación somaclonal, la cual origina anomalías morfológicas (CLAYTON *et al.*, 1990; MACHADO y PRIOLI, 1996).

Al respecto, algunos autores señalan que la formación de brotes a partir de callo permite rangos de proliferación más rápidos y la variabilidad genética es beneficiosa para especies en peligro, ya que favorece su sobrevivencia y restauración en el medio ambiente natural (STARLING, 1985; RUBLUO *et al.*, 1993).

2.4.4 Activación de yemas axilares. El cultivo *in vitro* de cactus, mediante la activación de yemas axilares es considerado uno de los métodos más exitosos, destacando la estabilidad genética del material producido y la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas (MACHADO y PRIOLI, 1996; MALDA *et al.*, 1999a; PEREZ y DÁVILA, 2002; PEREZ *et al.*, 2002; RUBLUO *et al.*, 2002).

Entre las primeras especies micropropagadas, mediante la activación de areolas se incluyen: *Leuchtenbergia principis* (STARLING, 1985), *Sulcorebutia alba* (DABEKAUSSEN *et al.*, 1991) y *Cereus peruvianus* (MACHADO y PRIOLI, 1996), etc. Más recientemente se pueden mencionar: *Carnegiea gigantea* (Engelm) Britt & Rose, *Pachycereus pringlei* (Berger) Britt & Rose y

Stenocereus thurberi (Engelm) Buxb (PEREZ *et al.*, 2002), *Pelecyphora aselliformis* (PEREZ y DÁVILA, 2002) y *Mammillaria san-angelensis* (RUBLUO *et al.*, 2002), entre otras.

Algunos autores indican que los mejores resultados se han logrado al utilizar ápices de brotes, ya que contienen grandes cantidades de areolas o yemas axilares, las cuales potencialmente darán origen a nuevos brotes (STARLING y DOODS, 1983; MARTINEZ-VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; GIUSTI *et al.*, 2002).

2.4.5 Genotipos raros y con problemas de conservación. Durante los últimos años ha aumentado el interés de los sectores conservacionistas por preservar algunos cactus, cuyas poblaciones han sido mermadas por coleccionistas y debido al crecimiento desmedido de las ciudades (MINOCHA y MEHRA, 1974; MAUSETH, 1977). Así, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha emergido como una herramienta potencial para la propagación de cactus amenazados o en peligro de extinción (PÉREZ y DÁVILA, 2002).

La primera cactácea en peligro micropropagada con gran éxito fue *Leuchtenbergia principis* (STARLING, 1985). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre cultivo *in vitro* de cactus amenazados o en peligro de extinción, se concentran generalmente en especies mexicanas (MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989), tales como: *Mammillaria san - angelensis* (MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; RUBLUO *et al.* 2002), *Obregonia denegrii* Fric y *Coryphantha minima* (MALDA *et al.* 1999ab), *Turbincarpus laui* (MATA *et al.* 2001), *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis* (PÉREZ y DÁVILA, 2002), *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* (GIUSTI *et al.*, 2002), entre otras.

También es importante destacar que esta forma de propagación es útil para la conservación de cactus raros, como lo son los tipos monstruosos, cristados, variegados y pigmentados (sin clorofila). Estos cactus tradicionalmente han sido propagados vegetativamente por injertos (JOHNSON y EMINO, 1979a; LASSOCINSKI, 1985).

STARLING y HUTSON (1984), lograron propagar las especies sin clorofila, *Ariocactus trigonus* (Web.) K. Schum, y *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Por su parte, LASSOCINSKI (1985), propagó otros tres cactus carentes de clorofila, *Gymnocalicium mihanovichii*, *Akersja sp* y *Lobivia sp* y se obtuvo la formación de brotes en la presencia de BAP. A su vez, PAPAFOIOTOU *et al.* (2001) logró la micropropagación de la forma cristada de *Mammillaria elongata*.

2.4.6 Ventajas del cultivo *in vitro* en cactus. Los métodos de propagación convencionales de acuerdo con CLAYTON *et al.* (1990), son inadecuados para la mayoría de las cactáceas, debido a que presentan baja geminación en sus semillas, lento crecimiento y escasa producción de vástagos (ramificaciones). No obstante, el cultivo *in vitro* ofrece alternativas útiles para su multiplicación y conservación, debido a su capacidad para producir muchas plantas a corto plazo y en un espacio mínimo.

Una ventaja adicional es que el desarrollo *in vitro* de cactus puede ser extremadamente rápido en comparación con el cultivo *ex vitro* de estos (MINOCHA y MEHRA, 1974; MALDA *et al.*, 1999a; PEREZ *et al.*, 2002; PEREZ y DÁVILA, 2002). Según MALDA *et al.* (1999a) y PEREZ *et al.* (2002), este mayor crecimiento se debe a la alta humedad, la presencia de reguladores de crecimientos vegetales, y la alta concentración de azúcar en el medio de cultivo. Estas características, de acuerdo con MALDA *et al.* (1999a), pondrían provocar un incremento de la absorción neta de dióxido de carbono (CO₂), la cual esta asociada con la actividad de crecimiento de las plantas desarrolladas *in vitro*.

Otras ventajas están relacionadas con la aclimatación. La aclimatación de las plantas, provenientes del cultivo *in vitro* es crítica, debido a la desproporcionada pérdida de agua durante el trasplante. Es por esto que la succulencia de los cactus resulta ser una ventaja comparativa, ya que la pérdida de agua durante el trasplante no representa un estrés hídrico importante, siendo lenta durante el primer día de acondicionamiento frente al medio ambiente. Además es el cuerpo entero del cactus, el que debe adaptarse gradualmente, hasta alcanzar la completa adaptación (MALDA *et al.*, 1999a).

Por otro lado, existen antecedentes de floración *in vitro*, lo cual representa una ventaja importante para especies en peligro, ya que las investigaciones sobre polinización cruzada *in vitro* se podrían considerar un avance de gran relevancia. En la especie *Coryphantha minima* se logró floración en plantas menores de un año bajo condiciones *in vitro*, en presencia de BAP. Normalmente la floración ocurre en plantas de tres a cuatro años de edad. Mediante este método se puede llegar a obtener un pool de genes silvestres sin la destrucción de poblaciones naturales, lo que permitiría recuperar especies amenazadas o en peligro de extinción, con una diversidad genética adecuada para su restablecimiento en el medio ambiente natural (MALDA *et al.*, 1999a).

2.4.7 Factores que afectan el cultivo *in vitro* en cactus. La micropropagación presenta en general problemas durante el establecimiento *in vitro* de los cultivos y en su posterior propagación clonal, disminuyendo considerablemente en algunos casos las posibilidades de éxito de los ensayos. Entre estos problemas se mencionan: la contaminación, el pardemiento y hiperhidricidad de explantes, entre otros.

En las cactáceas los mayores problemas se han presentado al utilizar cactus cultivados *ex vitro* como plantas madres, debido a los elevados niveles

de contaminación registrados en el cultivo *in vitro*. La hiperhidricidad también a demostrado ser un problema importante, fundamentalmente debido a su metabolismo CAM y a la naturaleza suculenta de sus tejidos (DEBERG y READ, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1995; PÉREZ *et al.*, 2002

2.4.7.1 Contaminación. Existen dos posibles vías de contaminación en el cultivo *in vitro*; por microorganismos endógenos y exógenos presentes en los explantes o por un mal manejo en los procesos en el laboratorio. Durante su crecimiento las plantas están expuestas a microorganismos que pueden contaminarlas a través de aberturas naturales, heridas, vectores o plantas hospederas, etc. De esa forma las plantas desarrollan una flora endofítica consistente en organismos tan diversos como virus y tiroides u organismos procarióticos como bacterias y hongos (CASSELLS, 1991).

En la propagación *in vitro* de cactus los explantes provenientes de plantas silvestres o desarrolladas en invernaderos, presentan serios problemas de contaminación debido a la presencia de patógenos que no pueden ser controlados fácilmente con una desinfección superficial. Además la estructura morfológica de muchas de estas plantas dificulta aún más su desinfección superficial y de esta manera el control de los patógenos exógenos que puedan estar presentes (HAVEL y KOLAR, 1983; JOHNSON y EMINO, 1979a).

2.4.7.2 Oxidación fenólica. Este fenómeno conocido también como pardeamiento ocurre cuando el explante, antes de entrar en contacto con el medio de cultivo es sometido a situaciones de estrés, por ejemplo daño mecánico. Este oscurecimiento o pardeamiento se produce por la liberación de enzimas oxidasas que contienen cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas, que se liberan al herirse los tejidos, lo que inhibe el crecimiento. El daño se manifiesta visualmente por la producción de exudados de color marrón o negro. Este fenómeno ocurre con mayor severidad en plantas con altos

niveles de taninos y otros hidroxifenoles (DEBERG y READ, 1991; GEORGE y SHERRINGTON, 1987; PIERIK, 1990).

En general el pardeamiento, no es un problema frecuente en el cultivo *in vitro* de cactus, el cual puede ser controlado adicionando algunos compuestos como carbón activado, polivinilpirrolidona (PVD), agua o leche de coco, etc. (MINOCHA y MEHRA, 1974; OLIVEIRA *et al.*, 1995; PEREZ *et al.*, 2002).

2.4.7.3 Hiperhidricidad. La hiperhidricidad es un desorden fisiológico, que produce tejidos translúcidos, hiperhidratados y suculentos en algunas especies propagadas *in vitro* (ZIV, 1991).

Este fenómeno es un serio problema para el cultivo *in vitro* de cactus (GIUSTI *et al.* 2002). Aunque la hiperhidricidad no reduce el número de brotes producidos, puede impedir su enraizamiento y sobrevivencia *ex vitro* (PEREZ *et al.*, 2002). Este desorden fisiológico se debe a condiciones propias del cultivo *in vitro*, por ejemplo; alta humedad, exceso de carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores de crecimiento vegetales, y baja intensidad luminosa (ZIV, 1991).

Algunos autores señalan, que este fenómeno puede ser controlarlo aplicando las siguientes medidas: aumentando la concentración del gelificante y/o la sacarosa en el medio de cultivo o reemplazando el uso del “gelrite” por agar, mejorando el intercambio gaseoso en los frascos de cultivo, regulando los niveles de citoquinina, aumentando la intensidad luminosa, cambiando el medio de cultivo o reduciendo la concentración de este. Por otro lado, mencionan a la humedad relativa y el potencial hídrico en los frascos de cultivo como factores importantes en la hiperhidricidad. (SEEMANN, 1993; PÉREZ *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2002; PÉREZ y DÁVILA, 2002).

2.4.7.4 Variabilidad genética: El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es un método de propagación vegetativa en el cual las plantas propagadas con explantes diploides, excepto anteras o microsporas provenientes de material heterocigoto, deberían ser idénticas a la planta madre (DEBERGH y READ, 1991). Sin embargo, existen antecedentes de variación somaclonal entre las plantas propagadas *in vitro*, lo cual será ventajoso o perjudicial dependiendo del objetivo de la investigación (MALDA *et al.* 1999a).

Algunos autores señalan que la variación somaclonal generada *in vitro*, puede ampliar la base genética de las especies, otorgando mayor vigor a las poblaciones naturales de especies en peligro (CONGER, 1981; NOMURA y KOMAMINE, 1999). No obstante, otros autores afirman que la variación somaclonal no es genéticamente estable y los cambios genéticos (o epigenéticos) pueden no responder positivamente como lo hace la variabilidad genética natural de las especies. (MALDA *et al.* 1999a).

Según DEBERGH y READ, (1991), esta variación genética es atribuida en la mayoría de los casos a la inestabilidad cromosomal de las células en los explantes cultivados. Además, es posible que esta esté relacionada con dos factores: la ausencia de meristemas preorganizados en los explantes seleccionados y la presencia del estado de callo antes que la planta sea regenerada. Por lo tanto, es importante la elección de la técnica de propagación, ya sea adventicia (cultivo de callo o embriogénesis somática) o axilar (yemas axilares), o ambas, ya que puede llegar a tener efectos importantes en el desarrollo *in vitro* posterior.

2.4.8 Antecedentes del cultivo *in vitro* de cactus en Chile. En investigaciones recientes realizadas en la Universidad Católica de Chile se propagó el cactus *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (*Cactaceae*), se cultivaron ápices de plántulas provenientes de semillas cultivadas *in vitro* de

cuatro meses de edad, obteniéndose el mayor número de brotes por explante en un medio 100% MS suplementado con 1 – 2 mg/L de BAP, además se constató la formación de callo desde raíces de *E. aurata*, cultivadas en el medio MS basal con 0,1 – 1,0 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA, luego de ocho semanas de cultivo, también se cultivaron areolas de plantas adultas cultivadas *ex vitro*, resultando el 100% de los explantes contaminados (GARCÉS, 2003).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material.

Para el desarrollo de la presente investigación se requirieron diversos materiales e instalaciones que se mencionan a continuación.

3.1.1 Ubicación de los ensayos. La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, ubicado en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral del Chile en Valdivia.

3.1.2 Material vegetal. El material biológico inicial estuvo constituido por nueve especies de la familia *Cactaceae*, las cuales corresponden a *Copiapoa hypogaea*, *Copiapoa chaniaralensis*, *Eriosyce sandillon*, *Loxanthocereus aureispinus*, *Neoporteria napina*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia berteri* (Colla), *Opuntia sp* y *Trichocereus sp*.

3.1.3 Material de laboratorio. El material utilizado consistió en la infraestructura, equipos y utensilios que se encuentran habitualmente en un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, tales como: cámara de incubación, cámara de flujo laminar, placas Petri, pipetas, probetas, bisturí, agitador magnético, frascos de vidrio, pinzas, vasos precipitados, matraces, tijeras, cepillo de cerdas suaves, Hipoclorito de sodio, fungicidas, microondas, dispensador, agua destilada estéril, balanzas, peachímetro, soluciones tampón, reguladores de crecimiento, gelificante y medio basal MURASHIGE y SKOOG (1962) (MS) (Anexo 1).

3.2 Método.

Se describe a continuación la metodología que permitió llevar a cabo la presente investigación.

3.2.1 Descripción del ensayo. Esta tesis constó de nueve ensayos, uno por cada especie. Se utilizó el medio basal MS en todos los ensayos. Estos fueron diseñados para evaluar el efecto de la relación de concentración de dos fitohormonas, una auxina ANA y una citoquinina BAP (Cuadro 2), sobre el cultivo *in vitro* de las nueve especies de la familia de *Cactaceae*.

CUADRO 2 Tratamientos utilizados en los ensayos.

Tratamientos	A	B
Medio basal	MS	MS
Reguladores de crecimiento		
ANA (mg/L)	0,1	0,1
BAP (mg/L)	1,0	2,0

3.2.2 Obtención de explantes. El material biológico inicial correspondió a explantes con una areola que midieron 3 - 10 mm de diámetro y hasta 5 mm de espesor, dependiendo de la especie utilizada. Estos explantes fueron removidos de cactus adultos, cultivados *ex vitro*. Primero se cortaron los ápices de brote de cada especie (tercio superior del tallo) y luego se extrajeron los explantes. En las especies que presentaron espinas grandes, estas debieron ser cortadas con una tijera antes de comenzar la desinfección.

3.2.3 Desinfección. La desinfección de los explantes consistió en primer lugar en el lavado de los ápices de brotes de los cactus madres con agua corriente y luego con detergente. Además con un cepillo de dientes suave, se cepillaron los trozos de cactus, bajo la llave de agua y con la mayor presión posible, dándoles un enjuague final con agua desionizada.

La desinfección posterior se realizó en una cámara de flujo laminar, los ápices de brotes se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 10 segundos, luego fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial (Clorinda), durante 10 minutos, posteriormente permanecieron por 10 minutos en una solución fungicida de 2,7 g/L de Captan y 1,8 g/L de Benlate. Finalmente se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril para remover el fungicida.

3.2.4 Siembra. Una vez finalizada la desinfección se procedió a trozar el material (ápices de brotes), sembrando un explante con una areola por frasco de cultivo. Los explantes fueron trasladados a un medio fresco cada cuatro semanas, luego de iniciado el experimento. Una vez finalizado el experimento, trascurridas veinte semanas de cultivo, los brotes formados fueron trasladados a un medio MS desprovisto de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citoquininas).

3.2.5 Condiciones ambientales. Para el ensayo de propagación *in vitro* las condiciones en la cámara de incubación fueron las siguientes:

La temperatura ambiental fue de 22 °C.

El material se mantuvo con un fotoperíodo de 16 horas.

La intensidad lumínica fue de 2.000 a 4.000 lux.

3.2.6 Variables de evaluación. Al cabo de 4, 8, 12, 16 y 20 semanas de cultivo, se efectuaron las siguientes observaciones, dependiendo del comportamiento de las especies en estudio:

Grado de inducción de callo (escala 1 a 5).

Porcentaje de inducción de callo (%).

Número y longitud de brotes por explante.

Porcentaje de brotación.
Número y longitud de raíces por explante.
Porcentaje de enraizamiento (%).
Porcentaje de sobrevivencia (%).
Grado de pardemiento
Porcentaje de pardeamiento (%).
Porcentaje de hiperhidricidad (%).

El grado de inducción de callo se midió basándose en la siguiente escala de apreciación:

- 1 sin inducción de callo/ explante muerto
- 2 sin inducción de callo / explante vivo
- 3 escasa inducción de callo
- 4 mediana inducción de callo
- 5 abundante inducción de callo

En la evaluación del pardeamiento y la hiperhidricidad se emplearon las siguientes escalas de apreciación:

- 1 sin pardeamiento
 - 2 pardeamiento leve
 - 3 explante oscurecido
 - 4 explante muerto
-
- 1 sin hiperhidricidad
 - 2 con hiperhidricidad

3.2.7 Diseño experimental. El diseño experimental utilizado en los ensayos fue completamente al azar. Cada ensayo tuvo dos tratamientos con 20 repeticiones

correspondientes al medio MS con dos combinaciones de ANA y BAP, donde la fuente de variación fue la concentración de BAP, siendo la unidad experimental un frasco de cultivo con una areola (explante).

3.2.8 Análisis estadístico. El análisis estadístico utilizado se compone de dos tipos: análisis descriptivo y análisis inferencial.

El análisis descriptivo se presentó a través de cuadros y gráficos. Los cuadros contienen el número de observaciones para cada tratamiento, valores mínimos, medios, máximos, varianza, desviación estándar, y coeficiente de variación en porcentaje (%). Los gráficos contienen el promedio según tratamiento.

El análisis estadístico inferencial utilizado consistió en la comparación de las medias entre los dos tratamientos, mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes en las variables cuantitativas, número y longitud de brotes y raíces. Además de la comparación de medianas entre los dos tratamientos gracias al test de análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para las variables cualitativas, grado de inducción de callo, pardeamiento e hiperhidricidad.

Para realizar el análisis de la prueba “t” se comprobaron los supuestos básicos para el análisis de varianza:

- Los tratamientos tienen que distribuirse en forma normal, se aplicó el test de Shapiro-Wilks al 95% de confianza.
- Las varianzas entre los tratamientos deben ser iguales (homogeneidad de varianzas). Se realizó con el Test de Bartlett.

Si al menos un supuesto no se cumplió, se utilizó la transformación $\text{LOG}(x + 1)$, por presentar los mejores valores de ajustes, tanto para normalidad y homogeneidad de varianzas. Si luego de haber realizado las transformaciones respectivas, aún no se cumplieron los supuestos se utilizó el test de Kruskal-Wallis (PAGANO, 1999).

4 RESULTADOS Y DISCUSION

Considerando que las nueve especies en estudio presentaron un comportamiento similar en cuanto a la sobrevivencia (contaminación y mortalidad de explantes), hiperhidricidad y pardeamiento, los resultados relacionados con estas variables se discutirán en conjunto.

4.1 Sobrevivencia.

Los porcentajes de sobrevivencia, mortalidad y contaminación de explantes, del total de explantes sembrados, se indican en el Cuadro 3, para las nueve especies en estudio.

En términos generales el nivel de sobrevivencia en las especies se vió influenciado principalmente por la muerte de explantes y en menor medida a la contaminación fungosa y bacterial. Los niveles de contaminación fueron reducidos en todas las especies en estudio, con un rango de 0 – 30 % en ambos tratamientos, considerando que ocho de los cactus en estudio son cultivados *ex vitro*, siendo los principales contaminantes hongos y bacterias.

En *Copiapoa chaniaralensis*, *Eriosyce sandillon*, *Loxanthocereus aurispinus* y *Neoporteria napina* la mortalidad de explantes fue muy elevada, no presentaron explantes sobrevivientes transcurridas entre ocho a doce semanas de cultivo. Los explantes de *C. chaniaralensis* y *E. sandillon* comenzaron a necrosarse a partir de la 5ª semana de cultivo; en *L. ariepinus*, la necrosis comenzó pasadas las primeras ocho semanas; en *N. napina* esta se inició a partir de la 4ª semana de cultivo en el tratamiento A. Los explantes fueron perdiendo paulatinamente su coloración verde, tornándose finalmente de un color café claro, con sectores blanquecinos.

CUADRO 3 Porcentajes de sobrevivencia, mortalidad y contaminación en los ensayos.

Especies	Tratamiento A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semanas					Semanas				
	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
<i>Copiapoa chaniaralensis</i>										
Sobrevivencia	100	0	0	0	0	95	0	0	0	0
Contaminación	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0
Mortalidad	0	100	0	0	0	0	95	0	0	0
<i>Copiapoa hypogaea</i>										
Sobrevivencia	85	85	85	55	55	80	80	80	65	50
Contaminación	15	15	15	15	15	20	20	20	20	20
Mortalidad	0	0	0	30	30	0	0	0	15	30
<i>Eriosyce sandillon</i>										
Sobrevivencia	100	55	0	0	0	100	55	0	0	0
Contaminación	0	0	0	0	0	0	30	30	0	0
Mortalidad	0	45	100	0	0	0	15	70	0	0
<i>Loxanthocereus aureispinus</i>										
Sobrevivencia	70	70	0	0	0	75	75	0	0	0
Contaminación	30	30	30	0	0	25	25	25	0	0
Mortalidad	0	0	70	0	0	0	0	75	0	0
<i>Neoporteria napina</i>										
Sobrevivencia	90	45	0	0	0	95	25	0	0	0
Contaminación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidad	10	55	0	0	0	5	75	0	0	0

Continuación Cuadro 3

Especies	Tratamiento A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semanas					Semanas				
<i>Mammillaria elongata</i>	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
Sobrevivencia	95	70	70.0	70	70	90	60	60	60	60
Contaminación	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10
Mortalidad	0	25	25	25	25	0	30	30	30	30
<i>Opuntia berteri</i>										
Sobrevivencia	95	85	85	85	85	90	80	75	75	75
Contaminación	5	10	10	10	10	0	10	10	10	10
Mortalidad	0	5	5	5	5	10	10	15	15	15
<i>Opuntia sp</i>										
Sobrevivencia				75	75				10	10
Contaminación				0	0				0	0
Mortalidad				25	25				90	90
<i>Trichocereus sp</i>										
Sobrevivencia	95	60	60	60	60	95	75	75	75	75
Contaminación	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mortalidad	0	35	35	35	35	0	20	20	20	20

(1) Tratamiento A: MS: 0,1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP.

(2) Tratamiento B: MS: 0,1 mg/L ANA+ 2 mg/L BAP.

En *Opuntia sp.* la sobrevivencia en el tratamiento B fue muy baja (10%), debido a la alta mortalidad de explantes, los cuales comenzaron a necrosarse y murieron antes de la 4ª semana de iniciado el ensayo, mientras que en el tratamiento A se alcanzó un 70% de sobrevivencia. Respecto a las demás especies, *Copiapoa hypogaea*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia berteri* y *Trichocereus sp.*, al finalizar las veinte semanas de evaluación presentaron según el Cuadro 3 al menos un 50% de sobrevivencia en ambos tratamientos, observándose en *Opuntia berteri* la mayor sobrevivencia con un 85% en el tratamiento A.

Así, la mortalidad en estas especies fue escasa a moderada, fluctuando entre un 5 - 35%. Los explantes de *C. hypogaea* y *M. elongata* comenzaron a necrosarse gradualmente a partir de la 12ª semana de cultivo, mientras que en *Trichocereus sp.* y *O. berteri* la necrosis comenzó entre la 2ª y la 4ª semana de iniciados los ensayos. Los explantes muertos presentaron una coloración café clara y zonas blanquecinas en parte del tejido.

En los ensayos realizados por OLIVEIRA *et al.* (1995), en la especie *Cereus peruvianus*, se observaron resultados similares, donde los explantes incubados en algunos de los tratamientos utilizados también murieron al final de la 8ª semana de cultivo, obteniendo mayor mortalidad en los explantes provenientes de cactus adultos cultivados en invernaderos. Al igual que en los ensayos de HAVEL y KOLAR (1983), en *Gymnocactus viereckii* (Werd.) Backbg. y *Echinopsis tubiflora* (Pfeiff.) Zucc donde parte de los explantes comenzaron a presentar tejido necrótico, el cual aumento gradualmente, hasta causar la muerte de la totalidad de los explantes.

Existen antecedentes en *Neomammillaria prolifera* donde los explantes no fueron capaces de desarrollar morfogénesis en ausencia de 2,4 – D y en presencia de ANA, por lo tanto algunos autores concedieran que la

concentración y el tipo de fitohormonas puede ser específico para cada especie (MINOCHA y MEHRA, 1974). A su vez en los experimentos desarrollados por CLAYTON *et al.* (1990), las especies *Pediocactus knowltonii*, *Pediocactus bradyi* y *Sclerocactus spinosior* (Engelm.) Woodruff & L. Benson, discriminaron el tipo de fitohormonas, donde *P. knowltonii* respondió positivamente frente a ANA, *S. spinosior* frente a AIA y *P. bradyi* sólo respondió frente a BAP.

Respecto a la contaminación, en las especies *C. chaniaralensis* y *Trichocereus sp.* solo se llegó a un 5%, en *M. elongata* y *O. berteri* un 10%, *C. hypogaeae* un 20%, siendo las especies que presentaron mayor contaminación *E. sandillon* y *L. aurispinus* con 30%, mientras que *N. napina* no presentó explantes contaminados. Además en *Opuntia sp* no hubo contaminación bacteriana o fúngica, debido principalmente a que los explantes utilizados provinieron de plantas cultivadas *in vitro*, lo cual asegura un material vegetal, libre de patógenos endógenos y exógenos (CLAYTON *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995; PÉREZ *et al.*, 1998; PÉREZ y DÁVILA, 2002).

Estos resultados se contraponen a los obtenidos en general, al utilizar cactus silvestres adultos o cultivados en invernaderos como fuente de explantes en el cultivo *in vitro*, ya que se presentan niveles de contaminación superiores al 60% (OLIVEIRA *et al.*, 1995; PEREZ *et al.*, 1998). Incluso hay registro de pérdida total de explantes, como por ejemplo, en la especie *Copiapoa tenuísima* Ritt. (HAVEL y KOLAR, 1983) y *Eriocyce aurata* (GARCÉS, 2003).

Por su parte, JOHNSON y EMINO (1979b), señalan que el principal problema en el cultivo *in vitro* de *M. elongata* fue el elevado nivel de contaminación obtenido al utilizar cactus cultivados *ex vitro*, donde la presencia de contaminación endógena y exógena, es difícil de controlar mediante una esterilización superficial tradicional.

Según HAVEL y KOLAR (1983), esto se debe principalmente a la estructura morfológica de algunos cactus. Esta dificulta la extracción de explantes y su esterilización superficial. Al respecto, GARCÉS (2003) señala que la abundante presencia de lanosidad compactada (tricomas) en las areolas sirve de refugio para diversas estructuras de resistencia de algunos hongos. Por lo tanto, una buena técnica de esterilización del material vegetal es fundamental para obtener porcentajes relativamente bajos de contaminación. Por otro lado, la presencia de patógenos endógenos en muchos de los cactus silvestres o desarrollados en invernaderos, explicarían las pérdidas masivas de explantes en otras investigaciones (JOHNSON y EMINO, 1979b).

Sin embargo, existen antecedentes de bajos niveles de contaminación en los ensayos realizados por HAVEL y KOLAR (1983), en las especies *Astrophytum myriostigma* Lem, (T.), *Aylostera pseudodeminuta* (Backbg.) Backbg, y *Pediocactus knowltonii* L. Bens., entre otras, cuyos niveles de contaminación fueron 0%, 10% y 30%, respectivamente. Estos resultados fueron atribuidos a la adecuada esterilización de los explantes, y los bajos niveles de infecciones endógenas presentes en algunos de los ejemplares utilizados, considerando su origen *ex vitro*.

Es así como los resultados obtenidos en la presente investigación pueden ser atribuidos a dos factores; en primer lugar a la adecuada desinfección del material vegetal descrita en el capítulo 3 (Material y Método) y en segundo lugar, al bajo nivel de patógenos endógenos y exógenos presentes en los ejemplares utilizados como plantas madres (JOHNSON y EMINO, 1979b).

4.2 Hiperhidricidad.

Respecto a esta variable, en el Cuadro 4 se muestran los porcentajes de hiperhidricidad del total de explantes vivos, alcanzados durante todo el período de cultivo, para las nueve especies en estudio.

Según algunos autores la hiperhidricidad es un problema asociado a la producción de yemas suculentas y translucidas (SEEMANN, 1993 y GIUSTI *et al.*, 2002). De acuerdo con ZIV (1991), este desorden fisiológico se produce por exceso de carbohidratos y minerales, además de altos niveles de reguladores de crecimiento vegetal y la baja intensidad lumínica en el cultivo *in vitro*, siendo según PÉREZ y DÁVILA (2002) un serio problema en el cultivo *in vitro* de cactus.

Este desorden fisiológico no representó un problema en los explantes incubados de *C. chaniaralensis*, *E. sandillon* y *L. aurispinus*, considerando que en estas especies no hubo morfogénesis frente a los dos tratamientos utilizados. Sin embargo, en las especies *C. hypogaeae*, *M. elongata*, *O. berteri* y *Trichocereus sp.* se observó hiperhidricidad en al menos uno de los dos tratamientos, a partir de la 8ª semana de cultivo, constatándose explantes con tejidos traslúcidos y suculentos (hiperhidratado) (Figura 7). Por otro lado, en *Opuntia sp.* se observó un leve hinchamiento de los explantes al finalizar la 4ª semana de cultivo en el 40,6% de los explantes cultivados en el tratamiento A, los del tratamiento B no sobrevivieron en el tiempo.

En las especies *C. hypogaeae*, *O. berteri* y *Trichocereus sp.*, el mayor porcentaje de hiperhidricidad se presentó en la 12ª semana de cultivo y en *M. Elongata* la mayor incidencia de explantes hiperhidratados se constató trascurridas ocho semanas de cultivo, para ambos tratamientos. Por lo tanto, el análisis estadístico se realizó para estos períodos. Así, mediante el test de Kruskal Wallis (Anexos 2, 3, 4 y 5), no se constató diferencia estadística entre

los tratamientos en ninguna de estas cuatro especies. Se concluye que los explantes en estos ensayos sembrados en el medio MS con 0,1 mg/L de ANA y 1 ó 2 mg/L de BAP, presentaron niveles de hiperhidricidad similares.

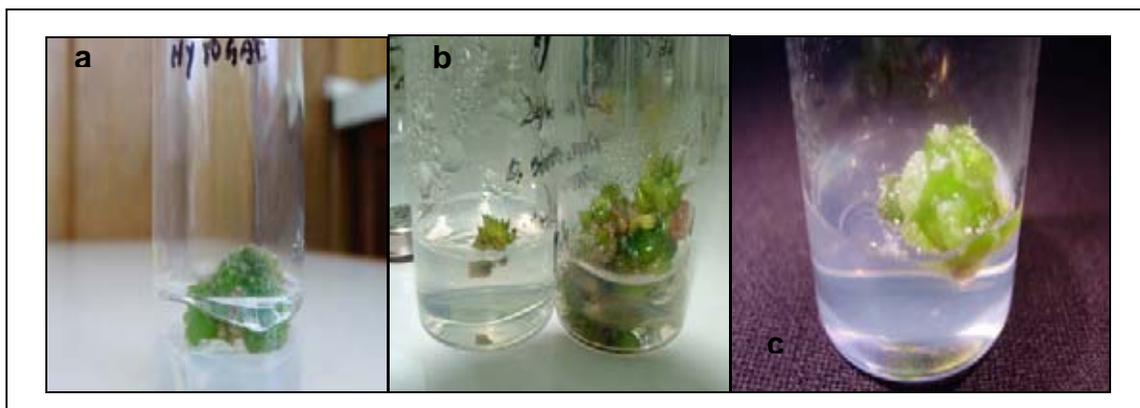


FIGURA 7 Hiperhidricidad en brotes de *Copiapoa hypogaea* (a), *Opuntia berteri* (b) y *Trichocereus sp.* (c). (Explante cultivado en el tratamiento B, en la 8^a semana de cultivo (a); explante cultivado en el tratamiento A, en la 4^a semana de cultivo (b); explante cultivado en el tratamiento B, en la 12^a semana de cultivo (c)).

En *C. hypogaea* más del 80% de los explantes vivos presentaron algún grado hiperhidricidad en ambos tratamientos, en *O. berteri* hasta un 76,5% en el tratamientos A; en *Trichocereus sp.*, ambos tratamientos presentaron más de un 90% de explantes suculentos con apariencia vítrea y en *M. elongata* se llegó a un 100% de explantes vitrificados en el tratamientos A. Principalmente entre la 8^a y 12^a semana de evaluación, disminuyendo los porcentajes de hiperhidricidad al finalizar los ensayos. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por GIUSTI *et al.*, (2002), donde los tres cactus estudiados, *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis*, presentaron más del 60% de brotes vitrificados.

CUADRO 4 Porcentajes de hiperhidricidad de las nueve especies en estudio.

Especies	Tratamientos A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semana					Semana				
	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
<i>Copiapoa chaniaralensis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Copiapoa hypogaea</i>	0,0	0,0	82,4	36,4	0,0	0,0	62,5	81,3	38,5	0,0
<i>Eriosyce sandillon</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Loxanthocereus aureispinus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Neoporteria napina</i>	55,6	55,6	0,0	0,0	0,0	47,0	80,0	0,0	0,0	0,0
<i>Mammillaria elongata</i>	0,0	92,9	50,0	21,4	7,1	0,0	100,0	75,0	33,3	25,0
<i>Opuntia berteri</i>	0,0	0,0	76,5	41,2	0,0	6,3	6,3	60,0	46,7	6,3
<i>Opuntia sp</i>				46,7	6,7				0,0	0,0
<i>Trichocereus sp</i>	0,0	33,3	91,7	41,7	33,3	0,0	26,7	100,0	33,3	26,7

(1) Tratamiento A: MS, 0,1 mg/L ANA + 1 mg/L BAP

(2) Tratamiento B: MS, 0,1 mg/L ANA + 2 mg/L BAP

En *N. napina* se observó un leve hinchamiento de los explantes, a partir de la 3ª semana de cultivo aproximadamente. Es así como, más del 50% de los explantes en ambos tratamientos presentaron algún grado de hiperhidricidad al terminar la 8ª semana de cultivo. Finalmente los explantes se tornaron de un color verde amarillento con un aspecto translucido. Considerando que el mayor porcentaje de hiperhidricidad ocurrió trascurridas ocho semanas de cultivo, los datos se analizaron para ese período de evaluación. Es así como, el test de Kruskal Wallis efectuado (Anexo 6), no indicó diferencias estadísticas entre los tratamientos A y B. En el presente ensayo no fue necesario controlar la hiperhidricidad, ya que los explantes, transcurrida la novena semana de cultivo murieron.

Al respecto, algunos autores señalan que los brotes inducidos en un medio con BAP, son generalmente de apariencia normal, como por ejemplo los brotes de *M. pectinifera* (GIUSTI *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2002). Sin embargo, PASQUAL y HOSHIKA (1992), atribuye la alta hiperhidricidad a las elevadas concentraciones de BAP, ya que obtuvo un 60% de brotes vitrificados en *Gymnocalicium buldiamur*, cuando la concentración de BAP fue igual o superior a 2 mg/L, y *Mammillaria bocasana* presentó menores porcentajes de hiperhidricidad y con la ausencia de BAP, los valores fueron insignificantes

Este problema que puede ser disminuido en la práctica mediante varios métodos, uno de las cuales consiste en aumentar la concentración del agar y/o la sacarosa en el medio de cultivo o reemplazar el uso del gelificante gelrite por agar (PEREZ *et al.*, 2002; SEEMANN, 1993). Con el fin de eliminar la hiperhidricidad que presentaban los explantes de algunas de las especies en estudio, se procedió a aumentar la concentración del gelificante de 2 a 5 g/L y reemplazar el gelrite en su totalidad por agar, obteniendo con esto excelentes resultados, ya que así se logró disminuir gradualmente el porcentaje de brotes translúcidos y suculentos hasta finalizar los ensayos como se señala en el

Cuadro 4, observándose solo explantes levemente hiperhidratados (SEEMANN, 1993; GIUSTI *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2002).

4.3 Pardeamiento.

En el Cuadro 5, se muestran los porcentajes de pardeamiento, respecto del total de explantes vivos sin contaminación, para las nueve especies en estudio según el grado de pardeamiento observado.

Según GEORGE y SHERRINGTON (1984), el pardeamiento se produce por la liberación de enzimas oxidasas que contienen cobre, por ejemplo polifenoloxidasas, las cuales pueden inhibir el crecimiento en los explantes recién incubados y el tejido muere inevitablemente, debido a la oxidación de compuestos fenólicos y la posterior formación de compuestos quinónicos, altamente activos (PIERIK, 1990; DEBERG y READ, 1991).

En estos ensayos el pardeamiento u oxidación fenólica no significó un problema, sólo se constató un pardeamiento leve en ambos tratamientos, por lo tanto, no se observó la producción de pequeñas o grandes cantidades de exudados de color marrón o negro hacia el medio de cultivo, sólo se produjo un halo de color café alrededor de la base de los explantes. Este leve pardeamiento se controló con la remoción de los compuestos fenólicos producidos, al trasladar periódicamente los explantes a un medio fresco cada cuatro semanas.

Considerando que en los ensayos realizados con *C. chaniaralensis*, *E. sandillon*, *L. aurispinus* y *N. napina* no hubo respuesta en los explantes y el pardeamiento no significó un problema, no se efectuó un análisis estadístico para esta variable. Según el Cuadro 5 en estas especies se observaron entre 21,4 - 91% de explantes pardeados al finalizar la 8ª semana de evaluación.

CUADRO 5 Porcentajes de pardeamiento en las nueve especies en estudio.

Especies	Tratamiento A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semana de cultivo					Semana de cultivo				
	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
<i>Copiapoa chaniaralensis</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 pardemiento leve	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Copiapoa hypogaea</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	100,0	64,7	0,0	0,0	0,0	100,0	37,5	18,7	61,5	61,5
2 pardemiento leve	0,0	35,3	0,0	0,0	0,0	0,0	62,5	81,3	38,5	38,5
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	0,0	35,3	0,0	0,0	0,0	0,0	62,5	81,3	38,5	38,5
<i>Eriogyne sandillon</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	9,0	64,0	0,0	0,0	0,0	9,0	64,0	0,0	0,0	0,0
2 pardemiento leve	91,0	36,0	0,0	0,0	0,0-	91,0	36,0	0,0	0,0	0,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	91,0	36,0	0,0	0,0	0,0-	91,0	36,0	0,0	0,0	0,0

Continuación Cuadro 5.

Especies	Tratamiento A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semana de cultivo					Semana de cultivo				
	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
<i>Loxanthocereus aureispinus</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	100,0	78,6	0,0	0,0	0,0	100,0	60,0	0,0	0,0	0,0
2 pardemiento leve	0,0	21,4	0,0	0,0	0,0-	0,00	40,0	0,0	0,0	0,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	0,00	21,4	0,00	0,0	0,0-	0,00	40,0	0,0	0,0	0,0
<i>Neoporteria napina</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	95,0	44,4	0,0	0,0	0,0	89,0	60,0	0,0	0,0	0,0
2 pardemiento leve	5,0	55,6	0,0	0,0	0,0	11,0	40,0	0,0	0,0	0,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	5,0	55,6	0,0	0,0	0,0	11,0	40,0	0,0	0,0	0,0
<i>Mammillaria elongata</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	73,7	85,7	85,7	85,7	85,7	44,4	66,7	75,0	75,0	75,0
2 pardemiento leve	26,3	14,3	14,3	14,3	14,3	55,6	33,3	25,0	25,0	25,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	26,3	14,3	14,3	14,3	14,3	55,6	33,3	25,0	25,0	25,0

Continuación Cuadro 5.

Especies	Tratamiento A ⁽¹⁾					Tratamiento B ⁽²⁾				
	Semana de cultivo					Semana de cultivo				
	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
<i>Opuntia berteri</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	77,8	77,8	77,8	77,8	77,8	72,2	72,2	72,2	72,2	72,2
2 pardemiento leve	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
<i>Opuntia sp</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo				60,0	72,3				0,0	0,0
2 pardemiento leve				40,0	27,7				0,0	0,0
3 pardemientp medio/ explante oscurecido				0,0	0,0				0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto				0,0	0,0				0,0	0,0
Total grado de pardemiento				40,0	27,7				0,0	0,0
<i>Trichocereus sp</i>										
1 sin pardeamiento/ explante vivo	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3
2 pardemiento leve	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	26,7	26,7	26,7	26,7	26,7
3 pardemientp medio/ explante oscurecido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 pardeamiento intenso/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total grado de pardemiento	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3	26,7	26,7	26,7	26,7	26,7

(1) Tratamiento A: MS, 0,1 mg/L ANA + 1 mg/L BAP

(2) Tratamiento B: MS, 0,1 mg/L ANA + 2 mg/L BAP

En *Opuntia sp.* esta variable tampoco constituyó un problema, el 40% de los explantes cultivados en el tratamiento A, sólo presentaron un leve pardeamiento en la base del explante (superficie herida). Los dos explantes sobrevivientes del tratamiento B, no presentaron pardeamiento.

De igual manera se comportaron los explantes de las especies, *M. elongata*, *O. berterii* y *Trichocereus sp.*, por ende no se justificó un análisis estadístico para esta variable. Al finalizar la 8ª semana de cultivo estas especies presentaron entre un 14,3 – 62,5% de pardeamiento; sin embargo, al finalizar los ensayos el porcentaje de explantes pardeados disminuyó flutuando entre un 0 – 38,5%.



FIGURA 8. Pardeamiento en explantes de *Copiapoa hypogaea*. (Explante cultivado sobre el tratamiento A, en la 8ª semana de cultivo).

Estos resultados son similares a los obtenidos por PÉREZ *et al.* (2002), donde solamente se constató un leve pardeamiento, debido a la oxidación de compuestos fenólicos en las áreas de corte del explante, señalando que los bajos niveles de pardeamiento no afectan la inducción de callo y la producción de brotes en las especies micropropagadas.

4.4 *Copiapoa chaniaralensis* y *Erioseyca sandillon*.

En estos ensayos, los explantes utilizados de *C. chaniaralensis* y *E. sandillon* midieron al menos 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor y fueron extraídos de ejemplares de cinco años de edad o más, cultivados *ex vitro* (Figura 9).

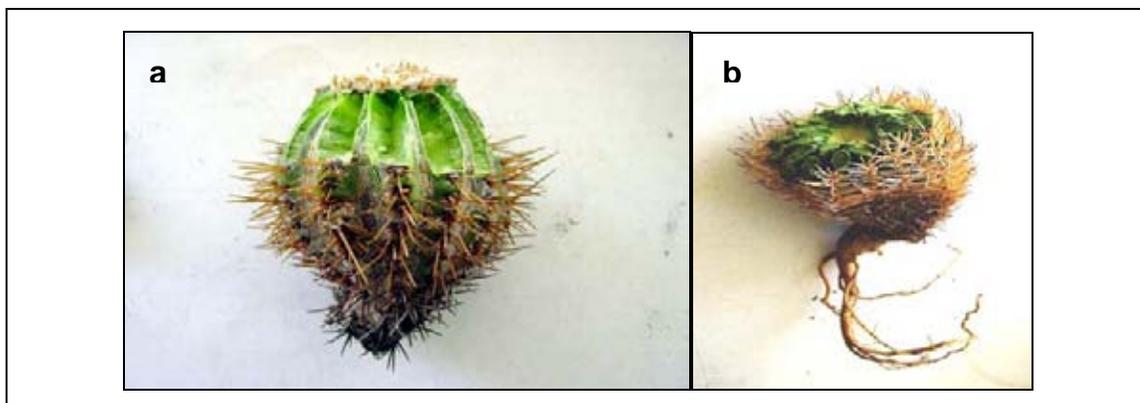


FIGURA 9 Ejemplares de *Copiapoa chaniaralensis* (a) y *Erioseyca sandillon* (b) (Especies de más de cinco años de edad utilizados en los ensayos).

Los resultados obtenidos en ambas especies fueron insatisfactorios, ya que no hubo respuesta a la inducción de callo, formación de brotes y raíces (Figura 10), para ninguno de los tratamientos. Sólo fue posible observar explantes vivos y muertos. Por ende no se justifica el desarrollo de un análisis estadístico.

Sólo en *C. chaniaralensis* a finales de la 4^a semana de incubación se observó una leve respuesta en el 5% de los explantes incubados en el medio MS con la combinación hormonal de 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP (tratamiento B); en cambio, en *E. sandillon* sólo se observaron explantes vivos sin inducción de callo hasta la 8^a semana de evaluación. Esto verifica en *C. chaniaralensis* una escasa formación de callo compacto y un leve aumento de

tamaño. A pesar de esto, no hubo desarrollo posterior de brotes y raíces, ya sea por organogénesis indirecta, a través del callo, ó bien organogénesis directa, mediante la activación de la areola (Figura 11).

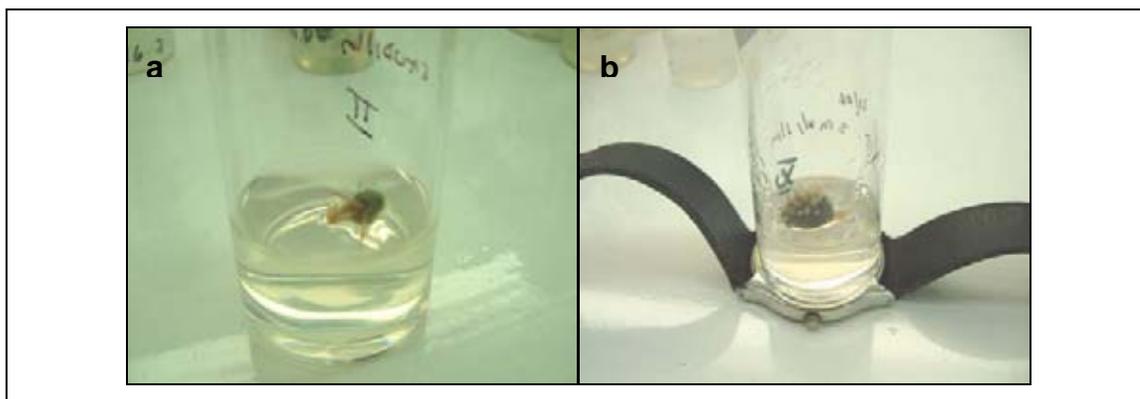


FIGURA 10 Areolas de *Copiapoa chaniaralensis* (a), y *Eriosyce sandillon* (b) (Areolas sin inducción de callo al finalizar la 4ª semana de postsiembra)

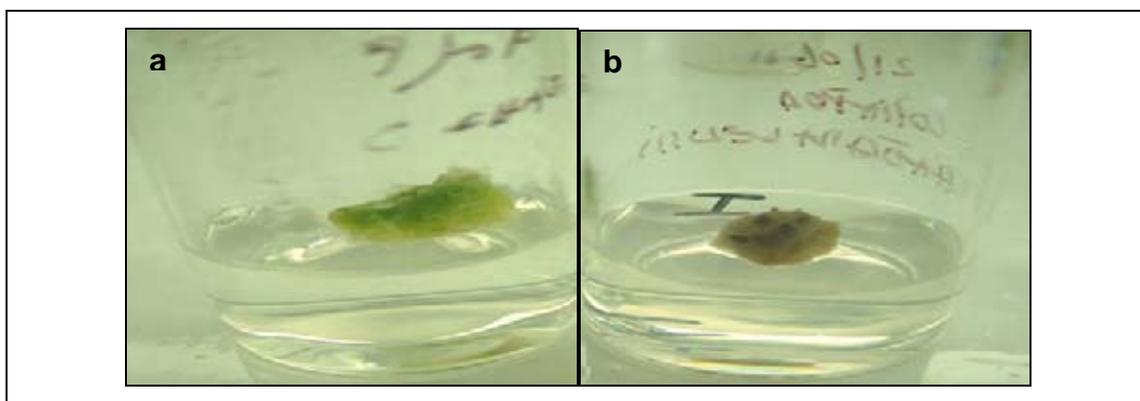


FIGURA 11 Inducción de callo en areolas de *Copiapoa chaniaralensis*. (Explante cultivado en el tratamiento B, transcurridas cuatro semanas de incubación (a); explante muerto, pasadas ocho semanas de postsiembra (b)).

OLIVEIRA *et al.* (1995), en *Cereus peruvianus*, constató resultados similares, al utilizar segmentos de brotes de plantas adultas como explantes. Intentó inducir callo pero este creció muy lento y no se regeneró en ninguna de las combinaciones hormonales probadas. El tipo de callo observado fue compacto y de color verde oscuro. Estos resultados fueron atribuidos a la combinación hormonal y al origen del explante.

Al respecto, CLAYTON *et al.* (1990) señala que el tejido inmaduro tiene mayor potencial organogénico. Es así como, en otros trabajos los mejores resultados se han obtenido al utilizar plántulas juveniles cultivadas *ex vitro*, de uno a tres años de edad (PÉREZ *et al.*, 1998; PAPAFOU *et al.*, 2001). Por ello, el utilizar cactus de más de cinco años de edad y cultivados *ex vitro*, podría ser una de las razones del fracaso de la inducción de callo, brotes y raíces en los explantes de *C. chaniaralensis* y *E. sandillon*.

4.5 *Loxanthocereus aureispinus* y *Neoporteria napina*.

En estos trabajos de investigación se utilizaron ejemplares de *L. aureispinus* y *N. napina* de dos a tres años de edad, cultivados *ex vitro* (Figura 12). Respecto a los explantes, midieron de 3 a 5 mm de diámetro y unos 3 mm de espesor.

Los explantes de *L. aureispinus* (Figura 12) presentaron una alta mortalidad al finalizar la 12^a semana de cultivo. De esta manera, sólo fue posible observar explantes vivos y muertos en los tratamientos A y B. Por lo tanto, no se constataron resultados satisfactorios en las variables, inducción de callo, brotación y rizogénesis. Por ello, no se justifica la realización de un análisis estadístico.

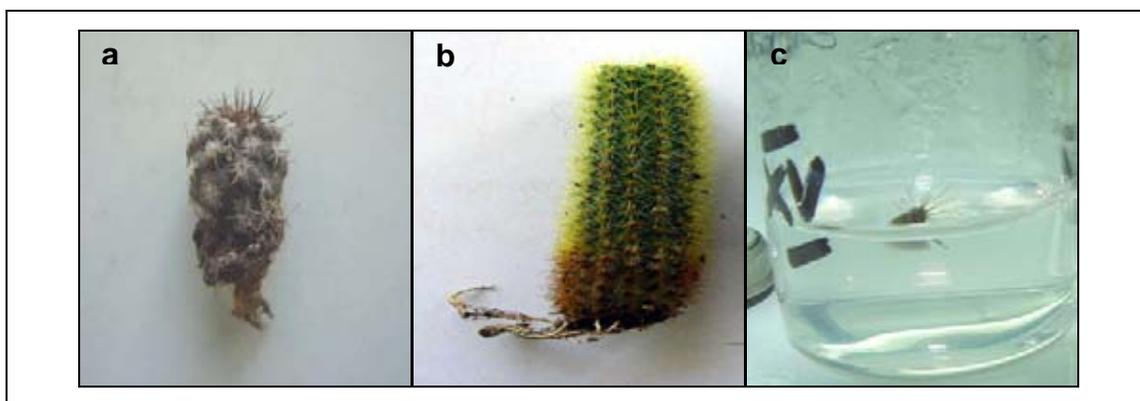


FIGURA 12 Ejemplares de *Loxanthocereus aureispinus* (a) y *Neoporteria napina* (b); areola de *Loxanthocereus aureispinus* (c). (Ejemplares de 2 a 3 años de edad utilizados en los ensayos a la 8ª semana de cultivo (a y b); explante cultivado en el tratamiento B (c)).

Respecto a *N. napina* se observó principalmente una escasa inducción de callo a partir de la 4ª semana de cultivo. Como se muestra en el Cuadro 6, el 63,2% y el 75% de los explantes vivos muestran algún grado de inducción de callo en los tratamientos A y B respectivamente. Sin embargo, el tejido calloso no prosperó en el tiempo, de esta manera pasadas nueve semanas de cultivo, se constató la muerte de todos los explantes, por ende no hubo resultados satisfactorios en cuanto a la formación de brotes y raíces. Considerando que la mejor respuesta a la inducción de callo y sobrevivencia de explantes se observó al finalizar la 4ª semana de cultivo, el análisis estadístico se realizó para ese período.

El test de Kruskal Wallis (Anexo 7), no constató diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, se concluye que los explantes de *N. napina* sembrados en el medio MS con 0,1 mg/L de ANA y 1,0 ó 2,0 mg/L de BAP, presentan algún grado de inducción de callo durante las primeras cuatro semanas de cultivo, por ende la mediana para ambos tratamientos es

igual y significa que los explantes están vivos y presentan una escasa inducción de callo (grado 3).

CUADRO 6 Porcentaje de inducción de callo en la especie *Neoporteria napina*, durante el período de cultivo.

Porcentajes de inducción de callo (%)					
Tratamientos		A		B	
Escala		Semana		Semana	
		4 ^a	8 ^a	4 ^a	8 ^a
1	Sin callo/explante muerto	5,3	35,7	5,0	28,6
2	Sin callo/explante vivo	31,6	14,3	20,0	14,3
3	Escasa inducción de callo	63,2	42,9	65,0	42,9
4	Moderada inducción de callo	0,0	0,0	10,0	14,3
5	Abundante inducción de callo	0,0	7,10	0,0	0,0
Total inducción de callo		63,2	50,0	75,0	57,2

Respecto al callo observado en los explantes, este fue del tipo friable y de color verde claro (Figura 13). Resultados similares obtuvieron MINOCHA y MEHRA (1974) en la especie *Neomammillaria prolifera*, en cuyos explantes observaron un escaso crecimiento en el medio MS suplementado con 10 – 20 mg/L 2,4 –D y 1 – 2 mg/L KIN, obteniéndose un callo friable (disgregado) y verde, sin embargo no se logró inducir diferenciación de brotes y raíces.

Algunos autores mencionan la importancia de la combinación hormonal utilizada, la edad de la planta madre y el origen del explante (*in vitro* o *ex vitro*) sobre la morfogénesis *in vitro* de cactus (CLAYTON *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995). Por lo tanto, los resultados obtenidos en *L. aureispinus* y *N. napina*, podrían ser atribuidos a que la combinación y concentración hormonal no fue la adecuada para estimular la morfogénesis *in vitro* de los explantes

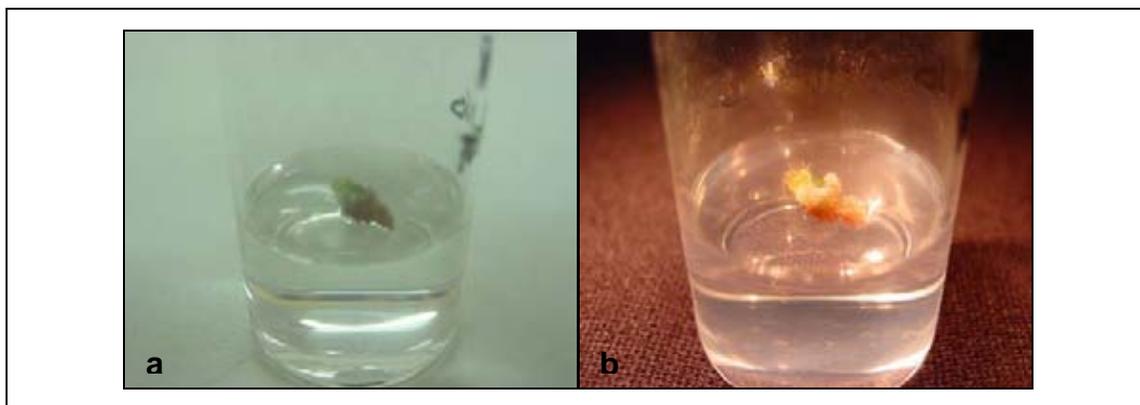


FIGURA 13. Inducción de callo en la especie *Neopteris napina*, a partir de la 4ª semana de cultivo. ((a) explante sembrado en el tratamiento A y (b) explante sembrado en el tratamiento B).

Por otro lado, es importante destacar la influencia del tamaño del explante utilizado en este proceso de propagación (DABENKAUSSEN *et al.*, 1991; BHAU, 1999). Lo que pudo haber incidido en los resultados, considerando que se se utilizaron explantes pequeños con una areola apical. Al respecto, DABENKAUSSEN *et al.* (1991), señala que al utilizar explantes de mayor tamaño, con al menos tres areolas, se obtienen mejores resultados, en cuanto a la inducción de callo y brotes. Por su parte BHAU (1999), obtuvo la máxima inducción de callo sobre explantes de raíz de 10 mm de largo, en contraste, la inducción de callo y brotes decreció al utilizar explantes que medían menos de 5 mm o más de 15 mm de largo.

4.6 *Copiapoa hypogaea*.

En el ensayo, se utilizaron explantes de 3 - 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor aproximadamente, los cuales fueron extraídos de un cactus cultivado *ex vitro* de unos dos a tres años de edad (Figura 14). A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para la especie *Copiapoa hypogaea*.

4.6.1 Inducción de callo. En este caso, se verifican resultados satisfactorios, a partir de la 5ª semana de cultivo, para ambos tratamientos. Se observó un callo friable de color verde claro y sectores blanquecinos. Por otro lado, en el tratamiento A se inició el crecimiento del callo sobre toda la superficie del explante (Figura 14), mientras que en el tratamiento B, sólo se observaron pequeñas almohadillas de callo friable, en parte de la superficie del explante.

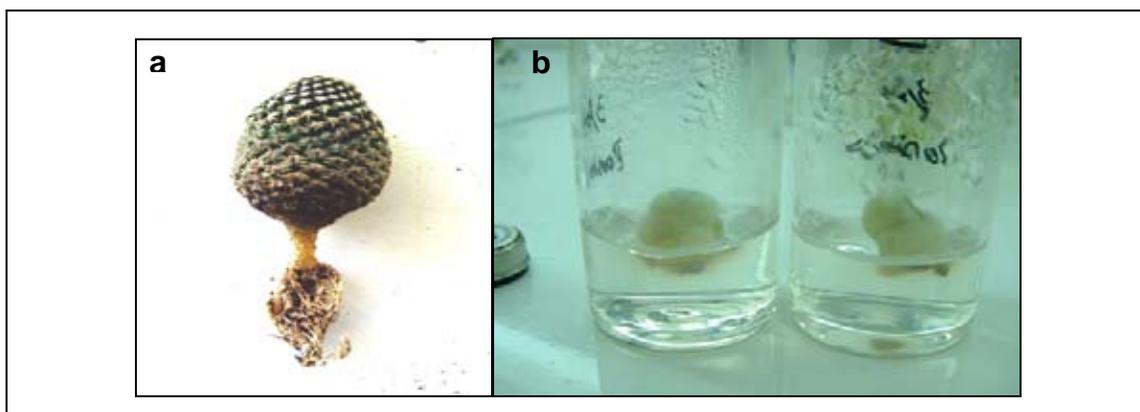


FIGURA 14 Ejemplar de *Copiapoa hypogaea* (a), de dos a tres años de edad utilizado en el ensayo y callo inducido en explantes cultivados *in vitro* (b). (Explantes cultivados en el tratamiento A transcurridas ocho semanas de cultivo (b)).

En el Cuadro 7, se señalan los porcentajes de inducción de callo considerando los explantes sobrevivientes. Al finalizar la 8ª semana de cultivo el 94% y 31% de los explantes sembrados en los tratamientos A y B, respectivamente, presentan algún grado de inducción de callo. A partir de la 12ª semana, los resultados se estabilizan en 100% para el tratamiento A y el 31% en el tratamiento B, lo cual se mantiene hasta el final del ensayo. Por ello, la inducción de callo se analizó para ese período.

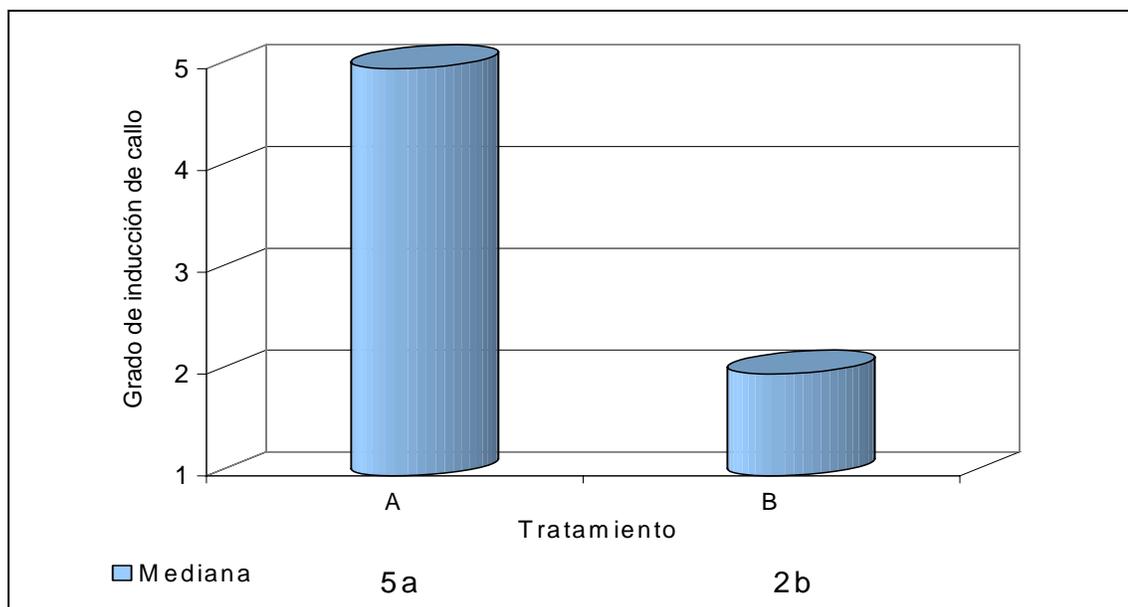
El test de Kruskal Wallis (Anexo 8), constató una diferencia estadística significativa, en cuanto a la inducción de callo, en respuesta a los tratamientos

A y B. Así, la máxima inducción de callo ocurrió en respuesta al medio MS con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP (tratamiento A). La representación gráfica de este resultado se muestra en la Figura 15.

CUADRO 7 Porcentaje de inducción de callo *Copiapoa hypogaea*, a lo largo del periodo de cultivo *in vitro*.

Porcentaje de inducción de callo (%)						
Tratamientos		Semanas				
A		4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
1	Sin callo/explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	Sin callo/explante vivo	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0
3	Escasa inducción de callo	0,0	70,6	0,0	0,0	0,0
4	Moderada inducción de callo	0,0	11,8	23,5	0,0	0,0
5	Abundante inducción de callo	0,0	11,8	76,5	100,0	100,0
Inducción de callo total		0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
B						
1	Sin callo/explante muerto	0,0	0,0	0,0	18,8	31,3
2	Sin callo/explante vivo	100	68,8	68,8	50,0	37,5
3	Escasa inducción de callo	0,0	31,3	31,3	31,3	31,3
4	Moderada inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Inducción de callo total		0,0	31,3	31,3	31,3	31,3

Debido a que la variable inducción de callo es discreta (MOOD y GRAYBILL, 1976; MILLER *et al.*, 1992), se representó cada tratamiento por su mediana. Es así como la mediana del tratamiento A, representa que el explante está vivo y presenta una abundante formación de callo (grado 5) y la mediana del tratamiento B, representa que el explante está vivo y sin formación de callo (grado 2).



*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 15 Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie *Copiapo hypogaea*.

En los estudios realizados por MARTINEZ –VAZQUEZ y RUBLUO (1989), se obtuvieron resultados similares al cultivar explantes apicales sobre un medio MS, con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA, donde el 80% de los explantes desarrollaron un callo verde claro y friable. Por su parte, PASQUAL y HOSHIKA (1992), obtuvieron buenos niveles de inducción de callo en la especie *Gymnocallicium buldiamur*. Aproximadamente el 50% de los explantes presentaron callo friable con las siguientes concentraciones de hormonas, 1 ó 2 mg/L de BAP con 0,1 mg/L de ANA.

4.6.2 Brotación y rizogénesis. En el Cuadro 8, están los porcentajes de brotación para los dos tratamientos, del total de explantes sobrevivientes. Esta para ambos tratamientos comenzó poco después de la 8ª semana de cultivo. Transcurrida la 12ª semana de cultivo, más del 50% de los explantes vivos presentaron formación de brotes en ambos tratamientos. Considerando que la

mejor respuesta de los explantes a la inducción de brote ocurrió en la 20ª semana en ambos tratamientos, esta variable será analizada para ese período, considerando el número y longitud de brotes por explante.

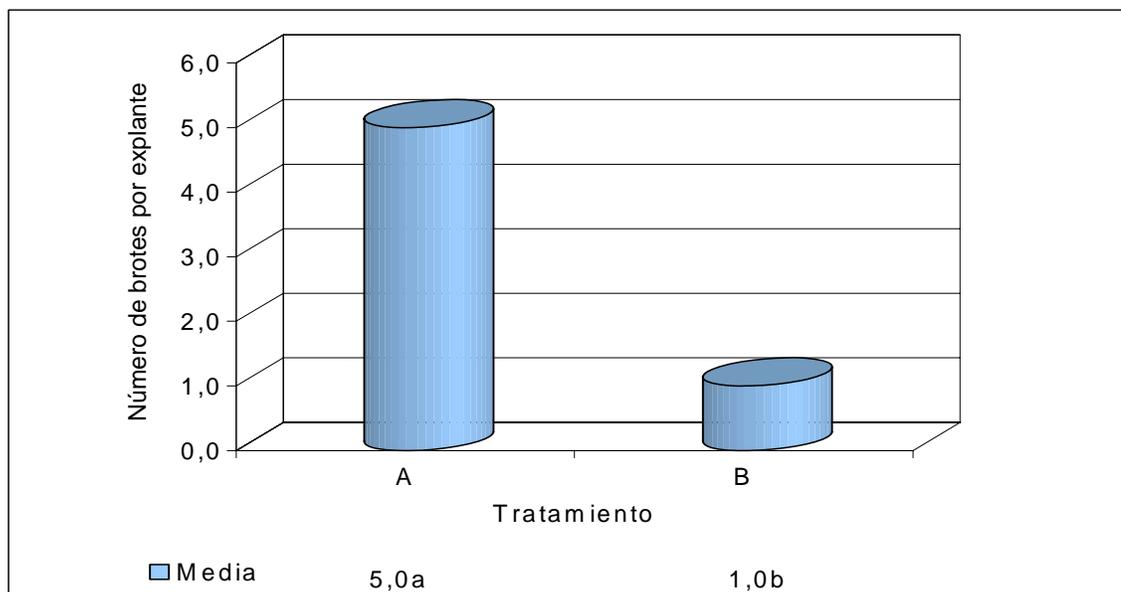
CUADRO 8 Porcentaje de brotación para la especie *Copiapoa hypogaea*, a lo largo de todo el periodo de cultivo *in vitro*.

Porcentajes de inducción de callo y brotación (%)					
Tratamiento	Semanas de cultivo				
A	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
Brotación simple	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Brotación múltiple	0,0	0,0	58,8	100,0	100,0
Brotación total	0,0	0,0	58,8	100,0	100,0
B					
Brotación simple	0,0	0,0	62,5	76,9	100,0
Brotación múltiple	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Brotación total	0,0	0,0	62,5	76,9	100,0

Respecto a la rizogénesis, no se observó formación de raíces en los brotes, en ninguno de los dos tratamientos utilizados. Sin embargo, se logró un moderado enraizamiento, al trasladar los brotes a un medio MS sin auxinas y citoquininas, al término del ensayo. Resultados similares han sido registrados en *Pediocactus knowltonii* y *Pediocactus paradinei* B. W. Benson., ya que no se logró enraizamiento de brotes con las concentraciones hormonales utilizadas. Sin embargo, si se obtuvo enraizamiento espontáneo en brotes transferidos a un medio MS libre de hormonas (CLAYTON *et al.*, 1990). Por su parte STARLING y DODDS (1983), señalan que altas concentraciones de auxinas facilitan la inducción de raíces.

4.6.2.1 Número de brotes por explante. Los análisis desarrollados para esta variable; análisis descriptivo y test de Kruskal Wallis, se encuentran en los

Anexos 9 y 10, respectivamente. La representación gráfica de los resultados obtenidos se encuentra en la Figura 16.



* Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 16 Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante, en la especie *Copiapoa hypogaea*.

Como se señaló anteriormente los análisis se realizaron transcurrida la 20ª semana de cultivo, es así como a partir del Test de Kruskal Wallis efectuado, se evidencian diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos A y B, respecto del número de brotes por explante. De esta manera se indica que el tratamiento A (0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP), indujo mayor número de brotes por explante (5), que el tratamiento B (1) (0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP).

En los explantes cultivados en el tratamiento A se observó una brotación múltiple a partir de callo, alcanzando un rango de 3 - 6 brotes por explante. En cambio los explantes cultivados en el tratamiento B, desarrollaron solamente una brotación simple (1 brote por explante) (Figura 17). Los resultados

obtenidos en este ensayo, se asemejan a lo logrado por STARLING y DODDS (1983), en la especie *Copiapoa humilis* (Phil.) Hutchison., donde se logró formación de brotes múltiples a partir de callo, en explantes cultivados sobre medio MS con 1 mg/L de BAP, pero en ausencia de auxinas.

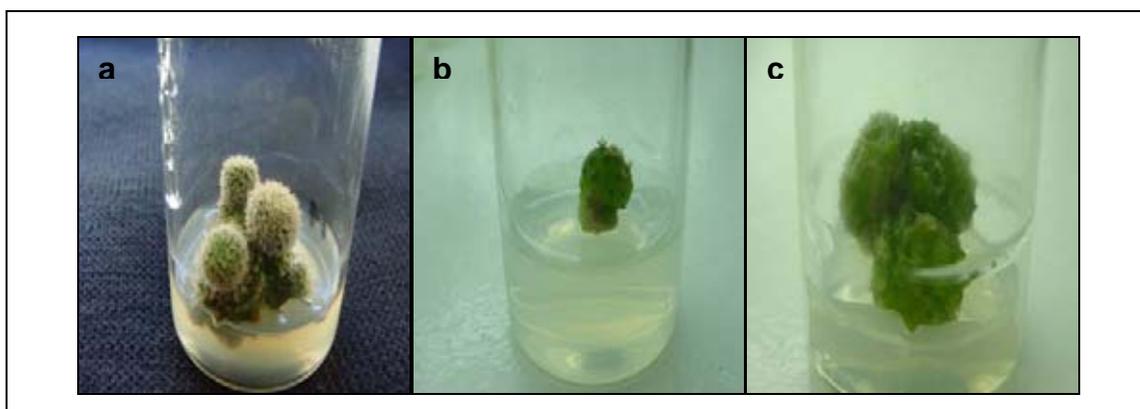
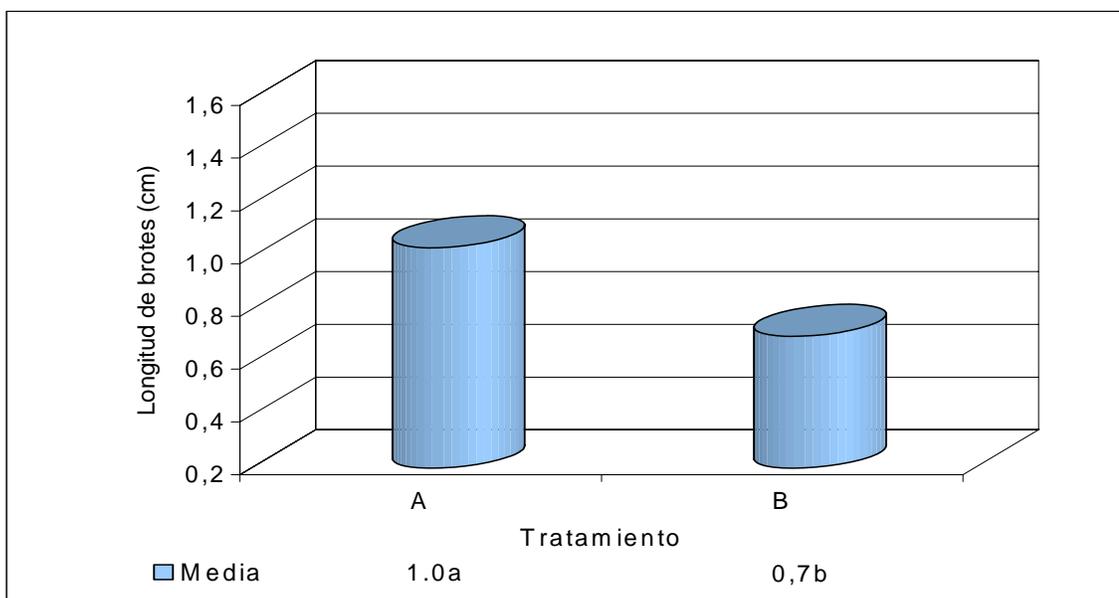


FIGURA 17 Brotación en *Copiapoa hypogaea*. (Brotación múltiple (a) y simple (b) en los tratamientos A y B, respectivamente y brotes torcidos (c) en el tratamiento A, alrededor de la 12^a semana de cultivo.

También en el presente ensayo se produjeron brotes torcidos en los dos tratamientos. Estas deformaciones no fueron superiores al 5%, además al cabo de unas semanas los brotes comenzaron a necrosarse y finalmente murieron (Figura 17). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por GIUSTI *et al.* (2002), en cuyas investigaciones entre el 0,5% y el 1,0% de las plantas de *Pelecypora aselliformis*, presentaron anomalías morfológicas, las cuales no fueron mayormente estudiadas. Al respecto, algunos autores señalan que la formación de brotes a partir de callo favorece la variación somaclonal, la cual puede ser una alteración temporal debido a cambios en el número cromosómico y otro tipo de aberraciones genéticas, como consecuencia de sucesos continuos en células cultivadas (OLIVEIRA *et al.*, 1995; STARLING y DODDS, 1983).

4.6.2.2 Longitud de brotes. En esta variable, la prueba “t” de Student (Anexo 11), indica que existen diferencias estadísticas significativas, entre las medias para los tratamientos A y B. Es así como, se indica una mayor elongación de brotes en el tratamiento A. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 18. En el tratamiento A, los brotes mayores midieron entre 0,7 – 1,5 cm y un promedio de 1 cm de longitud, en cambio en el tratamiento B se obtuvieron brotes de 0,5 a 0,9 cm y cuyo promedio fue 0,7 cm de longitud (Anexo 12).



*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 18 Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes, en la especie *Copiapoa hypogaea*.

Estos resultados son similares a los obtenidos en *C. peruvianus*, *M. pectinifera*, donde se registran longitudes de 1 cm o más (CLAYTON *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995; GIUSTI *et al.*, 2002). Al respecto MALDA *et al.* (1999a), señala que los cactus cultivados *in vitro* crecen más rápido que los cactus cultivados bajo condiciones similares *ex vitro*. Es el caso de las especies

E. minima y *P. aselliformis*, las que alcanzaron después de tres meses una altura de 1,0 - 1,5 cm, comparado con los 0,5 cm. de altura alcanzados por las mismas especies cultivadas *ex vitro* (GIUSTI *et al.*, 2002)

4.7 *Mammillaria elongata*.

En este ensayo se utilizaron explantes de 2 - 5 mm de diámetro y aproximadamente 3 mm de espesor. Estos fueron extraídos del tercio superior del tallo (ápice) del cactus *Mammillaria elongata*, cultivado *ex vitro* de tres a cuatro años de edad (Figura 19). Al respecto JOHNSON y EMINO (1979b), señalan que los explantes óptimos para el cultivo *in vitro* de *M. elongata* son los ápices de brotes con espinas cortadas.

4.7.1 Inducción de callo. Se constató inducción de callo en los explantes (areolas) de *M. elongata*, a partir de la 4^a semana de evaluación en los tratamientos A y B. Se observó la formación de dos tipos de callo, uno friable y uno más compacto, ambos de color verde claro y con sectores rojizos (Figura 19).

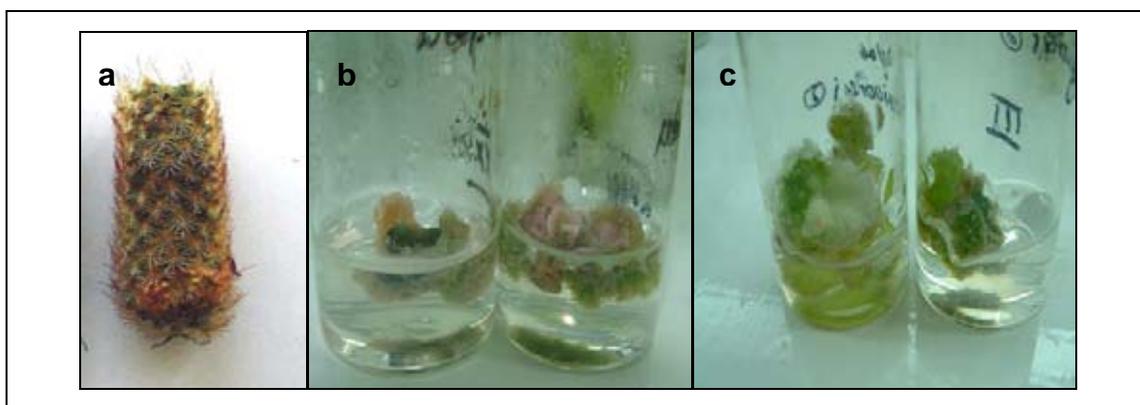


FIGURA 19 Ejemplar de *Mammillaria elongata* (a) y callo formado en explantes cultivados *in vitro* (b y c).

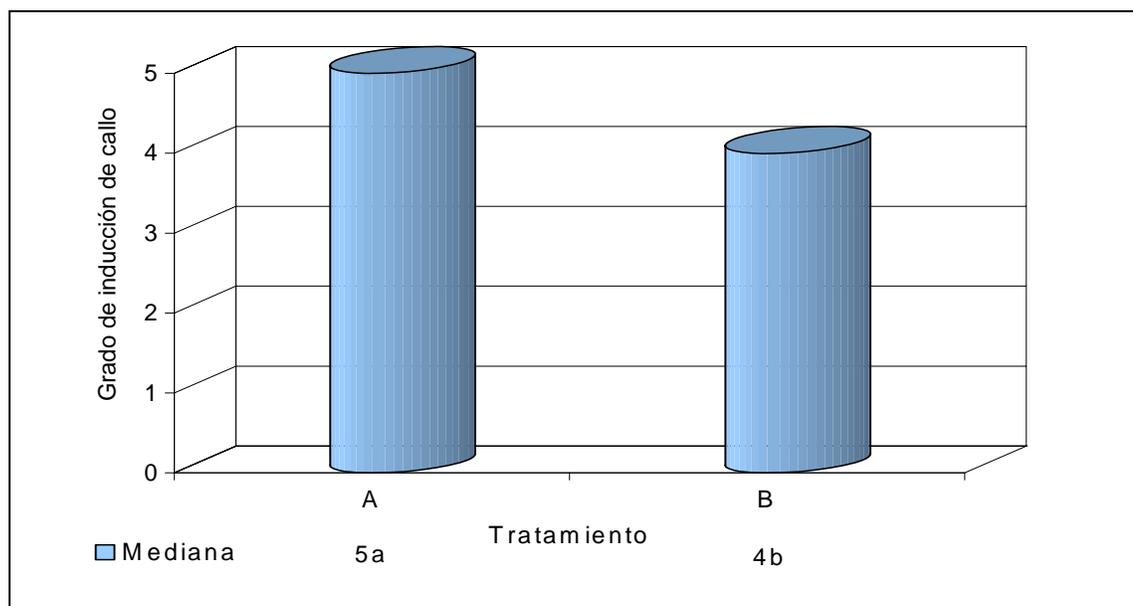
El callo friable se desarrolló sobre toda la superficie del explante, en cambio el callo compacto se formó sobre la superficie cortada de este, que entró en contacto con el medio de cultivo. Este resultado se asemeja al obtenido por PÉREZ *et al.* (1998) en algunas *mammillarias*, donde el callo se formó en la superficie de corte del explante y tuvo una estructura más compacta y regiones rojizas debido a la presencia de betalaínas en sus tejidos.

En la 12ª semana de evaluación el 100% de los explantes vivos presentaron algún grado de inducción de callo, en ambos tratamientos, resultados que se mantuvieron hasta el final del ensayo (Cuadro 9).

CUADRO 9 Porcentajes de inducción de callo en la especie *Mammillaria elongata*, durante el periodo de cultivo.

Porcentajes de inducción de callo						
Tratamiento		Semanas de cultivo				
A		4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	Sin callo, explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	Sin callo, explante vivo	63,2	14,3	0,0	0,0	0,0
3	Escasa inducción de callo	26,3	7,1	0,0	0,0	0,0
4	Mediana inducción de callo	10,5	78,6	14,3	14,3	14,3
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	87,5	87,5	87,5
Total inducción de callo		36,8	85,7	100,0	100,0	100,0
B						
1	Sin callo, explante muerto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	Sin callo, explante vivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	Escasa inducción de callo	27,8	41,7	33,3	33,3	33,3
4	Mediana inducción de callo	38,9	50,0	33,3	33,3	33,3
5	Abundante inducción de callo	33,3	8,3	33,3	33,3	33,3
Total inducción de callo		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Considerando que la mayor inducción de callo ocurre al final de la 12^a semana de cultivo, la inducción de callo se analizó para ese período. Es así como, el Test de Kruskal Wallis (Anexo 13), constató diferencias significativas, en cuanto a la inducción de callo. Así, se verificó que la máxima inducción de callo ocurre en respuesta al tratamiento A (1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA). De esta manera, la variable representa para el tratamiento A que los explantes están vivos y se observa una abundante inducción de callo (grado 5) y para el tratamiento B que los explantes están vivos con mediana inducción de callo (grado 4). La representación gráfica de los resultados se muestra en la Figura 20.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 20 Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie *Mammillaria elongata*.

Estos resultados difieren de los obtenidos en *M. elongata* por JOHNSON y EMINO (1979b), donde se observó la formación de callo friable en el medio MS, en presencia de la auxina 2,4-D. Sin embargo, en otros ensayos realizados

se determinó que la presencia de la citoquinina BAP, provoca la inducción de callo en *M. elongata*, (PAPAFOTIOU *et al.*, 2001).

Es importante mencionar, que existen varios antecedentes de inducción de callo en especies del género *Mammillaria* cultivadas en el medio MS con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA. De esta manera PASQUAL y HOSHIKA (1992), verificaron algún grado de inducción de callo en el 57,1% de los explantes de *Mammillaria bocassana*. MARTINEZ-VAZQUEZ y RUBLUO (1989), obtuvieron una escasa formación de callo verde y friable en el 80% de los explantes laterales de *Mammillaria san – angelensis*. Por su parte, PEREZ *et al.* (1998) constataron inducción de callo en *Mammillaria formosa* Galeotti. y *Mammillaria sphacelata* Mart., sobre la superficie cortada de los explantes cultivados en el medio MS con 1 mg/L de BAP y 0,1 ó 0,01 mg/L de ANA, respectivamente. Por su parte, STARLING y DOODS (1983) lograron inducción de callo en *Mammillaria glassii* R. C. Foster, cultivada en el medio MS con 1,0 mg/L de BAP y sin auxinas.

4.7.2 Brotación y rizogénesis: En el Cuadro 10, se encuentran los porcentajes de brotación para los tratamientos A y B, del total de explantes vivos y sin contaminación.

Respecto a la brotación, en las primeras ocho semanas de evaluación, no hubo formación de brotes en ambos tratamientos. Luego de 16 semanas de cultivo el 78,6% y el 100% de los explantes vivos presentaron formación de brotes en el tratamiento A y B respectivamente. Considerando que la mejor respuesta a la inducción de brote ocurrió trascurridas 20 semanas de cultivo *in vitro* en los tratamientos, el análisis estadístico para las variables número y longitud de brote será efectuado para ese período.

CUADRO 10 Porcentaje de brotación en la especie *Mammillaria elongata*, durante el período de cultivo.

Porcentajes de brotación de explantes (%)					
Tratamiento	Semanas de cultivo				
A	4^a	8^a	12^a	16^a	20^a
Brotos simples	0,0	0,0	21,4	0,0	0,0
Brotos múltiples	0,0	0,0	14,3	78,6	85,7
Brotación total	0,0	0,0	35,7	78,6	85,7
B					
Brotos simples	0,0	0,0	50,0	50,0	25,0
Brotos múltiples	0,0	0,0	0,0	50,0	75,0
Brotación total	0,0	0,0	50,0	100,0	100,0

Respecto a la rizogénesis, no se observó formación de raíces durante todo el ensayo, sólo se constató el enraizamiento de brotes, luego de dos meses de haber sido transferidos a un medio MS sin hormonas. Al igual que MALDA *et al.* (1999a), en *Coryphantha minima*, no lograron enraizamiento en ninguna de las combinaciones hormonales probadas, solo obtuvieron enraizamiento al trasladar los brotes individuales a un medio MS desprovisto de citoquininas y auxinas. A su vez, CLAYTON *et al.* (1990), enraizaron las once especies en estudio en el medio MS sin reguladores de crecimiento.

El género *Mammillaria* ha sido propagado exitosamente mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Algunos autores han cultivado estos cactus bajo las mismas condiciones, encontrando resultados muy variables, pasando por una regeneración completa del cactus *M. elongata*, a ninguna respuesta en el cactus *Mammillaria eichlamii* Quehl; por lo que, sugieren que cada especie de *Mammillaria* podría requerir de una combinación hormonal auxina/citocinina específica y crítica, para una respuesta específica. (JOHNSON y EMINO,

1979ab; STARLING y DOODS, 1983; VYSKOT y JÁRA, 1984, MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989).

4.7.2.1 Número de brotes por explante. Al igual que PASQUAL y HOSHIKA (1992), en *Mammillaria bocassana*, en el presente ensayo se obtuvo formación de brotes mediante producción de callo y activación de yemas axilares en los tratamientos A y B (Figura 21).

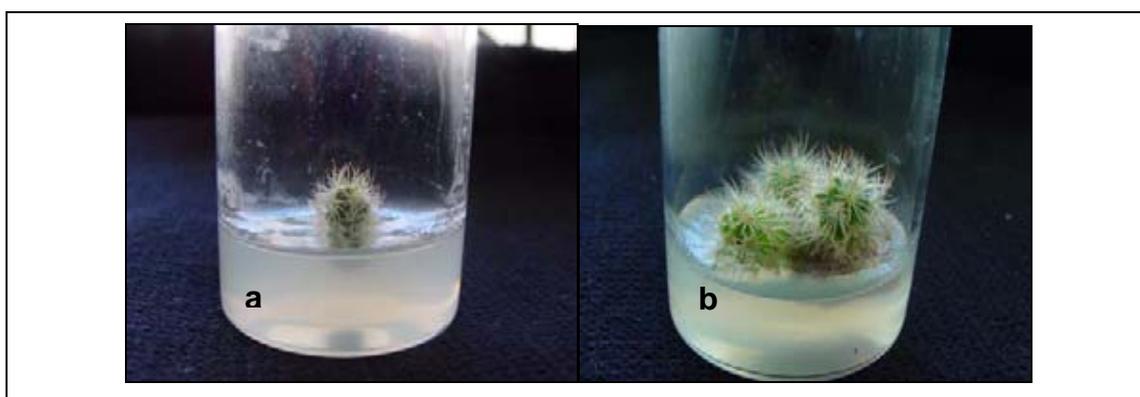
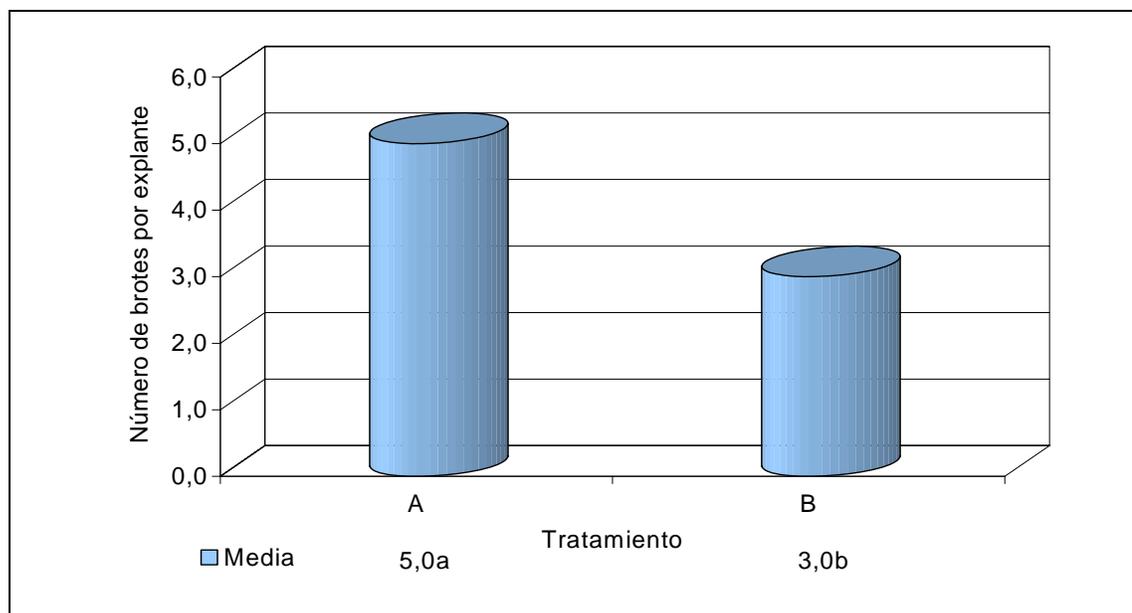


FIGURA 21 Brotación simple (a) y múltiple (b) en *Mammillaria elongata.*, al finalizar la 20^a semana de cultivo. (Explantes cultivados en los tratamientos B y A, respectivamente.)

La prueba t de Student (Anexo 14) evidencia la presencia de diferencias estadísticas significativas para la variable número de brotes, indicando que el tratamiento A, permitió obtener el mayor número de brotes por areola, alcanzando un promedio de 5 y un máximo de 9 brotes por cada areola (Anexo 15). La representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 22.

Resultados similares a los obtenidos en el presente ensayo han sido descritos en varias especies del género *Mammillaria*. Es así como STARLING y DODDS (1983) obtuvieron brotación múltiple en *Mammillaria glassii* a partir de

callo (organogénesis indirecta), mediante ápices de brotes cultivados en el medio MS con 1 mg/L de BAP y sin auxina.



*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

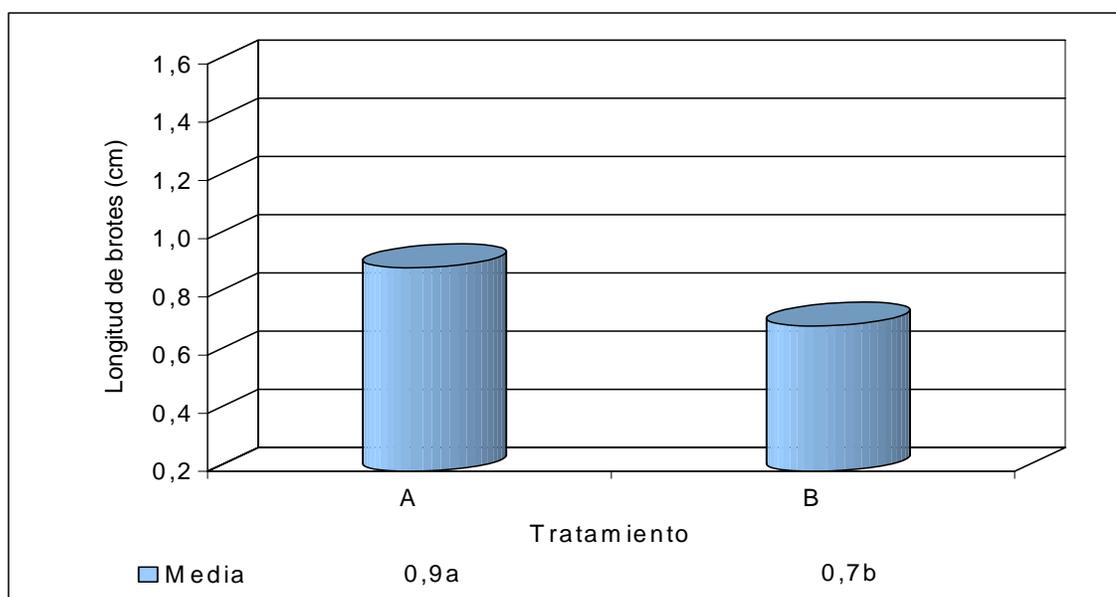
FIGURA 22 Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante, en la especie *Mammillaria elongata*.

Por su parte, JOHNSON y EMINO (1979a) obtuvieron desarrollo de brotes en *M. elongata*, a partir de callo obtenido desde ápices de brotes, provenientes de semillas establecidas en un medio MS con 10 mg/L de 2iP y 1 mg/L de AIA. No obstante, PAPAFOIOTOU *et al.* (2001) afirma que la formación óptima de brotes se observa con concentraciones de 5 mg/L de BAP y 0,2 mg/L de ANA, alcanzando un 88% de brotación y un promedio de 1,7 brotes por explantes.

A su vez, MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO (1989), lograron brotación simple (60%) y múltiple (20%) en *Mammillaria san-angelensis*, mediante la activación de yemas axilares presentes en ápices de brotes provenientes de semillas cultivadas sobre el medio MS con 1 mg/L BAP y 0,1 mg/L ANA, luego

de cuatro meses de cultivo. De igual forma, PÉREZ *et al.* (1998), obtuvieron formación de brotes múltiples a partir de areolas en las especies *Mammillaria formosa* (4,4 brotes por explante) y *Mammillaria obscura* (4,9 brotes por explante) en un medio MS con 1 mg/L BAP y 0,1 mg/L ANA.

4.7.2.2 Longitud de brotes. Según el análisis descriptivo (Anexo 16), realizado para esta variable, en los tratamientos A y B se observaron alturas promedio en brotes de 0,9 y 0,7 cm al finalizar la 20ª semana de cultivo, respectivamente. La prueba “t” de Student (Anexo 17), arrojó diferencias estadísticas entre los tratamientos, indicando una mayor elongación de brotes en el tratamiento A. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 23.



* Letras diferentes indican diferencias estadísticas al 5%.

FIGURA 23 Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie *Mammillaria elongata*.

Resultados similares fueron obtenidos por PAPAFOU *et al.* (2002) en las formas normales y cristadas de cactus *M. elongata*, en el cual se

desarrollaron brotes de 1 cm o más de largo, luego de dos meses de cultivo. Por su parte, GIUSTI *et al.* (2002) observaron en *M. pectinifera* brotes de hasta 1,5 cm de longitud, al cabo de unas 12 semanas de cultivo. En los trabajos realizados con *M. san - angelensis*, los explantes apicales originaron brotes simples y múltiples luego de 16 semanas, los cuales produjeron al menos 8 - 12 brotes por explantes de unos 5 mm de longitud (MARTÍNEZ – VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989).

Como se señaló anteriormente en el ensayo de *C. hypogaea*, el desarrollo *in vitro* de cactus puede ser considerablemente rápido, respecto al crecimiento *ex vitro* (MINOCHA y MEHRA, 1974; MALDA *et al.*, 1999a; PEREZ *et al.*, 2002; PEREZ y DÁVILA, 2002), lo cual estaría asociado con el metabolismo del carbono, condicionado por las características medio ambientales del cultivo *in vitro*, como por ejemplo la alta humedad relativa, las hormonas vegetales, etc. (MALDA *et al.*, 1999a; PEREZ *et al.*, 2002). Al respecto, según los resultados obtenidos por MINOCHA y MEHRA (1974), en *M. prolifera*, las plantas provenientes de semillas cultivadas *ex vitro*, requieren de un año o más para lograr el mismo tamaño que las plantas desarrolladas en pocos meses en el cultivo de tejido *in vitro*.

4.8 *Opuntia berteri*.

En este ensayo se utilizaron ápices de brotes como fuente de explantes. Los explantes midieron de 4 - 5 mm de diámetro y no más de 5 mm de espesor y fueron cortados de un cactus cultivado *ex vitro*, de uno a dos años de edad (Figura 24).

4.8.1 Inducción de callo. En este caso, se verifica formación de callo en ambos tratamientos, desde la 4^a semana de evaluación. En el Cuadro 11 se encuentran los porcentajes de inducción de callo, del total de explantes sin contaminación. Considerando que la inducción de callo se estabilizó en los

últimos períodos, el análisis estadístico se realizó al finalizar la 20ª semana de evaluación.

CUADRO 11 Porcentaje de inducción de callo para la especie *Opuntia berteri*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentajes de inducción de callo (%)						
Tratamiento		Semanas de cultivo				
A		4ª	8ª	12ª	16ª	20ª
1	Sin callo, explante muerto	0,0	5,6	5,6	5,6	5,6
2	Sin callo, explante vivo	77,8	38,9	38,9	38,9	38,9
3	Escasa inducción de callo	22,2	55,6	55,6	55,6	55,6
4	Mediana inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Inducción de callo total		22,2	55,6	55,6	55,6	55,6
B						
1	Sin callo, explante muerto	11,1	11,1	16,7	16,7	16,7
2	Sin callo, explante vivo	83,3	61,1	38,9	38,9	38,9
3	Escasa inducción de callo	5,6	27,8	33,3	27,8	27,8
4	Mediana inducción de callo	0,0	0,0	0,0	5,6	5,6
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	11,1	11,1	11,1
Inducción de callo total		5,6	27,8	44,4	44,4	44,4

Es así como, a partir de la 12ª semana de cultivo se constató que el 55,6% y el 44,4% de los explantes en los tratamientos A y B, respectivamente, presentaron algún grado de inducción de callo. Se observó principalmente un callo tipo friable de color verde claro sobre la superficie de corte del explante (Figura 24).

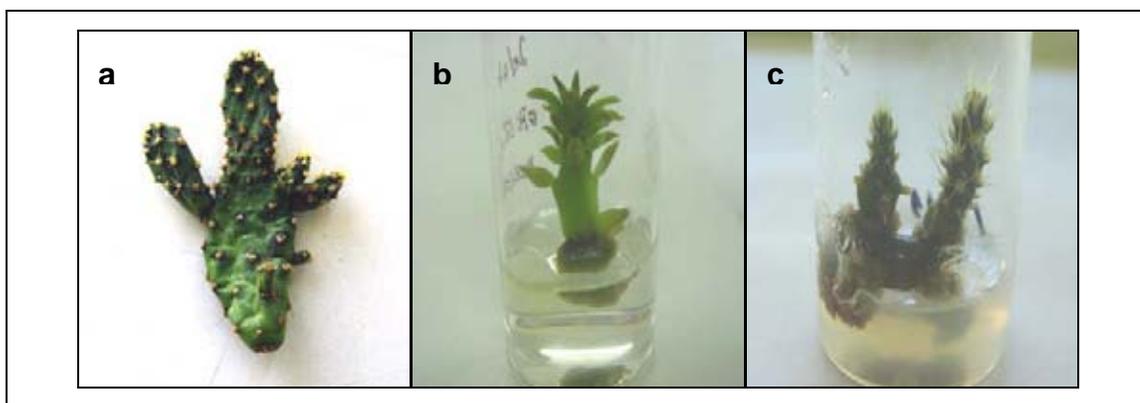


FIGURA 24 Ejemplar de *Opuntia berteri* de dos a tres años de edad (a) y callo formado en areolas cultivadas *in vitro* (b y c) en la 8ª semana de cultivo.

El test de Kruskal Wallis (Anexo 18) realizado, no arrojó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Por ende se concluye que el cactus *O. berteri*, presenta igual intensidad de formación de callo frente a un medio MS con 1 ó 2 mg/L de BAP en combinación con 0,1 mg/L de ANA, por lo tanto la mediana para ambos tratamientos representa una escasa inducción de callo (grado 3), lo cual sólo se observa sobre la superficie de corte del explante.

Es importante señalar que existen investigaciones en otras especies del género *Opuntia*, como *Opuntia amyclaea* Tenore., que fue propagada con gran éxito en un medio MS suplementado con 2 mg/L de BAP logrando 25.000 plantas en 100 días (VILLALOBOS, 1999). Por su parte, LLAMOCA *et al.* (1999) en *Opuntia ficus-indica*, obtuvieron un 86% de formación de callo friable, considerando un requisito importante la presencia de 0,2 mg/L de KIN y 1 mg/L de 2,4 - D en el medio de cultivo MS. Algunos autores señalan al medio MS como el más indicado para soportar todas las fases de la organogénesis, indicando que la inducción de callo puede ser controlada mediante un balance hormonal adecuado, el cual puede ser específico para cada especie (VILLALOBOS, 1999; LLAMOCA *et al.*, 1999)

Resultados similares a los obtenidos en el presente ensayo, se han obtenido en especies pertenecientes a otros géneros de cactáceas; MACHADO y PRIOLI (1996) por ejemplo en *Cereus peruvianus*, observaron inducción de callo friable o disgregado sólo sobre la superficie de corte de los explantes utilizados en presencia de 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de ANA, PEREZ *et al.* (1998) indujeron escasa formación de callo friable sobre la superficie de corte de los explantes en 21 especies de cactus mexicanos pertenecientes a los géneros *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*, siendo óptima la multiplicación en el medio MS con 1 ó 2 mg/L de BAP, sin auxinas o en combinación con 0,1 ó 1 mg/L de ANA, donde en presencia de la auxina ANA sólo se observó una escasa inducción de callo.

4.8.2 Brotación y rizogénesis. En los explantes de *O. berteri* cultivados *in vitro* se verificó la formación de brotes simples y múltiples, mediante la activación de yemas axilares (areolas) y en menor medida a partir de callo en ambos tratamientos. Resultados similares se observaron en el cultivo *in vitro* de *Mammillaria san-angelensis*, *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima* en un medio MS suplementado con 0,5 – 2,0 mg/L BAP y 0,1 mg/L de ANA (MARTÍNEZ - VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; MALDA *et al.*, 1999a).

Respecto a la variable rizogénesis, no se verificó formación de raíces en los brotes obtenidos en los tratamientos A y B, durante todo el período de cultivo. Sin embargo, se obtuvo el enraizamiento espontáneo de la totalidad de los brotes al trasladarlos al finalizar el ensayo a un medio MS sin hormonas (Figura 25). RUBLUO *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares en la especie *M. san-angelensis*, cuyos brotes enraizaron en el medio MS basal, desprovisto de reguladores de crecimiento.

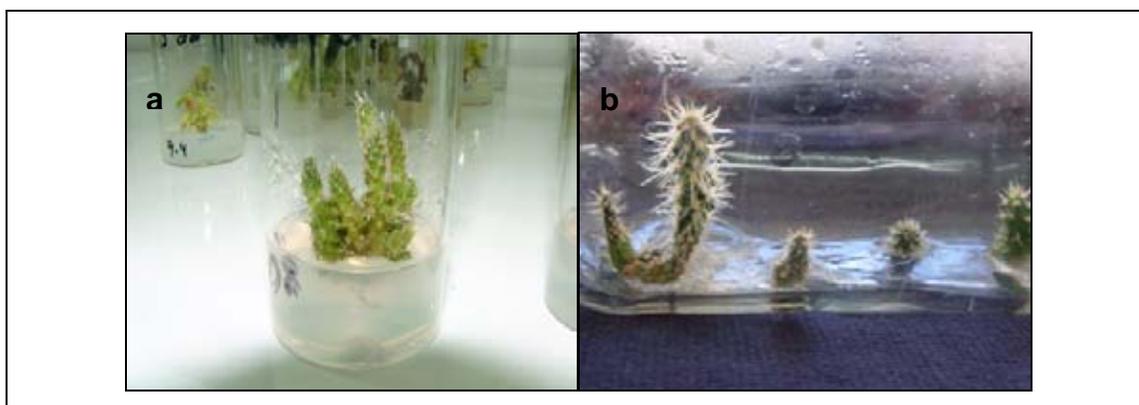


FIGURA 25 Brotación múltiple (a) y rizogénesis (b) en *Opuntia berteri*. (Areola en tratamiento A en la 20^a semana de cultivo (a) y rizogénesis en medio MS sin hormonas (b)).

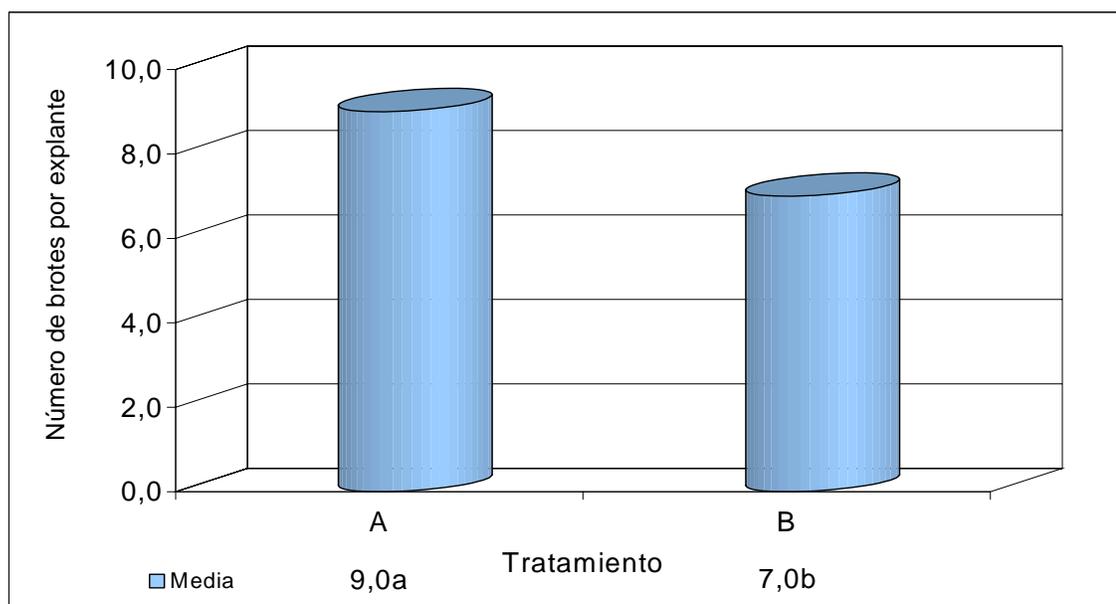
En el Cuadro 12 se muestran los porcentajes de brotación, del total de explantes vivos a lo largo del período de cultivo. El mayor porcentaje de brotación ocurrió en la 20^a semana de evaluación en ambos tratamientos, por ende el análisis estadístico se efectuó para ese período.

CUADRO 12 Porcentaje de brotación para la especie *Opuntia berteri*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentajes de brotación de explantes (%)					
Tratamiento	Semanas de cultivo				
A	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
Brotos simples	76	18	0	0	0
Brotos múltiples	12	70	88	94	100
Brotación total	88	88	88	94	100
B					
Brotos simples	80	80	80	47	0
Brotos múltiples	7	7	13	46	100
Brotación total	87	87	93	93	100

4.8.2.1 Número de brotes por explante. A las dos semanas de iniciado el ensayo, las areolas (explantes) comenzaron a desarrollar yemas en ambos tratamientos. En el Cuadro 12, se verifica que al finalizar la 4^a semana de cultivo se observó principalmente brotación simple en los dos tratamientos. Sin embargo, al término del ensayo, en ambos tratamientos se presentó sólo brotación múltiple (Figura 25)

La Prueba “t” de Student efectuada (Anexo 19), evidencia diferencias estadísticas entre los tratamientos, la cual indicó que el tratamiento A (1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA), permitió obtener mayor número de brotes, promediando 9 brotes por cada areola y un máximo de 16 brotes por areola (Anexo 20). La representación gráfica de estos resultados se encuentra en la Figura 26.



* Letras diferentes indican diferencias estadísticas al 5%.

FIGURA 26 Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes por explante en la especie *Opuntia berteri*.

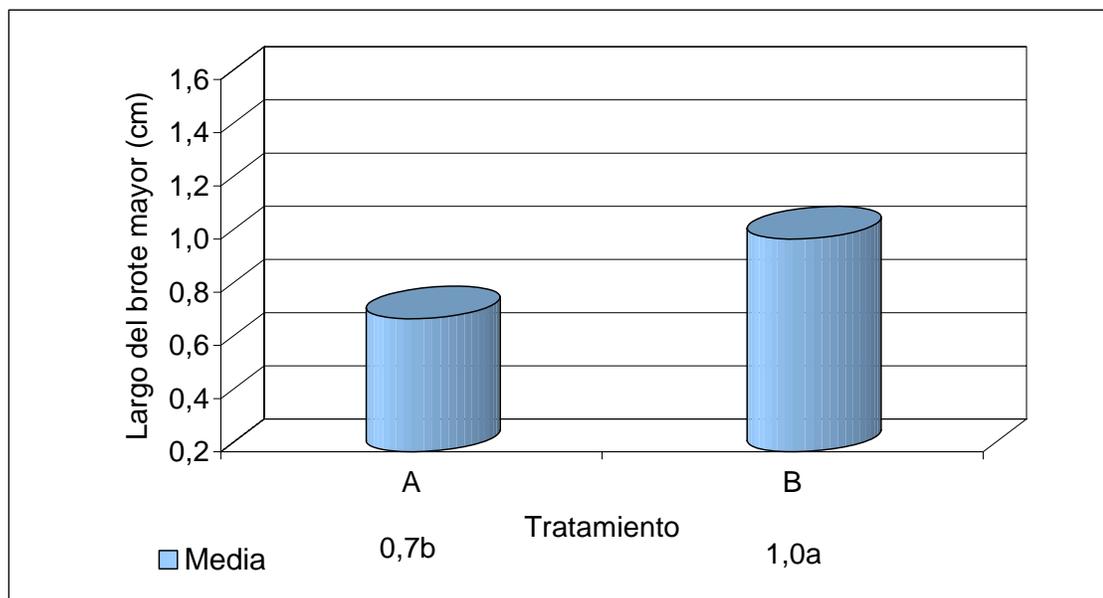
LAZARTE *et al.* (1982), obtuvieron resultados similares a los presentados en este ensayo, al cultivar esquejes de tallo de *Epiphyllum chrysocardium* provenientes de plantas cultivadas en invernaderos, logrando en poco tiempo la activación de areolas y la posterior formación de brotes en el medio MS con 1 mg/L de BAP en combinación con 0,1 mg/L de ANA. Por su parte, DABEKAUSSEN *et al.* (1991) propagaron con gran éxito el cactus boliviano *Sulcorebutia alba* en el medio MS, con 0,25 – 1,0 mg/L de BAP con o sin 0,1 mg/L de ANA, utilizando esquejes de cladodio con al menos tres areolas por explante.

A su vez, PEREZ *et al.* (1998), obtuvieron formación de brotes múltiples mediante la activación de areolas en las especies *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer, *Astrophytum myriostigma* y *Ferocactus histrix* (DC.) Linds., a las diez o doce semanas de iniciado el cultivo. La formación óptima de brotes ocurrió en el medio MS con 1 ó 2 mg/L de BAP, sin auxinas o en combinación con 0,1 ó 1,0 mg/L de ANA.

4.8.2.2 Longitud de brote. La prueba “t” de Student (Anexo 21) realizada, evidenció diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos alrededor de la 20ª semana de evaluación. Esta indicó una mayor elongación de brotes en el tratamiento B. Los brotes en promedio midieron 0,7 y 1,0 cm de largo en los tratamientos A y B, respectivamente (Anexo 22). La representación gráfica de resultados en la Figura 27.

Al respecto, CLAYTON *et al.* (1990), constataron la formación de brotes de 1 - 2 cm de longitud luego de doce semanas de cultivo en las algunas de las once especies estudiadas. Por su parte, MATA *et al.* (2001) señalaron que gran parte de los brotes nuevos de *Turbinicarpus laui* habían alcanzado entre 0,5 – 1,0 cm de alto cultivados en un medio MS con 2 - 3 mg/L de BAP y 0,0 – 0,5 mg/L de ANA. Resultados que se asemejan a los obtenidos en este ensayo con

la especie *O. berteri*, que en promedio los brotes formados midieron en promedio 0,7 – 1,0 cm de longitud.



* Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 27 Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie *Opuntia berteri*.

4.9 *Opuntia sp.*

Este ensayo fue establecido a las doce semanas de iniciados el resto de los ensayos. Los explantes utilizados, provinieron de plantas cultivadas *in vitro* (Figura 28) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, ubicado en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral del Chile en Valdivia, a partir de areolas de plantas traídas de Brasil. Los explantes fueron extraídos del ápice del brote (hasta 1.0 cm por debajo del ápice) y midieron 2 - 4 mm de diámetro y 3 mm de espesor aproximadamente.

Considerando que en el tratamiento B, no se puede comprobar la normalidad, ya que presenta solamente dos observaciones, no se justifica la realización de análisis estadísticos para las variables evaluados en este ensayo. Por ende se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos para esta especie.

4.9.1 Inducción de callo. En el Cuadro 13, se indican los porcentajes de inducción de callo, del total de explantes sin contaminación. Respecto a esta variable el callo observado, que se localizó en la superficie herida del explante, fue más bien compacto, de una coloración verde claro. Es así como, se observó una escasa inducción de callo en el 20% de los explantes cultivados en el tratamiento A, a partir de la 2ª semana de evaluación. Los explantes cultivados en el tratamiento B no presentaron resultados satisfactorios, no obstante, los explantes sobrevivientes (10%) presentaron escasa inducción de callo.

CUADRO 13 Porcentaje de inducción de callo para la especie *Opuntia sp.*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentaje de inducción de callo (%)					
Tratamiento		A		B	
Grado de inducción de callo		Semana		Semana	
		4ª	8ª	4ª	8ª
1	Sin callo, explante muerto	25,0	25,0	90,0	90,0
2	Sin callo, explante vivo	73,3	73,3	0,0	0,0
3	Escasa inducción de callo	20,0	20,0	10,0	10,0
4	Mediana inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0
Inducción de callo total		20,0	20,0	10,0	10,0

Estos resultados son similares a los obtenidos por PÉREZ *et al.* (2002), en tres cactus columnares provenientes del desierto de Sonora (México) al utilizar explantes de cactus propagados *in vitro*, donde sólo el 15% de los explantes presentaron un moderado crecimiento de callo, en presencia de ANA (0,5 mg/L).

4.9.2 Brotación y rizogénesis. Respecto a la variable brotación, se observó desarrollo de yemas a partir de la 2ª semana de cultivo. En el Cuadro 14, se muestran los porcentajes de brotación, del total de explantes sin contaminación. En el tratamiento A, se observó una brotación simple y múltiple, mediante la activación de areolas ó yemas axilares. Al finalizar la 8ª semana de cultivo ya el 80% de las areolas presentaban brotación múltiple.

CUADRO 14 Porcentaje de brotación para la especie *Opuntia sp.*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentaje de brotación (%)		
Tratamiento	Semanas de cultivo	
	4ª	8ª
A		
Brotación simple	40,0	20,0
Brotación múltiple	53,3	80,0
Brotación total	93,3	100,0

Las areolas cultivadas en el tratamiento A, en promedio formaron 5 brotes, llegando a formar hasta 12 brotes por areola. La longitud del brote mayor por explante alcanzó un promedio de 1 cm y un máximo de 1,7 cm de longitud, a las ochos semanas de cultivo. En el tratamiento B los explantes sobrevivientes (10%) presentaron 1 y 5 brotes por areola, cuyas longitudes fluctuaron entre 1 y 2 cm, respectivamente. En los Anexo 23 y 24 se muestran los análisis descriptivos realizados para las variables número y longitud de brotes, realizados transcurridas ocho semanas de cultivo.

Por otro lado, se pudo observar la formación de brotes dominantes, rodeados de brotes más pequeños, localizados en la base del explante. Al igual que PÉREZ *et al* (2002), en cuyos experimentos lograron brotación mediante la activación de yemas axilares. Sin embargo, en los explantes apicales observaron una baja brotación y la presencia de un brote dominante de gran tamaño, logrando obtener de 1,7 a 4,5 brotes por explante.

Por su parte, PÉREZ *et al.*, (1998) en algunas especies de *Mammillaria* y *Ferocactus*, utilizaron explantes laterales (sin ápice) de 3 - 8 mm de largo (1 a 6 areolas por explante), provenientes de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, logrando obtener 4,4 a 5,8 brotes por explante en algunos de los cactus cultivados en un medio MS con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA.

A su vez, VILLALOBOS *et al.* (1991) cultivaron explantes longitudinales de *Opuntia amyclaea* sin ápice, provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, promediando 15 brotes por cada explante en presencia de 2,3 mg/L de BAP. PÉREZ *et al.* (2002), al utilizar explantes transversales de 4 mm de longitud, obtuvieron 5,3 brotes por explante en *Carnegiea gigantea* en presencia de 2 mg/L de BAP, 3,8 y 4,3 brotes por explantes en *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi*, respectivamente, en presencia de 1 mg/L de BAP.

Con respecto a la rizogénesis, solo dos explantes con brotes desarrollaron raíces (13,3%). Se observaron dos a cuatro raíces por explante, de 0,5 – 3,0 cm de longitud. Sin embargo, al finalizar el ensayo se pudo constatar el enraizamiento espontáneo de los brotes al ser trasladados a un medio basal MS, desprovisto de reguladores de crecimiento (Figura 28), al cabo de unas dos semanas de cultivo aproximadamente.

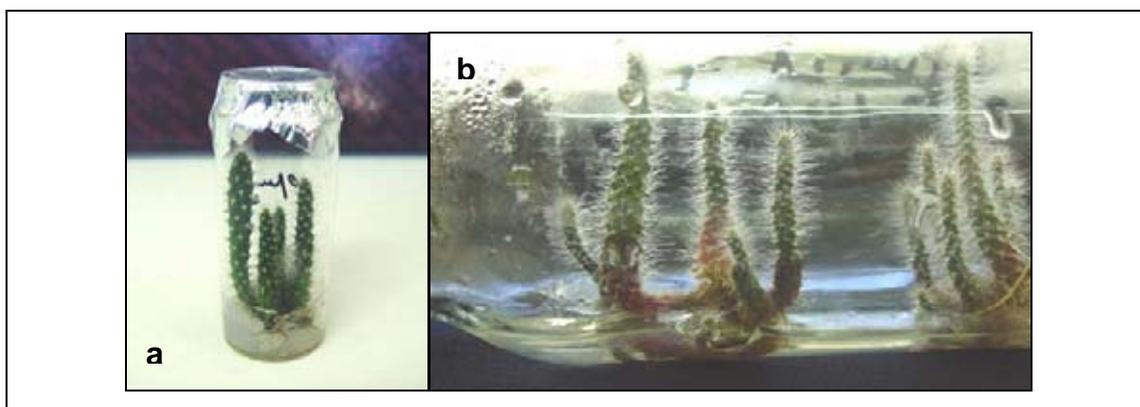


FIGURA 28 *Opuntia sp.* (a) y explantes con brotes y raíces cultivados *in vitro*. (Ejemplar utilizado como planta madre (a); brotes cultivados en medio MS sin fitohormonas (b)).

10 *Trichocereus sp.*

En el presente ensayo se utilizaron explantes de 3 a 5 mm de diámetro y unos 5 mm de espesor, extraídos de un ejemplar de *Trichocereus sp.*, de aproximadamente dos a tres años de edad, cultivado *ex vitro*. Al igual que en los trabajos de STEINHART (1962) con *T. spachianus*, que utilizó plantas adultas cultivadas *ex vitro* de tres a cinco años de edad (Figura 29).

4.10.1 Inducción de callo: En el Cuadro 15, se indican los porcentajes de inducción de callo obtenidos durante el ensayo, del total de explantes, sin contaminación.

La inducción de callo comenzó alrededor de la 5^a semana de cultivo en ambos tratamientos. En el tratamiento A se pudo observar una escasa inducción de callo friable en el 42% de los explantes cultivados, el cual se localizó sobre la superficie de corte de estos. Por otro lado, en el tratamiento B se constató una mediana y abundante inducción de callo en el 78.9% de los explantes cultivados (grado 4 y 5, respectivamente), el cual se desarrolló sobre toda la superficie de los explantes (Figura 29).

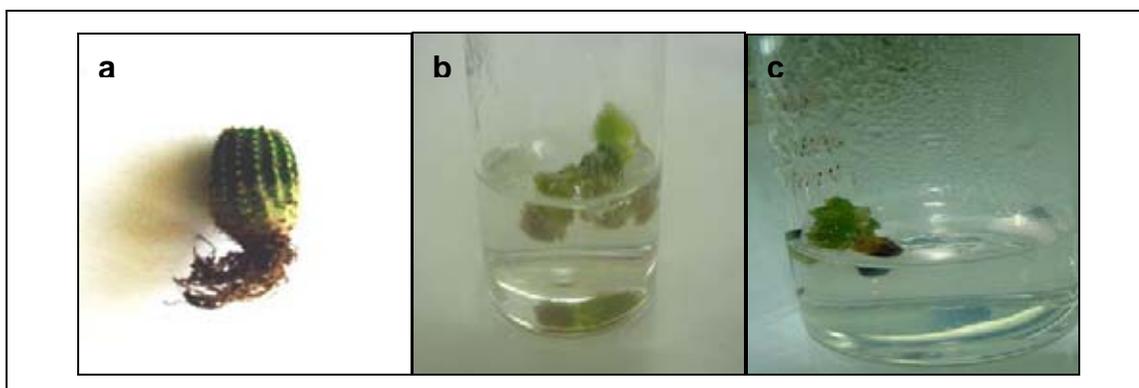
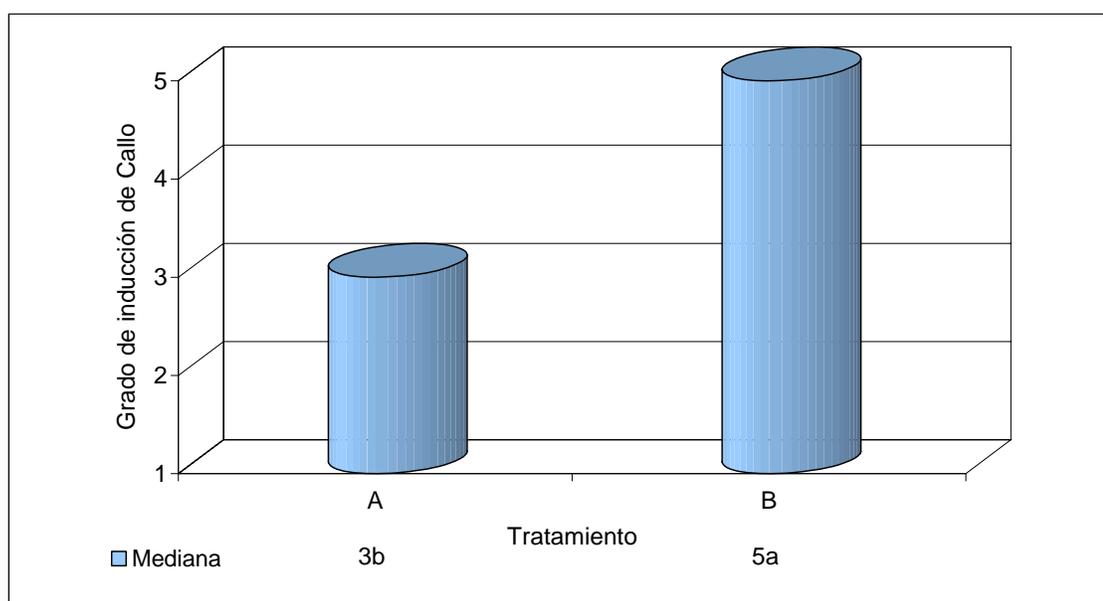


FIGURA 29 *Trichocereus sp.*, utilizado como planta madre (a) y callo formado en explantes cultivados *in vitro* (b y c).

CUADRO 15 Porcentaje de inducción de callo para la especie *Trichocereus sp.*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentajes de inducción de callo (%)						
Tratamiento		Semanas de cultivo				
A		4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
1	Sin callo, explante muerto	0,0	36,8	36,8	36,8	36,8
2	Sin callo, explante vivo	100,0	21,1	21,1	21,1	21,1
3	Escasa inducción de callo	0,0	42,1	42,1	42,1	42,1
4	Mediana inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	Abundante inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Inducción de callo total		0,0	42,1	42,1	42,1	42,1
B						
1	Sin callo, explante muerto	0,0	21,1	21,1	21,1	21,1
2	Sin callo, explante vivo	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	Escasa inducción de callo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	Mediana inducción de callo	0,0	36,8	36,8	36,8	36,8
5	Abundante inducción de callo	0,0	42,1	42,1	42,1	42,1
Inducción de callo total		0,0	78,9	78,9	78,9	78,9

El análisis estadístico se realizó en la 20ª semana de cultivo, considerando que el porcentaje de inducción de callo se mantuvo estable durante desde la 8ª a la 20ª semana de evaluación. El test de Kruskal Wallis (Anexo 25) realizado constató diferencias estadísticas significativas para la inducción de callo, así se verificó una mayor inducción de callo en explantes cultivados en el tratamiento B. De esta manera, la mediana representa una inducción de callo en los explantes, escasa para el tratamiento A (grado 3) y abundante para el tratamiento B (grado 5). La representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 30.



* Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas al 1%.

FIGURA 30 Efecto de los tratamientos sobre la variable inducción de callo, en la especie *Trichocereus sp.*

En *T. spachianus*, STEINHART (1962) constató inducción de callo friable y de rápido crecimiento en presencia de 2,4-D. Por lo menos el 50% de los explantes cultivados presentaron formación de callo. Por otro lado, los resultados de este ensayo se asemejan a los obtenidos en *Cereus peruvianus*,

Gymnocalidium buldiamur y *Turbinicarpus laui* en las cuales se obtuvieron diferentes grados de inducción de callo friable sobre explantes cultivados en el medio MS con 1 ó 2 mg/L de BAP con 0,1 mg/L de ANA. (PASQUAL y HOSHIKA, 1992; MACHADO y PRIOLI, 1996; MATA *et al.*, 2001).

4.10.2 Brotación y rizogénesis: En el Cuadro 16 se muestran los porcentajes de brotación, del total de explantes vivos, sin contaminación. El mayor porcentaje de brotación (100%) se produjo en el último período de evaluación en ambos tratamientos; por lo tanto, el análisis estadístico se realizó al finalizar la 20ª semana de cultivo.

CUADRO 16 Porcentaje de brotación para la especie *Trichocereus sp.*, durante el período de cultivo *in vitro*.

Porcentajes de brotación de explantes (%)					
Tratamiento	Semanas de cultivo				
A	4 ^a	8 ^a	12 ^a	16 ^a	20 ^a
Brotos simples	0,0	0,0	91,7	75,0	25,0
Brotos múltiples	0,0	0,0	0,0	16,7	75,0
Brotación total	0,0	0,0	91,7	91,7	100,0
B					
Brotos simples	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Brotos múltiples	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
Brotación total	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0

Respecto de la rizogénesis, no se observó formación de raíces en ninguno de los tratamientos utilizados en este ensayo. Sólo se indujo formación de raíces al transferir los brotes desarrollados al finalizar el ensayo a un medio MS libre hormonas (Figura 31). En este medio enraizaron el 100% de los brotes trasferidos, transcurridas cuatro semanas de cultivo adicional.



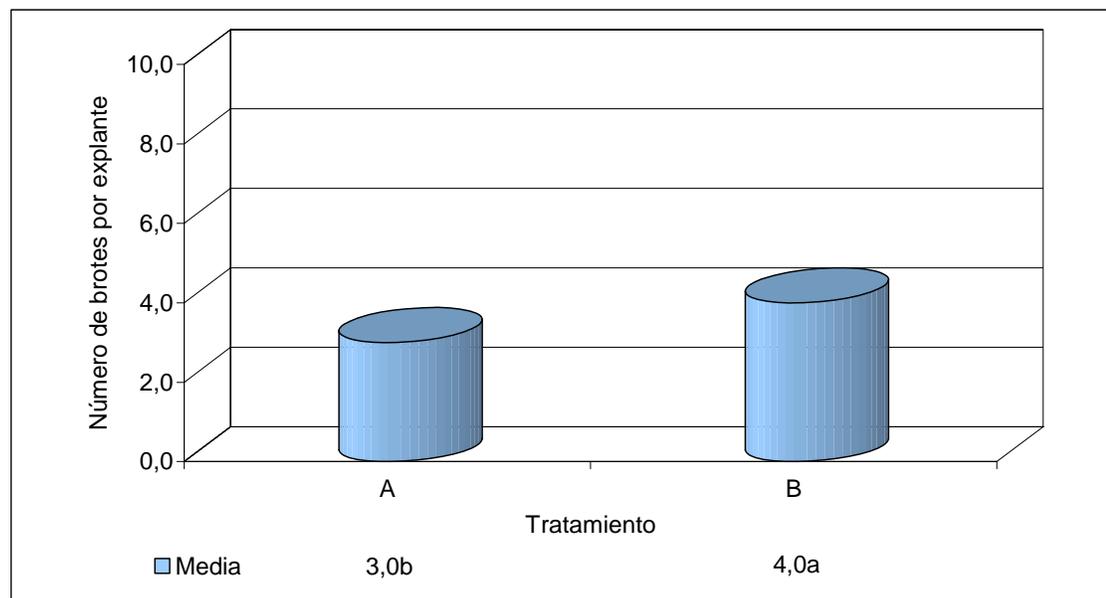
FIGURA 31 Brotación múltiple en explante de *Trichocereus sp.*, cultivados en el tratamiento B.

4.10.2.1 Número de brotes por explante. La prueba “t” de Student, presentada en el Anexo 26, indica que existe diferencia significativa, en cuanto al número de brotes por explante desarrollados en los tratamientos A y B. De esta manera, se indicó que el tratamiento B permitió la formación de más brotes por explante (areola); por lo tanto, se considera al medio MS con 2 mg/L de BAP y 0,1mg/L de ANA, adecuado para la formación de brotes en la especie *Trichocereus sp.*

En el tratamiento A, se pudo observar un promedio de 3 y un máximo de 4 brotes por areola, mientras que en el tratamiento B se obtuvo un promedio de 4 y un máximo de 6 brotes por areola (Anexo 27). La representación gráfica de este resultado se encuentra en la Figura 32.

La formación de brotes en *Trichocereus sp.* se obtuvo mediante la inducción de callo (organogénesis indirecta) y por la activación de areolas o yemas axilares (organogénesis directa). Estos resultados difieren de los obtenidos en la especie *Turbinicarpus laui*, donde sólo se obtuvo brotación múltiple a partir de callo en el medio MS con igual concentración hormonal (0,1 mg/L de ANA y 1 ó 2 mg/L de BAP) (MATA *et al.*, 2001). En el tratamiento A se pudo observar brotación simple, principalmente mediante la activación de

areolas y en el tratamiento B brotación múltiple y simple, a partir de inducción de callo y en menor medida por activación de areolas.

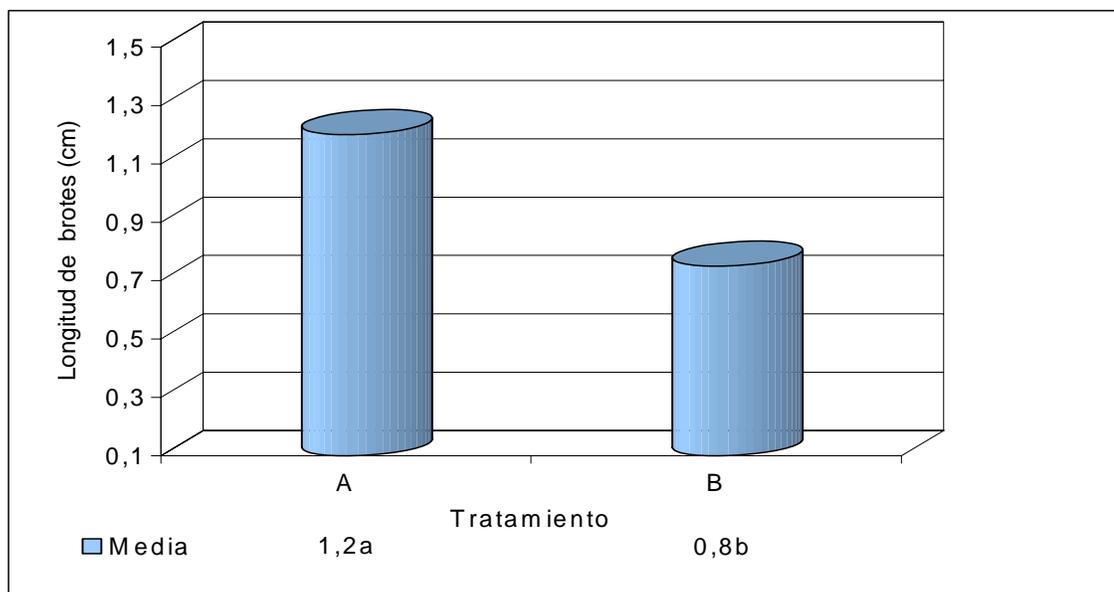


* Letras distintas indican diferencia estadística significativa al 1%.

FIGURA 32 Efecto de los tratamientos sobre la variable número de brotes por explante en la especie *Trichocereus sp.*

Respecto a la formación de brotes mediante inducción de callo OLIVEIRA *et al.* (1995), señalan que esta permite una multiplicación rápida de plantas, a partir de poco material vegetal y con bajo impacto en la población silvestre. Según MALDA *et al.* (1999a), el cultivo de tejido en cactus mediante la inducción de callo se ha desarrollado con gran éxito en varios miembros de la familia *Cactaceae*. No obstante, la formación de brotes mediante la activación de yemas axilares o areolas, también ha registrado excelentes resultados en el último tiempo, principalmente al utilizar ápices de brotes que contienen grandes cantidades de areolas (STARLING y DOODS, 1983; MARTÍNEZ -VÁZQUEZ y RUBLUO, 1989; GIUSTI *et al.* 2002).

4.10.2.2 Longitud de brotes. La prueba “t” de Student (Anexo 28) efectuada arrojó diferencia estadística significativa en cuanto a la longitud de brotes alcanzada en ambos tratamientos. Es así como, se observó una mayor elongación de brotes en el tratamiento A. La representación gráfica de estos resultados se indica en la Figura 33



* Letras distintas indican diferencia estadística al 5%.

FIGURA 33 Efecto de los tratamientos sobre la variable longitud de brotes en la especie *Trichocereus sp.*

De esta manera, se observaron brotes con una longitud promedio de 1,2 y 0,8 cm en los tratamientos B y A, respectivamente. Sin embargo, el mayor porcentaje de brotes presentó entre 0,6 – 1,0 cm de longitud (Anexo 40), al igual que en el ensayo de MATA *et al.* (2001), donde la mayoría de los brotes de *Turbinicarpus laui*, alcanzaron esta longitud.

5 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en cada ensayo, es posible concluir que:

- En *Copiapoa hypogaeae* y *Mammillaria elongata* la mejor respuesta a la formación y elongación de brotes se obtuvo en la concentración 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP (tratamiento A), principalmente mediante organogénesis indirecta, a través de una abundante inducción de callo.
- En *Opuntia berteri* el mayor número brotes por explante se logró con la concentración 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP (tratamiento A), principalmente mediante la activación de areolas (organogénesis directa). La mayor elongación de brotes se logró con 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP (tratamiento B). La inducción de callo fue escasa en ambos tratamientos.
- En *Trichocereus sp* se logró la formación de mayor número de brotes por explantes en la concentración 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP (tratamiento B), principalmente mediante organogénesis indirecta, a través de una abundante inducción de callo. La mayor elongación de brotes se logró con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP (Tratamiento A).
- En *Copiapoa chiañaralensis*, *Eriocyce sandillon* y *Loxanthocereus aurispinus*, no hubo respuesta a la formación de callo y brotes en ambas combinaciones de fitohormonas utilizadas.
- En *Neoporteria napina* se logró inducción de callo en los dos tratamientos durante las cuatro primeras semanas de evaluación; sin

embargo, no fueron suficientes para inducir la formación de brotes y raíces.

- En *Opuntia sp*, se obtuvo formación de callo y brotes en el tratamiento A con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.
- No fue posible la inducción de raíces en las especies evaluadas en los dos tratamientos utilizados. En la mayoría de las especies se observó algún grado de enraizamiento en los brotes al ser trasladados a un medio MS libre de fitohormonas.
- Los resultados obtenidos en la presente tesis permite aceptar la hipótesis planteada en esta investigación, ya que la aplicación de técnicas de propagación *in vitro* en algunos miembros de la familia *Cacataceae* representa una alternativa factible de utilizar, al permitir la multiplicación de genotipos importantes.

6 RESUMEN

Distintas especies de la familia *Cactaceae* fueron propagadas *in vitro* a partir de explantes apicales con una areola, extraídos de plantas adultas cultivadas *ex vitro* o *in vitro*. Se cultivaron en un medio Murashige y Skoog (MS) con 0,1 mg/L de ANA y dos concentraciones de BAP 1 y 2 mg/L bajo condiciones medioambientales controladas. El objetivo fue determinar la posibilidad de desarrollar la propagación *in vitro* de nueve especies de cactus a partir de areolas apicales. Se logró la formación de brotes adventicios y axilares en cinco de las especies en estudio. La mejor respuesta para el desarrollo de brotes en *Copiapoa hypogaea*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia berteri* y *Opuntia sp.*, se produjo en el medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP. En *Trichocereus sp.*, se logró una mayor formación de brotes en el medio de cultivo con 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP. No se logró el enraizamiento *in vitro* de los brotes cultivados en las dos combinaciones de fitohormonas, en ninguna de las especies estudiadas. Las especies *Opuntia berteri* y *Trichocereus sp.*, enraizaron espontáneamente en un medio MS libre de hormonas. La hiperhidricidad fue un problema que intervino el éxito del cultivo de algunas de estas especies, lo que se solucionó cambiando el gelrite por agar y aumentando la concentración hasta 5 g/L en el medio de cultivo. Por tanto se concluye de este modo, que la propagación *in vitro* mediante areolas apicales es factible en algunos miembros de la familia *Cactaceae*.

SUMMARY

Different species of *Cactaceae* were propagated *in vitro* from apical explants with areole, extracted of mature *ex vitro* or *in vitro* cultivated plant. The explants were cultured on Murashige & Skoog medium (MS) with 0,1 mg/L NAA and two concentrations of BAP and 1 and 2 mg/L, under controlled environmental conditions. The objective of this work was to determine the possibility of developing the *in vitro* propagation of nine cacti using apical areoles. The formation of adventitious and axillary shoots was achieved in five species. The best response for the development of shoots in *Copiapoa hypogaea*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia berteri* y *Opuntia sp.*, was achieved on medium supplemented with 0,1 mg/L NAA and 1 mg/L BAP. In *Trichocereus sp.*, the best response for the development of shoots was achieved on culture medium with 0,1 mg/L NAA and 2 mg/L BAP. The *in vitro* rooting of the cultivated shoots was not achieved at all with no phytohormonal combination, in none of the studies species. The species *Opuntia berteri* and *Trichocereus sp.*, rooted spontaneously in MS medium free of hormones. The hyperhydration intervened in the success of the cultivation of some of these species was solved changing gelrite for agar and increasing the concentration up to 5 g/L in the culture medium. Thus, it is concluded that the *in vitro* propagation by means of apical areoles is feasible in some members of the family *Cactaceae*.

7 BIBLIOGRAFIA

- ARENAS, M. y MARTINEZ, G. 2002. El cultivo *in vitro* en la propagación de las plantas. Tierra del fuego (on line). In: <http://www.tierradelfuego.org.ar/cardic/proveg.htm>. (23 de mayo del 2002).
- BHAU, B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (*Cactaceae*) from root explants. *Scientia Horticulturae* 81(3): 337 – 344.
- BOTANICAL. 2005. Adaptaciones de los cactus. Botanical (on line). In: <http://www.botanical-online.com.cactusadaptaciones.htm>. (31 de mayo 2005).
- BOTTI, C. 1987. Cultivo de tejidos vegetales “*in vitro*”. *Próxima Década* (Chile). 59: 10 – 11.
- BOTTI, C. 1989. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para países en desarrollo. *Revista de Extensión Agropecuaria Antumapu* (Chile). 3 (1 - 2):40 -43.
- BUSTAMANTE, R. 1996. Distribución, estado de conservación y uso de las cactáceas columnares en la región de Coquimbo. Tesis Lic. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. 101p.
- CASSELLS, A. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). *Micropropagation, Technology and*

- Application. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp 31 - 44.
- CONGER, B. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Boca Raton, Florida. CRC Press. 273p.
- CULLMANN, W. 1976. Kakteen, Einführung in die Kakteenkunde und Anleitung zu Erfolgreicher Kakteenkultur. Stuttgart, Germany. Verlag Ulmer. 280p.
- CLAYTON, P.; HUBSTENBERGER, J. y PHILLIPS, G. 1990. Micropropagation of members of the *Cactaceae* subtribe *Cactinae*. Journal of the American Society for Horticultural Science 115(2): 337 – 343.
- CRISOSTO, C. y RODRÍGUEZ, R. 1984. Micropropagación, Desarrollo simultáneo de múltiples tallos. El Campesino (Chile). 114(8): 22 - 25.
- DABEKAUSSEN, R.; PIERIK, R.; VAN DER LAKEN, J. y HOEK, J. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Scientia Horticulturae 46: 283 – 294.
- DEBERGH, P y READ, P. 1991. Micropropagation, In: Deberg, P y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation, Technology and Application. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp 1 – 13.
- GARCÉS, M. 2003. Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (*Cactaceae*), una especie en estado de conservación vulnerable endémica de Chile. Tesis Lic. Agr. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. 54p.

- GEORGE, E. y SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. London, England. Eastern Press. 709 p.
- GIUSTI, P.; VITTI, D.; FIOCCHETTI, F.; COLLA, G.; SACCARDO, F. y TUCCI, M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319 – 332.
- HAVEL, L. y KOLAR, Z. 1983. Microexplant isolation from *Cactaceae*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 2: 349 – 353.
- HEWSTONE, N. y REYES, M. 1999. Cultivo de tejidos en la agricultura. *Tierra Adentro (Chile)* 24: 30 – 33.
- HOFFMANN, A. 1989. Cactáceas, en la flora silvestre de Chile. Santiago (Chile), Fundación Claudio Gay. 272p.
- JOHNSON, J. y EMINO, E. 1979a. Tissue culture propagation in the *Cactaceae*. *Cactus and Succulent Journal (U.S.A.)* 51: 275 - 279.
- JOHNSON, J. y EMINO, E. 1979b. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14(5): 605 – 606.
- JOHNSON, J y EMINO, E. 1981. Axillary meristem development in *Mammillaria elongata* DC (*Cactaceae*). *Journal American Society for Horticultural Science* 106(1): 110 – 113.
- JUNG, W. 1981. Aplicación a la descripción del género *Copiapoa* Br. & R. (*Cactaceae*). *Investigación Agrícola (Chile)* 7(3):83 – 84.

- KIMBALL, J. 1986. Biología. 4ª ed. México. Wesley. 883p.
- LASSOCINSKI, W. 1985. Chlorophyll deficient cacti in tissue cultures. *Acta Horticulturae* 167: 287 – 291.
- LAZARTE, L., GAIZER, M. y BROWN, O. 1982. *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. *HortScience* 17 (1): 84.
- LLAMOCA, R.; STUDART, C.; LANDSMANN, J. y CAMPOS, F. 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus – indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 155 – 157.
- MACHADO, M. y PRIOLI, A. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) by areole activation. *In vitro Cellular Development Biology Plant* 32: 199 – 203.
- MALDA, G.; SUZÁN, H. y BACKHAUS, R. 1999a. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71 – 87.
- MALDA, G., BACKHAUS, R. y MARTIN, R. 1999b. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 1 – 9.
- MARSDEN, C. 1960. Cultivo de cactus. Barcelona, España. Garriga. 207p.
- MARTÍNES –VÁZQUEZ, O. y RUBLUO, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san –angelensis* Sánchez Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64(1): 99 – 105.

- MATA, M.; MONROY, M.; GOLDAMMER, K. y CHÁVEZ, V. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular Development Biology Plant* 37: 100 – 104.
- MAUSETH, J. D. 1977. Cytokinin and gibberellic acid induced effects on the determination and morphogenesis of leaf primordia in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 64(3): 337 – 346.
- MINOCHA, S. y MEHRA, P. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany* 61(2): 168 – 173.
- MILLER, I., FREUND J., y JOHNSON, R. 1992. Probabilidad y estadística para ingenieros. 4ª ed. México. Prentice Hall Hispanoamérica, S. A. 624p.
- MOLINA, G. 2002. El medio de cultivo (on line). In: <http://www.geocites.com/RainForest/Andes/3026/mediosde.htm>. (23 de mayo del 2002).
- MOOD, A. y GRAYBILL, F. 1976. Introducción a la teoría de la estadística. 4ª ed. Madrid, España. Aguilar. 536p.
- MUÑOZ, C. 1989. Panorama de la biotecnología de hoy. Próxima Década (Chile). 81: 6 – 9.
- MURASHIGE, T y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497.

- NOMURA, K. y KOMAMINE, A. 1999. Physiological and morphological aspects of somatic embryogenesis, *In*: Woong – Young, S y Bhojwani, B (ed). Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publisher. pp 115 – 131.
- OLIVEIRA, S., PIRES, M., PRIOLLI, A. y MANGOLIN, C. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* MILL. (Cactaceae). *In vitro Cellular Development. Biology Plant* 31:47 – 50.
- PAGANO, R. 1999. Estadísticas para las ciencias del comportamiento. 5ª ed. México, D. F. International Thomson. 548p.
- PAPAFOTIOU, M., BALOTIS, G.; LOUKA, P y CHRONOPOULOS, J. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163 – 167.
- PASQUAL, M y HOSHIKA, E. 1992. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de cactos *Gymnocalidium buldiamur* L. e *Mammillaria bocassana* L. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 27(4): 589 – 593.
- PÉREZ, E.; PÉREZ, M.; VILLALOBOS, E.; MEZA, E.; MORONES, L. y LIZALDE, H. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular Development Biology Plant*. 34: 131 – 135.
- PÉREZ, E.; PÉREZ, M.; DÁVILA, C. y VILLALOBOS, E. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hortscience* 37(4): 693 – 696. 2002.

- PÉREZ, E. y DÁVILA, C. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecycphora aselliformis* Ehrenberg, and *P. strobiliformis* Wedermann (*Cactaceae*). *In vitro Cellular Development Biology Plant*. 38 (1) 73 – 78.
- PIERIK, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid, España. Mundi – Prensa. 362 p.
- PEÑA, R. 1942. Jardinería y floricultura. 2ª ed. Barcelona, España. José Montesú. 471p.
- PINTO, R. 2002. *Lobivia ferox* Britton et Rose (*Cactaceae*), nuevo registro para la flora chilena. *Gayana Botánica* (on line) 59(2): 65-72. In: <http://www.scielo.cl>. (23 de Mayo del 2002).
- ROWLEY, G. 2003. What is an areole?. *British Cactus and Succulent Journal* 21(1): 4 – 11.
- RUBLUO, A., MARÍN, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A. y MÁRQUEZ, J. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long term *in vitro* subcultured *Mammillaria san – angelensis* Sánchez – Mejorada (*Cactaceae*). *Scientia Horticulturae* 95: 341 – 349.
- SEEMANN, P. 1985. El cultivo de tejidos como método de conservación de plantas en vías de extinción. *AgroSur* (Chile) 13 (2): 136 – 146.
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación, In: Barriga, P y Neira, C (ed). Cultivos no tradicionales. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Pp: 87 –145.

- SIVORI, E. 1980. Fisiología vegetal. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur. 681p.
- SOLAR, E. 1985. Usando técnicas de cultivo *in vitro*: Micropropagación de plantas. Próxima Década (Chile) 38: 24 – 27.
- SMITH, R.; BURDICK, P.; ANTHONY, J. y REILLEY, A. 1991. *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. HortScience 26(3): 315.
- STARLING, R. y DODDS, J. 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. Bradleya 1: 84 – 90.
- STARLING, R. y HUTSON. 1984. Sterile culture of succulent plants. British Cactus and Succulent Journal 2 (3): 69 – 70.
- STARLING, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cactus and Succulent Journal (U.S.A.) 57: 114 – 115.
- STEINHART, C. E. 1962. Tissue cultures of a cactus. Science 137: 545 – 546.
- STRASBURGER, E. 1993. Tratado de botánica. Traducido por Oriol de Bolás. 7^a ed. Barcelona, España. Omega. 1198 p.
- STRASBURGER, E. 1994. Tratado de botánica. Traducido por Oriol de Bolás. 8^o ed. Barcelona, España. Omega. 1070 p.
- SUDZUKI, F. 1999. Anatomía y Morfología. In: Barbera, G; Inglese, P y Pimienta, E. (eds). Agroecología cultivos y usos del nopal. Roma, Italia. FAO. pp: 29 – 36.

- TEILLIER, S. 2005. Curso de Botánica Sistemática División angiospermatophyta. Geocites (on line). In: www.geocites.com/calagualacl/guias.htm. (31 de mayo del 2005).
- VILLALOBOS, V. 1999. Aplicación del cultivo de tejidos para la micropropagación de la *Opuntia sp.* In: Barbera, G; Inglese, P y Pimienta, E. (eds). Agroecología, cultivo y usos del nopal. Roma (Italia). FAO. pp: 75 – 81.
- VILLALOBOS, V., MEJÍA, J. y ESCOBAR, H. 1991. Micropropagación de Opuntias y Agaves. In: Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. pp: 643-650.
- VYZKOT, B. y JARA, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. Journal of Horticultural Science 59(3): 449 – 452.
- WATTSSON, L. y DALLWITZ, M. 2005. The families of flowering plants. Biodiversity (on line). In: <http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/www/cactaceae.htm>. (31 de mayo 2005).
- ZIV, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Deberg, P y Zimmerman, R. (eds). Micropropagation, Technology and Application. Doordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp: 45 - 69.

ANEXOS

ANEXO 1 Composición del medio basal MURASHIGE y SKOOG (1962, mod).

Componente	mg/L (Solución final)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
FeNa ₂ EDTA	25
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5,6
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025
AlCl ₃	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.025
Tiamina	0,4
Inositol	100
Sacarosa	20000
Gelrite	2000

ANEXO 2 Test de Krukal Wallis para la variable hiperhidricidad en *Copiapoa hypogaea*, en la 12^a semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P
A	17	17,1	0,006535	0,935565ns
B	16	16,9		

ns: No significativo al 95% de confianza Valor P>0,05.

ANEXO 3 Test de Krukal Wallis para la variable hiperhidricidad en *Mammillaria elongata*, en la 8ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P**
A	14	13,1	0,857143	0,354538ns
B	12	14,0		

ns: No Significativo al 95% de confianza Valor $P > 0,05$.

ANEXO 4 Test de Krukal Wallis para la variable hiperhidricidad en *Opuntia berteri*, en la 12ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P**
A	17	17,7	0,974759	0,323494ns
B	15	15,1		

ns: No Significativo al 95% de confianza Valor $P > 0,05$.

ANEXO 5 Test de Krukal Wallis para la variable hiperhidricidad en *Trichocereus sp.*, en la 20ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P
A	12	14,3	0,0285	0,865772
B	15	13,8		

ns: No significativo al 95% de confianza Valor $P > 0,05$.

ANEXO 6 Test de Krukal Wallis para la variable hiperhidricidad en *Neoporteria napina*, en la 8ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P
A	18	19,8	0,241305	0,623265ns
B	19	18,3		

ns: No Significativo al 95% de confianza Valor $P > 0,05$.

ANEXO 7 Test de Kruskal Wallis para la variable inducción de callo en *Neoporteria napina*, en la 4ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P
A	18	17,1667	1,49607	0,221274ns
B	19	20,7368		

ns: No Significativo al 95% de confianza Valor $P > 0.05$.

ANEXO 8 Test de Kruskal Wallis para la variable inducción de callo en *Copiapoa hypogaea*, en la 8ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Lugar	Mediana	Grupos	Test	Valor P
A	17	1	5,0	a	26,7441	0,000000023 2256**
B	16	2	2,0	b		

** Significativo al 99% de confianza Valor $P < 0,01$.

ANEXO 9 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en *Copiapoa hypogaea*, en la 20ª semana de cultivo.

Parámetros descriptivos				
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	11	3,0	6,0	5,0
B	10	1,0	1,0	1,0
Tratamiento	Mediana	S ²	S	V
A	5,0	1,0	1,0	20,0
B	1,0	0,0	0,0	0,0

S²: Varianza; S: Desviación estándar; V: Coeficiente de variación.

ANEXO 10 Test de Krukal Wallis para la variable número de brotes por explante en *Copiapoa hypogaea*, en la 20ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Lugar	Mediana	Grupos	Test	Valor P
A	11	1	5,0	a	17,0606	0,0000362 07**
B	10	2	1,0	b		

** Significativo al 99% de confianza, Valor P<0,01.

ANEXO 11 Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en *Copiapoa hypogaea*., en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba "t"	Grados libertad	Valor P
1	A	1,0	a	3,03846	19	0,00676 016**
2	B	0,7	b			

**Letras diferentes indican diferencias significativas al 99% de confianza, Valor P<0,01.

ANEXO 12 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en *Copiapoa hypogaea*, en la 20ª semana de cultivo.

Parámetros descriptivos				
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	11	0,7	1,5	1,0
B	10	0,5	0,9	0,7
Tratamiento	Mediana	S ²	S	V
A	0,9	0,1	0,2	25,2
B	0,7	0,2	0,1	21,3

ANEXO 13 Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en *Mammillaria elongata*, en la 12ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Lugar	Mediana	Grupos	Test	Valor P
A	14	1	5,0	a	8,1039	0,0044157 3**
B	12	2	4,0	b		

** Significativo al 99% de confianza, Valor P<0,01.

ANEXO 14 Prueba “t” de Student para la variable número de brotes en e *Mammillaria elongata*, en la 20ª semana de cultivo

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos*	Prueba "t"	Grados libertad	Valor P**
1	A	5,0	a	-2,8619	24	0,0085948 2
2	B	3,0	b			

*Letras diferentes indican diferencias significativas al 99% de confianza, Valor P<0.01.

ANEXO 15 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes en *Mammillaria elongata*, en la 20ª semana de cultivo.

		Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media	
A	14	3,0	9,0	5,0	
B	12	2,0	5,0	3,0	
Tratamiento	Mediana	S ²	S	V (%)	
A	5.0	3,1	1,7	34,9	
B	3.0	1,0	1,0	29,1	

ANEXO 16 Análisis descriptivo según Tratamiento para la variable longitud de brotes en *Mammillaria elongata*, en la 20ª semana de cultivo.

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	14	0,6	1,2	0,9
B	12	0,4	1,0	0,7
Tratamiento	Mediana	S ²	S	V (%)
A	0,9	0,04	0,2	21,7
B	0,8	0,03	0,2	24,0

ANEXO 17 Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en *Mammillaria elongata*, en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba “t”	Grados de libertad	Valor P*
1	A	0,9	a	-2,48434	24	0,0203504
2	B	0,7	b			

*Letras diferentes indican diferencias significativas al 95% de confianza, Valor P<0,05.

ANEXO 18 Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en *Opuntia berteri*, en la 20ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Rango Medio	Test	Valor P
A	17	16,3	0,0209841	0,884822ns
B	15	16,7		

ns: No significativo al 95% de confianza Valor P>0,05.

ANEXO 19 Prueba “t” de Student para la variable número de brotes por explante en *Opuntia berteri*, en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba “t”	Grados de libertad	Valor P*
1	A	9,0	a	2,54602	30	0,0162701*
2	B	7,0	b			

* Letras diferentes indican diferencias significativas al 95% de confianza, Valor $P < 0,05$.

ANEXO 20 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en *Opuntia berteri*, en la 20ª semana de cultivo.

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	17	6,0	16,0	9,0
B	15	4,0	9,0	7,0
	Mediana	S ²	S	V
A	8,0	9,5	3,1	34,7
B	6,0	3,7	1,9	29,4

ANEXO 21 Prueba “t” de Student para la variable longitud de brotes en *Opuntia berteri*, en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba “t”	Grados de libertad	Valor P**
1	B	1,0	a	-2,75453	30	0,00989056*
2	A	0,7	b			*

* Letras diferentes indican diferencias significativas al 99% de confianza, Valor $P < 0,01$.

ANEXO 22 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en *Opuntia berteri*, en la 20ª semana de cultivo.

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	17	0,3	1,3	0,7
B	15	0,5	1,6	1,0
	Mediana	S ²	S	V (%)
A	0,7	0,05	0,23	32,9
B	0,8	0,12	0,35	35,2

ANEXO 23 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en *Opuntia sp.*, en la 20ª semana de cultivo..

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	15	1,0	12,0	5,0
B	2	1,0	5,0	3,0
	Mediana	S ²	S	V
A	4,0	10,6	3,3	68,9
B	3,0	8,0	2,8	94,3

ANEXO 24 Análisis descriptivo para la variable longitud de brotes mayor (cm) en *Opuntia sp.*, en la 8ª semana de cultivo.

Parámetros descriptivos				
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	15	0,4	1,7	1,0
B	2	1,5	2,0	1,8
	Mediana	S ²	S	V
A	1,0	0,2	0,4	39,1
B	1,8	0,1	0,4	20,2

ANEXO 25 Test de Krukal Wallis para la variable inducción de callo en *Trichocereus sp.*, en la 20ª semana de cultivo.

Tratamiento	Tamaño muestra	Lugar	Mediana	Grupos	Test	Valor P**
A	12	1	5,0	a	20,7692	0,0000052*
B	15	2	3,0	b		*

** Significativo al 99% de confianza, Valor P<0,01.

ANEXO 26 Prueba “t” de Student para el número de brote por explante en *Trichocereus sp.*, en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba “t”	Grados de libertad	Valor P**
1	B	4,0	a	-4,29605	25	0,0002312
2	A	3,0	b			53

** Letras diferentes indican diferencias significativas al 99% de confianza, Valor P<0.01.

ANEXO 27 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable número de brotes por explante en *Trichocereus sp.*, en la 20ª semana de cultivo.

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	12	1,0	4,0	3,0
B	15	1,3	6,0	4,0
	Mediana	S ²	S	V
A	2,5	1,4	1,2	46,7
B	4,0	1,3	1,1	25,4

ANEXO 28 Prueba “t” de Student para la variable longitud de brote en *Trichocereus sp.*, en la 20ª semana de cultivo.

Lugar	Tratamiento	Media	Grupos	Prueba “t”	Grados de libertad	Valor P**
1	B	1,2	a	2,18023	25	0,0388638
2	A	0,8	b			

* Letras diferentes indican diferencias significativas al 95% de confianza, Valor $P < 0,05$.

ANEXO 29 Análisis descriptivo según tratamiento para la variable longitud de brotes en *Trichocereus sp.*, en la 20^a semana de cultivo.

	Parámetros descriptivos			
Tratamiento	Tamaño muestra	Mínimo	Máximo	Media
A	12	0,9	2,0	1,2
B	15	0,5	1,2	0,8
	Mediana	S²	S	V (%)
A	1,1	0,09	0,30	25,9
B	0,6	0,06	0,24	31,8