

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



Micropropagación de varios cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.)
Miller (Cactaceae)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS ALBERTO ZUÑIGA RIZO

ZAPOPAN, JALISCO, OCTUBRE DE 2012



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD. BIOL. 215/2012

C. CARLOS ALBERTO ZUÑIGA RIZO
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción: TESIS, con el título "MICROPROPAGACIÓN DE VARIOS CULTIVARES DE *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (Cactaceae)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al Dr. Liberato Portillo Martínez, y como asesor a: M.C. Rafael Soltero Quintana.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 24 de octubre, del 2012.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Verónica Palomera Gtv

M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

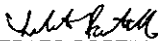
Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informes, opción tesis con el título: "MICROPROPAGACIÓN DE VARIOS CULTIVARES DE *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (Cactaceae)" que realizó el pasante ZUÑIGA RIZO CARLOS ALBERTO con número de código 302448459 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

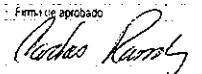

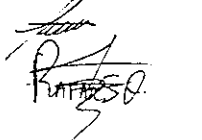
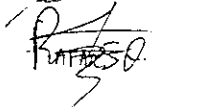
Las Agujas, Zapopan, Jalisco 19 de Octubre de 2012.




DR. LIBERATO PORTILLO MARTINEZ
 DIRECTOR



MC. RAFAEL SOLTERO QUINTANA
 ASESOR

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma y aprobado	Fecha de aprobación
DR. CARLOS RAMIREZ SERRANO		01/11/2012
DRA. HILDA ARREOLA NAVA		09 oct 2012
DRA. ANA LILIA VIGUERA GJZMÁN Supl. MC. RAFAEL SOLTERO QUINTANA		22/oct/2012
		23/oct/2012

V. B. O.


AGRADECIMIENTOS

Agradezco al divino que es la energía cósmica intangible dadora de vida.

También agradezco a mis padres por la paciencia y por el apoyo para terminar todos mis estudios.

A mi director de tesis el Dr. Liberato Portillo Martínez y a la Dra. Ana Lilia Viguera que me han enseñado que todo es posible mediante el trabajo constante y por su apoyo para cumplir una fase de mi sueño.

A mi asesor tesis el Dr. Rafael Soltero Quintana por corregirme mis errores y hacer de mí un mejor investigador.

A mis amigos y compañeros en especial a Enhé por brindarme su apoyo y su amistad durante toda la carrera.

A María por darme la sabiduría y paciencia durante todo el camino de la Licenciatura.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>Opuntia ficus-indica</i>	3
2.2 USOS	3
2.2.1 Fruta	3
2.2.2 Verdura	4
2.2.3 Forraje	4
2.2.4 Obtención de grana cochinilla	5
2.2.5 Otros	5
2.3 AGENTES PATÓGENOS	5

2.4 MÉTODOS DE REPRODUCCIÓN	6
2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	7
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
4.1 HIPÓTESIS	10
4.2 OBJETIVOS	10
4.2.1 OBJETIVO GENERAL	10
4.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	10
5. METODOLOGÍA	11
5.1 MATERIAL VEGETAL	11
5.2 EXPERIMENTOS	11
5.2.1 Etapa 1. Establecimiento <i>in vitro</i>	11
5.2.2 Etapa 2. Proliferación de yemas	11
5.2.2.1 Experimento 1	12
5.2.2.2 Experimento 2	12
5.2.2.3 Experimento 3	12

5.2.2.4	Experimento 4	12
5.2.2.5	Experimento 5	13
5.2.2.6	Experimento 6	13
5.2.2.7	Experimento 7	13
5.2.2.8	Experimento 8	13
5.2.3	Etapa 3. Generación de raíces	14
5.2.3.1	Experimento 9	14
5.2.3.2	Experimento 10	15
5.2.3.3	Experimento 11	16
5.2.3.4	Experimento 12	16
5.2.4	Etapa 4. Establecimiento <i>ex vitro</i>	19
5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1	EXPERIMENTOS	20
6.1.1	Etapa 1. Establecimiento <i>in vitro</i>	20
6.1.2	Etapa 2. Proliferación de yemas	20

6.1.2.1 Experimento 1	20
6.1.2.2 Experimento 2	20
6.1.2.3 Experimento 3	21
6.1.2.4 Experimento 4	21
6.1.2.5 Experimento 5	22
6.1.2.6 Experimento 6	22
6.1.2.7 Experimento 7	22
6.1.2.8 Experimento 8	24
6.1.3 Etapa 3. Generación de raíces	24
6.1.3.1 Experimento 9	24
6.1.3.2 Experimento 10	25
6.1.3.3 Experimento 11	26
6.1.3.4 Experimento 12	26
6.1.4 Etapa 4. Establecimiento <i>ex vitro</i>	26
7. CONCLUSIONES	31
8. LITERATURA CITADA	32

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Material vegetal	16
Figura 2. Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de los cultivares "Toño" y "Filiberto" condiciones de incubación.	17
Figura 3. Material para el establecimiento <i>ex vitro</i>	18
Figura 4. Explantes con y sin ápice	18
Figura 5. Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes	27
Figura 6. Proliferación de yemas	28
Figura 7. Generación de raíces	29
Figura 8. Establecimiento <i>ex vitro</i> de plántulas	30

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Experimentos para la proliferación de yemas	14
Cuadro 2. Experimentos para la generación de raíces	15
Cuadro 3. Resultados de la proliferación de yemas	23
Cuadro 4. Resultados para la generación de raíces	25

RESUMEN

En el presente trabajo se realizaron investigaciones con el propósito de generar protocolos de micropropagación *in vitro* de algunos cultivares de la especie *Opuntia ficus-indica*, ya que en México es el soporte económico para las familias de diferentes regiones del país donde es cultivado y utilizado como fruta, verdura, forraje y para la producción de grana cochinilla. Se llevó a cabo el establecimiento *in vitro* de dos cultivares de *Opuntia ficus-indica*. Para la proliferación de yemas se realizaron varios experimentos donde se evaluaron diferentes dosis de 6-bencilaminopurina (BA), 6-furfurilaminopurina (KIN) y 6- γ,γ -dimetilalilaminopurina (2ip). Se observó un mayor promedio de brotes (52 brotes por explante) en medio de Murashigue y Skoog (MS) adicionado con el regulador BA a una concentración de 2.2 mg/L, 3% sacarosa y con 30 d como tiempo de estimulación. Para la generación de raíces se utilizaron diferentes dosis de ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido α -naftalenacético (ANA), carbón activado y MS sin reguladores. Se obtuvo una mayor producción de raíces (6.8 brotes por explante) en el medio MS libre de reguladores de crecimiento. El establecimiento *ex vitro* se llevó a cabo con éxito en el sustrato utilizado.

1. INTRODUCCIÓN

El interés del ser humano por las plantas conocidas en nuestro país como nopales data de miles de años. Su origen e historia están íntimamente relacionados con las antiguas civilizaciones mesoamericanas, en particular con la cultura Azteca. Existen evidencias arqueológicas de su cultivo hechos por las poblaciones indígenas asentadas en las zonas semiáridas de Mesoamerica (Pimienta, 1990). Los Aztecas denominaron *nopalli* a las plantas que hoy conocemos como nopal; dichos *nopalli* fueron una fuente indispensable de alimento y líquido potable durante el prolongado y difícil periodo de búsqueda del "sitio prometido" que nombraron Tenochtitlán, donde hoy se asienta la Ciudad de México (Flores-Valdez, 2003). Se encontraron evidencias sobre el conocimiento y uso del nopal desarrollado por los primeros pobladores mexicanos, éstas se encuentran en las excavaciones de Tamaulipas y Tehuacán, Puebla, donde se descubrieron semillas y cascara de tunas fosilizadas, así como fibras de pencas de nopal, con una antigüedad de 7 mil años (Flores-Valdez, 1995). La historia refiere que Hernán Cortes llegó al Valle de México en 1519, y se asombró por la diversidad de frutos y particularmente con los *nopalli* y las tunas (*nochtli*) (Sáenz *et al.*, 2006). El nopal fue utilizado como alimento por los indígenas, conocidos actualmente como nopalitos, los cuales se preparaban cocidos, tostados en el comal y guisados con carne de animales silvestres (Sodi, 1968).

México es el principal productor y consumidor de la fruta del nopal conocida como tuna en el mundo (Gallegos y Méndez, 2000). En 2009 la tuna ocupó el 3.8% de la superficie sembradas de frutas en México (Financiera Rural, 2011). La superficie para el cultivo de nopal tunero reportada por el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria Pesquera, SAGARPA), cubre una superficie de 57,692.55 ha y se cosechó en 48,744.40 ha, con una producción de 352,374.15 ton (SIAP, 2011). También es el principal productor de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill), con una superficie cultivada de 12,644.61 ha (SIAP, 2011). Las principales entidades productoras son: Distrito Federal con 4,159 ha, Morelos con 1,745 ha, Estado de México con 785 ha y Baja California con 491 ha (Salinas *et al.* 2006).

El cultivo del nopal como forraje ocupó en el año 2009 el 0.4% de la superficie sembrada de forrajes en México e indica que la superficie para el cultivo del nopal forrajero

ha crecido cerca de doce veces respecto al año 2000. En 2009 la superficie sembrada fue de 18,085 ha, pero sólo se cosecharon 4,530 y una producción de 118,000 ton (Financiera Rural, 2011).

En cuanto al cultivo del nopal para la cría de grana cochinilla en México se tiene una superficie de aproximadamente 100 ha (Pacheco, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Opuntia ficus-indica*

El nopal (*Opuntia* spp) es un género de la familia Cactaceae (Salim *et al.*, 2009) cuyas especies se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas de América. México, por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y clima es el país que alberga la mayor cantidad de especies (Bravo-Hollis, 1978). Hay casi 300 especies del género *Opuntia* desde Canadá hasta la Patagonia. En México se registraron 104 especies y variedades (Scheinvar, 1999); sin embargo, sólo diez o doce son utilizadas por el hombre (Financiera Rural, 2011).

La familia de las cactáceas, en cuanto a su origen, es sudamericana. En México se originaron algunas de las especies más comerciales como *O. ficus-indica* (L.) Miller (Griffith, 2004), la cual fue llevada en el siglo XVI a España por los conquistadores, y después fue diseminada en los países de la cuenca del Mediterráneo y del norte de África (Pimienta y Muñoz-Urías, 1999).

2.2 USOS

2.2.1 Fruta

En el centro del país se destaca la importancia del nopal como fruto debido a que en el valle de México alcanza su mayor producción (Bautista, 1982). El consumo de la tuna era común entre los nativos de los altiplanos de México durante la época prehispánica (Inglese, 1999). La tuna es un fruto tipo baya, que varía en forma, tamaño y color, con una acidez baja que hace sea muy dulce y delicioso (Salim *et al.*, 2009); puede consumirse fresca o industrializada y es posible obtener jugo para preparar miel, jarabes, mermeladas, melcochas, queso de tuna, colorante y hasta bebidas alcohólicas como el aguardiente como subproductos (de la Rosa y Santamaría, 1998). La principal especie cultivada en el mundo para la producción de fruta es *O. ficus-indica* (L.) Miller. Debido a antecedentes históricos y culturales en México se cultivan con este propósito *O. streptacantha* Lemaire, *O. lindheimeri* Engelm, *O. amyclaea* Tenore, *O. megacantha* Salm-Dyck y *O. robusta* Wendland (Sáenz *et al.*, 2006). El nopal para la producción de tuna se cultiva en diversos

países: Argentina, Chile, Colombia, Estados Unidos, Israel, Italia, México, Sudáfrica, entre otros (Flores-Valdez, 1999).

2.2.2 Verdura

La producción de nopal para verdura (nopalitos) se concentra en el centro de México, en donde se tiene casi todo el año con excepción de los meses de invierno, cuando ocurren heladas en el Altiplano Mexicano. Éstos se recolectan, se eliminan las espinas y las gloquidas, se pesan y empacan en arpilleras para ser transportados a mercados donde son vendidos en fresco (Flores-Valdez, 1999); se comen como nopalitos en salmuera, nopalitos en escabeche, mermeladas, dulces, licores, etc. (Ríos y Quintana, 2004). El nopal para verdura se obtiene a partir de los brotes tiernos de la mayoría de las especies y variedades que bajo cultivo ofrecen características que las hacen más deseables (de la Rosa y Santamaría, 1998). Las especies que se utilizan para este propósito son: *O. ficus-indica*, *O. atropes* Rose, *O. robusta* Wendland y *O. leucotricha* de Candolle (Pimienta y Muñoz-Urías, 1999). A nivel internacional, México es el único país que consume y exporta nopal verdura, principalmente a los nichos de mercado conformados por residentes de origen mexicano en Estados Unidos (Berger *et al.*, 2006).

2.2.3 Forraje

El nopal se utiliza en el Norte de México en las áreas marginales para la agricultura tradicional, como forraje a manera de suplemento alimenticio para el ganado (Pimienta, 1990). En estas zonas la producción de forraje es pobre e irregular durante todo el año y muy variable debido principalmente a la escasa y errática precipitación pluvial que las caracteriza. Se emplea cuando hay sequía y no existe otro forraje verde para proporcionarse al ganado, entonces se aprovecha en sus mejores condiciones, cuando tiene menor porcentaje de agua (Flores-Aguirre, 1989). Las especies más importantes de uso forrajero son: *O. leucotricha*, *O. streptacantha*, *O. robusta*, *O. cantabrigiensis* Lynch, *O. rastreera* Weber, *O. lindheimeri* y *O. phaeacantha* Engelm (López-García *et al.*, 2003). El uso como forraje posee importancia a nivel mundial, en algunas regiones como el norte de África y países como Sudáfrica, Brasil, Estados Unidos, y México se han realizado trabajos sobre el uso del nopal forrajero (Reynolds y Arias, 2003).

2.2.4 Obtención de grana cochinilla

En el sur de México, el nopal se destaca principalmente por la producción de grana. La grana o cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) es un insecto que produce el carmín, un colorante rojo que ha vuelto a tomar importancia a raíz que se prohibieron los colorantes artificiales en 1976, porque son cancerígenos (Flores-Valdez, 2003). Estos colorantes orgánicos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, textil, farmacéutica y cosmetología, dado su alto poder colorante, su inocuidad para la salud, su estabilidad y su compatibilidad (Méndez, 1999). El aprovechamiento de la grana se remonta desde los Toltecas (Granados y Castañeda, 1991), y se utilizó para teñir textiles, esculturas, edificios murales y códices (Pimienta, 1990). Desde la época Prehispánica para la cría de la grana cochinilla se utilizan diversas especies de *Opuntia* entre las que destacan: *O. atropes*, *O. ficus-indica*, *O. jaliscana* Bravo (*O. ictérica* Griffiths), *O. megacantha*, *O. streptacantha* y *O. tomentosa* Salm-Dyck (Portillo y Arreola, 1994) y *O. cochenillifera* Miller (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), entre otras (Financiera Rural, 2011). A nivel mundial los países productores de grana cochinilla son: Argentina, Bolivia, Chile, China, Ecuador, España (Islas Canarias), Etiopía Filipinas, México, Nueva Zelanda, Perú y Sudáfrica (Viguera, 2010).

2.2.5 Otros

El nopal también se utiliza en muchos países para proteger al suelo de la erosión hídrica y eólica, y evitar la desertificación en zonas áridas y semiáridas, formando setos en curvas de nivel, que soportan las condiciones del medio árido (Flores-Valdez, 2003). Asimismo, se utiliza como planta medicinal combate el exceso de colesterol en la sangre e impide el aumento en los niveles de glucosa por lo cual es eficaz para el tratamiento de la diabetes (Murria, 1997). También se utiliza como materia prima en la producción de cosméticos, para elaborar bebidas alcohólicas y como cerco vivo (Flores-Valdez, 2003).

2.3 AGENTES PATÓGENOS

El nopal como el resto de las plantas no escapa a la interacción con los demás organismos o microorganismos que están presentes en su medio, como los son hongos, bacterias, nematodos, virus, entre otros (Gallegos y Méndez, 2000). Estos organismos son

un problema para los productores cuando se manifiestan en enfermedades, las cuales son infectivas (bióticas) y no infectivas (abióticas). Las primeras son causadas por varios agentes vivos como bacterias, micoplasmas, hongos, nematodos, y virus; en tanto las segundas son causadas por condiciones climáticas adversas, deficiencias nutricionales, toxicidad de minerales y por anomalías genéticas (Granata, 1999) como la proliferación excesiva de yemas (Pimienta, 1990).

La enfermedad más visible en los nopales es la necrosis bacteriana causada por *Erwinia carnegieana* Standring, microorganismo que infecta las pencas por heridas provocadas por insectos (Granados y Castañeda, 1991).

Las pencas o plantas infectadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz presentan manchas de color café con tonalidades rojizas, que generalmente inician en el borde de las pencas y van invadiéndolas hacia la base. En ocasiones estas manchas se presentan en los frutos (Hernández y Amaro, 1998). Las lesiones ocasionadas por el hongo *Pseudocercospora opuntiae* Ayala-Escobar son subcirculares, por lo general son irregulares, de 2-4 cm de diámetro, de color grisáceo-marrón, marrón oscuro a negro oscuro (Ayala-Escobar *et al.*, 2006).

En poblaciones silvestres de *Opuntia* es común la presencia de virus, los síntomas más comunes que presentan las plantas de nopal son la proliferación excesiva de yemas, presencia de mosaicos y de manchas cloróticas (Pimienta, 1990).

Las enfermedades que se presentan en las huertas de nopal verdulero, por lo general se deben al mal manejo en el corte y el traslado de las pencas para su cultivo; al nulo control de maleza en las huertas, que ocasionan alta humedad en las pencas (Ríos y Quintana, 2004).

2.4 MÉTODOS DE REPRODUCCIÓN

Las especies de nopal se reproducen vía sexual y asexual: la reproducción sexual o por semillas es donde las plantas cultivadas tardan más tiempo en iniciar la producción de frutos, además presentan variación en sus características, por proceder de polinización cruzada (de la Rosa y Santamaría, 1998) debido a la fusión de los gametos (George, 1993), lo cual provee el fundamento para trabajos de mejoramiento genético. La reproducción asexual o vegetativa que resulta más ventajosa, desde el punto de vista comercial, debido a

que se conservan las características fenotípicas de la planta madre. Las plantas obtenidas por este método crecen y fructifican en períodos más cortos que la reproducción sexual. Esta forma de reproducción puede realizarse por dos métodos: de pencas enteras o de fracciones mínimas (de la Rosa y Santamaría, 1998) o por micropropagación *in vitro* (Ramírez-Serrano y Soltero 2007).

2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Desde hace más de un siglo se aplica la técnica de cultivo de tejidos (Hurtado y Merino, 1994), que implica el cultivo de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre y cultivada en medio artificial. El fundamento de las técnicas y métodos desarrollados por esta disciplina biotecnológica son el conocimiento científico generado por la fisiología vegetal, genética, bioquímica, biología celular y molecular, química, física, botánica entre otras, para generar nuevos productos (George, 1993). La micropropagación es una técnica desarrollada para la producción en masa de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde la década de 1960 (Cañal *et al.*, 2001) para la obtención de plantas completas a partir de células o de tejidos cultivados *in vitro*, es decir, cultivados en condiciones asépticas y controladas (Ancora *et al.*, 2004). La micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se puede citar el potencial de generar grandes cantidades de plantas de genotipos sobresalientes en una superficie reducida a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control fitosanitario del material que se propaga y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos (Abdelnour y Vincent, 1994). Mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales se pueden estudiar diferentes fenómenos morfogénicos y totipotentes que ayudan a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en dicho proceso y en la diferenciación de partes aisladas de la planta (Hurtado y Merino, 1994). Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores de crecimiento vegetal, también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Estos compuestos orgánicos son sintetizados por la propia planta, que en pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de las plantas (Pérez *et al.*, 1999).

El proceso de micropropagación consta de cinco etapas 0-IV, 0 selección y preparación de la planta madre, I establecimiento del cultivo aséptico, II producción de propágulos adecuados, III preparación para el crecimiento en condiciones naturales (IIIa elongación de brotes formados en la etapa II, IIIb enraizamiento de la etapa IIIa) y IV transferir al ambiente natural (George, 1993). Existen tres sistemas de micropropagación los cuales son el cultivo de yemas y meristemos, la organogénesis y la embriogénesis somática. El cultivo de meristemos permite la producción de plantas teóricamente idénticas desde el punto de vista genético. A partir del cultivo de meristemos *in vitro* es posible establecer asépticamente el cultivo de un brote de la planta que, en condiciones de cultivo adecuadas es estimulado a desarrollar brotes axilares (Ancora *et al.*, 2004). Este sistema de propagación se basa en la estimulación de meristemos axilares ó areolas (cactáceas) o en el crecimiento de nuevos brotes secundarios a partir de meristemos preexistentes, por lo que no implica fenómenos de competencia celular como los que ocurren en la organogénesis y embriogénesis somática (Pérez *et al.*, 1999). Existen diferentes tipos de meristemos como de raíz, tallo (principales y laterales) e intercalares, así como también de engrosamiento de meristemos primarios y meristemos secundarios, como el felógeno y el cambium vascular (Hurtado y Merino, 1994). Por otra parte, la organogénesis y la embriogénesis somática pueden ser directas, cuando tiene lugar en células somáticas como el parénquima que reprograman su núcleo y se genera un organismo completo, o bien indirecta cuando primeramente se genera callo o células totipotentes que bajo condiciones adecuadas generen los órganos o estructuras bipolares (Pérez *et al.*, 1999). La embriogénesis somática es la formación de un embriode a partir de una célula somática, sin la necesidad de la fusión de gametos (George, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

El nopal es una hortaliza que se consume principalmente en fresco y es necesario obtener productos sanos e inocuos, por lo cual es primordial una determinación etiológica para un buen manejo del cultivo (Salinas *et al.*, 2006).

La productividad de algunas variedades como la de "Milpa Alta" se reduce por varios factores, entre los que están de índole fitosanitaria. En el municipio de Tlalnepantla y otros adyacentes, la mancha negra detectada en 1990, es la principal causa de la baja productividad y aún de la pérdida total en muchas huertas, sobre todo de aquellas ubicadas en las partes con mayor altitud y con mal manejo. Respecto a la etiología de la enfermedad, se menciona como agente causal a *Colletotrichum gloeosporioides* y a *Fusarium solani* (Salinas *et al.*, 2006) y también *Pseudocercospora opuntiae* (Ayala-Escobar *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma (Abdelnour y Vincent, 1994), también generar grandes cantidades de plantas de genotipos sobresalientes y para producir plantas en peligro de extinción o con pocos individuos.

El cultivo *in vitro* de meristemos es un poderoso sistema para obtener plantas libres de virus, porque el meristemo apical utilizado para iniciar el cultivo es un tejido compuesto por pocas centenas de células generalmente no infectadas y por carecer de tejidos de conducción (xilema y floema) que es por donde generalmente se desplazan algunos patógenos (Ancora *et al.*, 2004). Además la micropropagación tiene como base utilizar plantas en estado axénico, y por lo tanto se puedan producir plantas sanas pero no resistentes a enfermedades.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

La adición de diferentes dosis de reguladores de crecimiento del tipo citocinina y auxina a un medio de cultivo axénico, permitirá una micropropagación eficaz de diversos cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo general

Generar cuatro protocolos de micropropagación para la reproducción asexual de seis cultivares de *O. ficus-indica*.

4.2.2 Objetivos particulares

Lograr el establecimiento *in vitro* de dos cultivares de *O. ficus-indica* mediante un protocolo de desinfección.

Evaluar diferentes dosis de citocininas para la proliferación de brotes axilares en tres cultivares de *O. ficus-indica*.

Evaluar diferentes dosis de auxinas para la producción de raíz en tres cultivares de *O. ficus-indica*.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de la especie *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller procedentes de plantaciones comerciales de diversos estados de la República Mexicana; se manejaron pencas jóvenes de plantas de campo de los cultivares "Toño" (Figura 1c) y "Filiberto" y plantas previamente establecidas *in vitro* de los cultivares "Lucia p03" (Figura 1b), "blanca 1a", "morada 4" y un cultivar "desconocido" (Figura 1a).

5.2 EXPERIMENTOS

5.2.1 Etapa 1. Establecimiento *in vitro*

Desinfección

Para el establecimiento *in vitro* de los cultivares "Toño" y "Filiberto" se utilizaron pencas jóvenes las cuales para su desinfección fueron sumergidas durante 10 min en una solución de agua estéril: cloro comercial al 6% (50:50 v/v) y dos gotas de detergente líquido, luego se realizaron tres enjuagues en agua estéril (Figuras 2a y 2b) para posteriormente ponerlos en medio de cultivo MS (Murashigue y Skoog, 1962). Este medio fue suplementado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 2 g/L de carbón activado (Figura 2c), se ajustó el pH 5.8 y se esterilizó en autoclave a 120° C bajo 1.22 kg/cm² de presión durante 15 min.

Posteriormente los cultivos ya establecidos, así como el resto de experimentos *in vitro* se colocaron en incubación a temperatura de 27 ± 2° C con un fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad) a 1,500 lux (Figura 2d).

5.2.2 Etapa 2. Proliferación de yemas

Se realizaron ocho experimentos utilizando explantes de 2 cm de altura que estaban previamente establecidos de plantas de los cultivar "Lucia p03", "blanca 1a" y plantas de un cultivar "desconocido" que fueron subcultivados en medio MS.

5.2.2.1 Experimento 1

En el primer experimento se utilizó un explante sin ápice por unidad experimental del cultivar "desconocido" (Figura 4b), que fue transferido a medio de estimulación MS adicionado con agar, la citocinina KIN (6-furfurilaminopurina) a baja y alta concentración (0.5 y 5.0 mg/L respectivamente) y sacarosa (30 y 50 g/L). El explante fue evaluado a diferentes tiempos de estimulación (15 y 30 d). Se tuvieron ocho tratamientos con ocho repeticiones con un total de 64 unidades experimentales (Cuadro 1). Las evaluaciones se realizaron cada 15 d durante dos meses. A los 15 y 30 d respectivamente fueron transferidos a medio de expresión (MS sin reguladores de crecimiento con 2 g/L de carbón activado).

5.2.2.2 Experimento 2

Se utilizó un explante sin ápice por unidad experimental, del cultivar "desconocido". Se tuvieron cuatro tratamientos con doce repeticiones con un total de 48 unidades experimentales; se comparó la respuesta de los reguladores de crecimiento KIN o BA (6-bencilaminopurina) a 0.5 mg/L y diferentes concentraciones de sacarosa (30 y 50 g/L) en medio MS con agar (Cuadro 1). La evaluación se realizó cada 15 d por dos meses y a los 30 d se subcultivaron en medio de expresión.

5.2.2.3 Experimento 3

El tercer experimento se tuvieron cuatro tratamientos con seis repeticiones y un total de 24 unidades experimentales se utilizó un explante con ápice por unidad experimental del cultivar "desconocido" (Figura 4a), y se cultivaron en medio MS adicionado con agar, 30 g/L de sacarosa, las citocininas KIN ó 2ip (6- γ - γ - dimetilalilaminopurina) a 1.0 mg/L con ó sin carbón activado (Cuadro 1). A los 30 d fueron transferidos a medio de expresión. Las evaluaciones se realizaron cada 15 d durante dos meses.

5.2.2.4 Experimento 4

Se utilizaron dos explantes con ápice por unidad experimental del cultivar "desconocido" en medio MS con diferentes dosis de KIN (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L), sacarosa y agar. Se evaluaron cada 15 d durante dos meses (Cuadro 1). A los 30 d fueron

puestos en medio de expresión. Se tuvieron seis tratamientos con cuatro repeticiones por unidad experimental con un total de 24 unidades experimentales.

5.2.2.5 Experimento 5

En el quinto experimento se tuvieron seis tratamientos con cuatro repeticiones con un total de 24 unidades experimentales y se cultivaron dos explantes por unidad experimental con ápice del cultivar "desconocido", en medio MS adicionado con sacarosa, agar y 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L de BA (Cuadro 1). A los 30 d de cultivo se pasaron a medio de expresión y se evaluaron cada 15 d durante dos meses.

5.2.2.6 Experimento 6

Este experimento es la repetición del trabajo realizado por Escobar (1986), se utilizó un explante con ápice por unidad experimental del cultivar "desconocido", que fueron cultivados en medio MS suplementado con sacarosa, agar y el regulador de crecimiento BA a diferentes concentraciones (0, 0.2, 2.2, 5.6 y 11.2 mg/L) (Cuadro 1). Se tuvieron cinco tratamientos con cuatro repeticiones con un total 20 unidades experimentales. Las evaluaciones se realizaron cada 15 d durante 100 d para posteriormente ser pasados a medio de expresión.

5.2.2.7 Experimento 7

Para este experimento se tuvieron siete tratamientos con cuatro repeticiones con un total de 28 unidades experimentales donde se utilizó un explante con ápice por unidad experimental del cultivar "Lucia p03", y se cultivó en medio MS suplementado con sacarosa, agar y diferentes concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 2.2 mg/L) (Cuadro 1); a los 30 d se cultivó en medio de expresión. Se evaluó cada 15 d durante dos meses.

5.2.2.8 Experimento 8

Se tuvieron cuatro tratamientos con ocho repeticiones con un total de 32 unidades experimentales donde se cultivaron dos explantes, uno con y otro sin ápice, por unidad experimental, del cultivar "blanca 1a" en diferentes medios: MS, LOG (Castro-Concha, *et*

al., 1990), MS-NH₄ (medio MS sin nitrato de amonio NH₄NO₃), MS-NH₄ + 500 mg/L de hidrolizado de caseína. Suplementados con sacarosa, agar y 0.3 mg/L de BA (Cuadro 1). A los 30 d los explantes se subcultivaron en medio de expresión y las evaluaciones se realizaron cada 15 d durante dos meses.

Cuadro 1. Experimentos para la proliferación de yemas.

Experimento	Condiciones
1	Se utilizó un explante sin ápice del cultivar "desconocido" en MS con 0.5 y 5.0 mg/L de KIN, 30 y 50 g/L de sacarosa y tiempo de inducción 15 y 30 d.
2	Se cultivó un explante sin ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con 0.5 mg/L de KIN o BA y 30 y 50 g/L de sacarosa.
3	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con 1.0 mg/L de KIN ó 2ip con y sin carbón activado.
4	Se utilizaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L) de KIN.
5	Se utilizaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L) de BA.
6	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con diferentes concentraciones (0, 0.2, 2.2, 5.6 y 11.2 mg/L) de BA.
7	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "Lucia p03" en MS con diferentes dosis 0, (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 2.2 mg/L) de BA.
8	Se utilizaron dos explantes del cultivar "blanca 1a", con ápice y otro sin ápice, se cultivaron en diferentes medios de cultivo (MS, LOG, MS-NH ₄ , MS-NH ₄ + 500 mg/L de hidrolizado de caseína) adicionado con 0.3 mg/L de BA.

5.2.3 Etapa 3. Generación de raíces

Para la generación de raíz se realizaron cuatro experimentos con plantas de los cultivares "blanca 1a", "morada 4" y plantas del cultivar "desconocido". Los explantes de 2 cm de altura se pusieron en cultivo en medio MS adicionado con reguladores de crecimiento del tipo de las auxinas.

5.2.3.1 Experimento 9

En este experimento se tuvieron seis tratamientos con ocho repeticiones con un total de 48 unidades experimentales. Se cultivó un explante con ápice por unidad experimental

del cultivar "desconocido", en medio MS adicionado con sacarosa, agar y fueron suplementados con los reguladores de crecimiento AIB (ácido 3-indolbutírico) o ANA (ácido α -naftalenacético) (0.1 y 1.0 mg/L), así como otro medio adicionado con carbón activado y un medio más libre de reguladores (Cuadro 2). A los 30 d se subcultivaron en medio de expresión. Las revisiones se realizaron cada 15 d por dos meses.

5.2.3.2 Experimento 10

En este otro experimento para la producción de raíz se tuvieron seis tratamientos con seis repeticiones con un total de 36 unidades experimentales en el que se utilizaron dos brotes con ápice por unidad experimental del cultivar "desconocido". Se cultivaron en medio MS con sacarosa, agar y diferentes concentraciones de AIB (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L) y otro medio adicionado con carbón activado (Cuadro 2). Las evaluaciones se realizaron cada 15 d por un mes, y después puestos en medio de expresión.

Cuadro 2. Experimentos para la generación de raíces.

Experimentos	Condiciones
9	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en medio libre de reguladores de crecimiento, otro medio adicionado con 0.1 y 1.0 mg/L de AIB o ANA y otro medio con 2 g/L de carbón activado.
10	Se cultivaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis (0, 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/L) de AIB y otro medio adicionado con 2 g/L de carbón activado.
11	Se utilizó un explante con ápice del cultivar "blanca 1A" en medio libre de reguladores de crecimiento, otro medio adicionado con 0.1 y 1.0 mg/L de AIB o ANA y otro medio con 2 g/L de carbón activado.
12	Se utilizaron dos explantes uno con y otro sin ápice del cultivar "morada 4" en MS libre de reguladores de crecimiento, otro adicionado con 0.1 mg/L de AIB y otro medio con 2 g/L de carbón activado.

5.2.3.3 Experimento 11

Este experimento de enraizamiento fue la réplica del experimento 9, sólo que aquí se utilizaron explantes con ápice del cultivar “blanca 1a” (Cuadro 2).



Figura 1. Material vegetal. a) planta de *Opuntia ficus-indica* de “cultivar desconocido”, b) planta de *O. ficus-indica* (L.) Miller del cultivar “Lucía p03” y c) cladodio joven y fresco de *O. ficus-indica* del cultivar “Toño”.

5.2.3.4 Experimento 12

Para el último experimento para la producción de raíces se tuvieron seis tratamientos con tres repeticiones con un total de 18 unidades experimentales donde se utilizaron dos explantes, uno con y otro sin ápice, por unidad experimental, del cultivar “morada 4”. Se cultivaron en MS adicionado con sacarosa, agar y se comparó la producción de raíz en un medio adicionado con AIB (0.1 mg/L), otro medio con carbón activado y otro medio libre de reguladores (Cuadro 2). Las evaluaciones se realizaron cada 15 d por un mes y después fueron puestos en medio de expresión. Se tuvieron seis tratamientos con tres repeticiones con un total de 18 unidades experimentales.

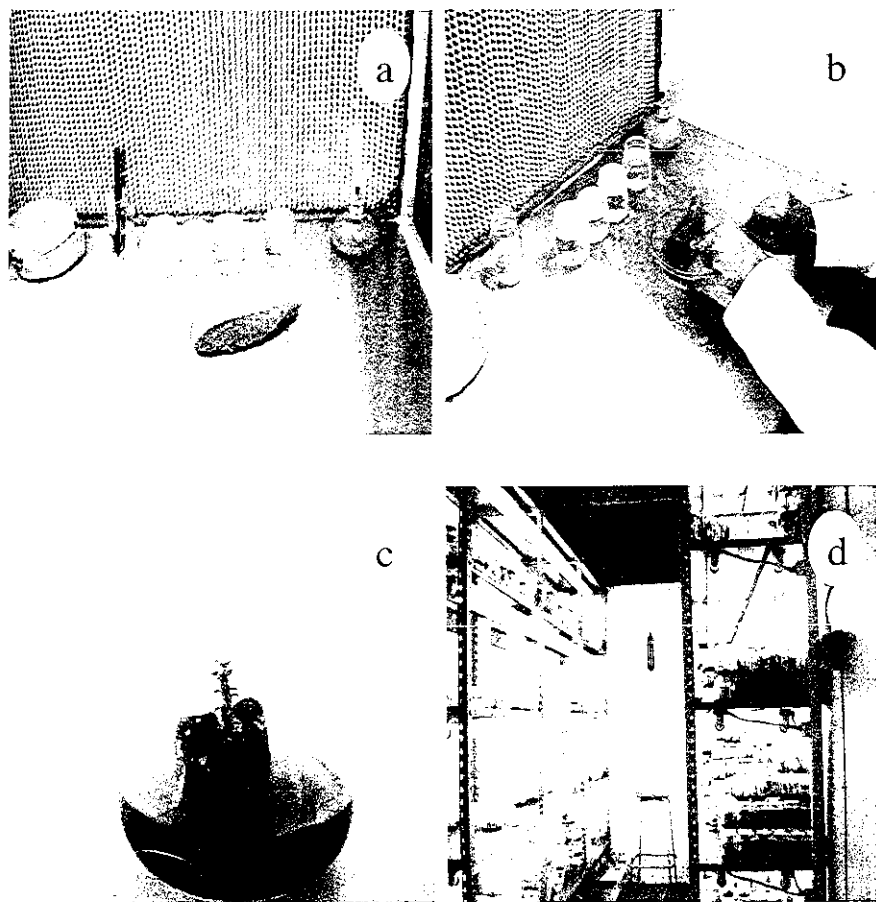


Figura 2. Desinfección y establecimiento *in vitro* de los cultivares "Toño" y "Filiberto". a) y b) proceso de desinfección de los brotes, c) establecimiento de un explante *in vitro* y d) cuarto de incubación.

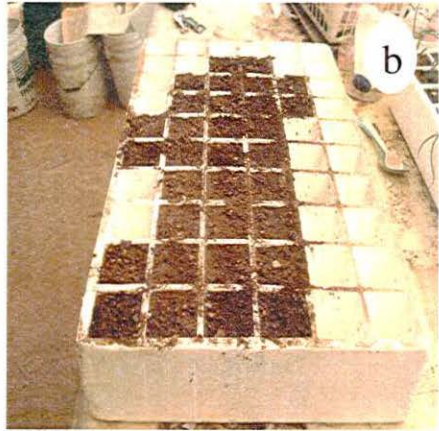
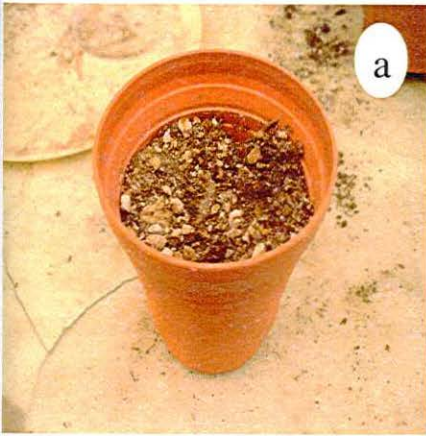


Figura 3. Material para el establecimiento *ex vitro*. a) sustrato utilizado y b) caja de crecimiento de 60 cavidades de 100 cm³ cada uno.

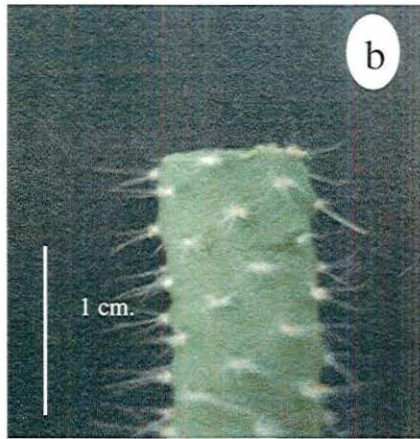
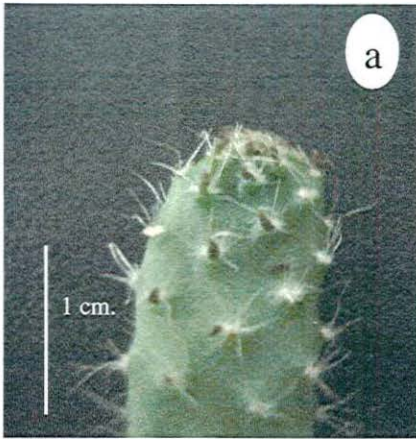


Figura 4. Tipos de explantes *in vitro* utilizados en los diversos experimentos. a) explantes con ápice y b) sin ápice.

5.2.4 Etapa 4. Adaptación *ex vitro*

De la etapa anterior se sumergieron los brotes de las plantas del cultivar “desconocido” con raíz en agua corriente a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ para eliminar restos del medio de cultivo, posteriormente se transfirieron a condiciones *ex vitro* y fueron plantados en sustrato sin esterilizar a las siguientes proporciones de arena de río, turba y agrolita (5.0:2.5:2.5) y arena de río, turba y agrolita (5.0:3.0:2.0) (Figura 3a), se utilizaron cajas de crecimiento de 60 cavidades de 100 cm^3 de volumen cada uno (Figura 3b). Se colocaron a condiciones de invernadero con diferentes temperaturas (30 y 34°C) e intensidades de luz ($6,900$ y $10,000$ lux). Se les aplicó un fungicida de contacto (Titan[®]) cada 15 d y otro sistémico (Robustus[®]) 3 d después de la aplicación del fungicida de contacto durante dos meses.

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos empleados fue un diseños factorial con interacciones (dobles y triples) y comparación múltiple de medias con la Prueba LSD (Diferencia Mínima Significativa), se utilizó el paquete estadístico Statgraphics[®] plus 4.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EXPERIMENTOS

6.1.1 Etapa 1. Establecimiento *in vitro*

Se logró con éxito el establecimiento *in vitro* de los explantes provenientes de las pencas jóvenes de los cultivares "Toño" (Figura 5a) y "Filiberto" (Figura 5b y 5c), utilizando un protocolo de desinfección diferente al utilizado por Juárez y Passera (2002), quienes emplearon brotes, mismos que fueron sumergidos primero en un lavado en etanol al 96% por 1 min, seguido por un lavado en hipoclorito de sodio al 20% por 7 min y finalmente tres lavados en agua estéril.

6.1.2 Etapa 2. Proliferación de yemas

6.1.2.1 Experimento 1

El primer experimento no indicó diferencias significativas en el número de brotes generados durante las evaluaciones iniciales para ninguno de los factores analizados, dosis de KIN 0.5 y 5.0 mg/L (Figura 6a) ($p = 0.9187$), concentración de sacarosa 3 y 5% ($p = 0.7210$) y tiempos de inducción 15 y 30 d ($p = 0.7595$). En la cuarta evaluación (60 d), las dosis de KIN resultaron significativas ($p = 0.0412$); sin embargo, los promedios de brotes obtenidos resultaron muy bajos y similares (0.5 mg/L = 1.2 y 5.0 mg/L = 1.7 brotes), ya que en trabajos similares utilizando BA se han reportado resultados de hasta ocho brotes por explante (Mohamed-Yassen *et al.*, 1995; Silos-Espino *et al.*, 2006; Estrada-Luna *et al.*, 2008). Un dato interesante de resaltar es que la concentración de sacarosa no influyó en el número y tamaño de brotes generados puesto que la sacarosa aporta la energía necesaria para el desarrollo de los brotes, así como para el factor tiempo de inducción, ya que resultó estadísticamente igual inducir los brotes por 15 ó 30 d. Resultados que favorecen el ahorro de sacarosa y tiempo de trabajo (Cuadro 3).

6.1.2.2 Experimento 2

El segundo experimento presentó altas diferencias significativas en la producción de brotes para el factor regulador de crecimiento (KIN o BA a 0.5 mg/L; $p = 0.0000$); sin embargo, la sacarosa (3 y 5%) no presentó significancia ($p = 0.4702$), siendo KIN el que

presenta un mayor promedio (5.25 brotes), en comparación con BA (0.73 brotes). Para la producción de brotes se recomienda utilizar KIN en lugar de BA de acuerdo a los trabajos reportados por Ferreira *et al.*, (2006), Llamoca-Zarate *et al.*, (1998), Angulo-Bejarano y Paredes-López, (2011) donde utilizaron el regulador de crecimiento BA para la producción de brotes. Para el factor de concentración de sacarosa (3 y 5%) no presentó diferencias significativas pues el número de brotes generados (3 brotes) y el crecimiento en los brotes son muy similares, algo diferentes a lo encontrado por Escobar *et al.* (1986), donde reportaron que el mayor crecimiento en el explante lo presentó la concentración de sacarosa al 5%. En cuanto al aspecto de los brotes, el mayor tamaño de los brotes observado lo presentó KIN, sin embargo, BA presentó un número de brotes y un diámetro mayor en comparación con los otros reguladores de crecimiento, esto se puede deber al efecto generado por el regulador de crecimiento utilizado (Cuadro 3).

6.1.2.3 Experimento 3

En el tercer experimento no se presentaron diferencias significativas entre los reguladores de crecimiento (1.0 mg/L de KIN ó 2ip) en el número de brotes generados ($p = 0.6939$), con promedios muy bajos y parecidos (2ip = 2.1 brotes, figura 6b y KIN = 2.3 brotes), algo parecido a lo reportado en los trabajos realizados por Manzo (2010) con un promedio para 2ip de 2 brotes y Estrada-Luna *et al.*, (2008) con un promedio de 2.2 brotes con KIN; sin embargo, en la primera evaluación (15 d) indicó diferencias significativas en la interacción entre los factores (regulador de crecimiento con/sin carbón activado $p = 0.0407$), también se presenta alta significancia en utilizar o no carbón activado ($p = 0.0075$), siendo el medio sin carbón activado el que presenta un mayor promedio (3.1 brotes por explante) puesto que el carbón activado adsorbe las moléculas del regulador de crecimiento presente en el medio (Cuadro 3).

6.1.2.4 Experimento 4

En el experimento cuatro se observó significancia entre las dosis utilizadas: 0, 0.1, 0.2, 0.3 0.4 y 0.5 mg/L de KIN ($p = 0.0338$), siendo 0.5 mg/L la mejor dosis con el mayor promedio (6.0 brotes) con respecto a las demás dosis, algo muy diferente a lo encontrado en el trabajo realizado por Estrada-Luna *et al.* (2008) donde observaron que la dosis con el

mayor promedio (5.9 brotes por explantes) lo presentó la dosis de 5mg/L de KIN (Cuadro 3).

6.1.2.5 Experimento 5

El experimento cinco presentó alta significancia ($p = 0.0000$) entre las concentraciones de BA (0, 0.1, 0.2 0.3, 0.4, 0.5 mg/L), siendo 0.4 mg/L la mejor dosis con un promedio de 24.5 brotes, algo diferente a lo reportado en el trabajo realizado por García-Saucedo *et al.*, (2005), donde encontraron como mejor dosis 0.1 mg/L aunque con un promedio menor de 9.6 brotes. Se observaron resultados diferentes a lo encontrado en experimentos anteriores donde el regulador de crecimiento KIN presentó mayor promedio que BA esto fue a causa del factor genotipo, el cual se eliminó al utilizar genotipos ya seleccionados y bien diferenciados de otros, y también a que los explantes no estaban previamente estimulados (Cuadro 3).

6.1.2.6 Experimento 6

El experimento seis es repetición del trabajo realizado por Escobar *et al.*, (1986) utilizando las mismas dosis de BA (0, 0.2, 2.2, 5.6, 11.2 mg/L), en el presente trabajo se observaron altas diferencias significativas entre las dosis ($p = 0.0001$), siendo la mejor 2.2 mg/L con un promedio de 53.75 brotes (Figura 6c). Sin embargo el número de brotes fue menor a lo reportado de 25,000 plantas en 100 d de cultivo (Escobar *et al.*, 1986), donde utilizaron las mismas dosis de BA siendo la del mejor promedio 2.2 mg/L (Cuadro 3).

6.1.2.7 Experimento 7

El experimento siete presentó alta significancia ($p = 0.0003$) entre las dosis utilizadas de BA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 2.2 mg/L). El mayor promedio (9.75 brotes) se logró con 0.3 mg/L (Figura 6d), algo muy diferente a lo obtenido por Choreño-Tapia *et al.*, (2002) donde observaron un promedio de diez brotes por explantes en medio MS, pero con 3.0 mg/L de BA (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la proliferación de yemas.

Experimento	Condiciones	Resultados
1	Se utilizó un explante sin ápice del cultivar "desconocido" en MS con KIN 0.5 y 5.0 mg/L, sacarosa 30 y 50 g/L y tiempo de inducción 15 y 30 d.	$p = 0.0412$, mejor dosis KIN 5.0 mg/L con promedio de 1.6 brotes (- 1.37, + 1.89)
2	Se cultivó un explante sin ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con KIN o BA 0.5 mg/L y sacarosa 30 y 50 g/L	$p = 0.0000$, mejor dosis KIN 0.5 mg/L con promedio de 5.2 brotes (- 4.65, + 5.84)
3	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con KIN ó 2ip 1.0 mg/L con o sin carbón activado	$p = 0.6939$, promedios similares: 2ip 2.1 y KIN 2.3 brotes. Con o sin carbón activado $p = 0.0075$, el mayor promedio lo presentó el medio sin carbón activado (1.3 y 3.1 respectivamente (- 2.21, + 3.98))
4	Se utilizaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis de KIN 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/L	$p = 0.0338$, mejor dosis 0.5 mg/L con un promedio de 6 brotes (- 4.56, + 7.43)
5	Se utilizaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis de BA 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L	$p = 0.0000$, mejor dosis 0.4 mg/L con un promedio de 24.5 brotes (- 22.00, + 26.99)
6	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en MS adicionado con diferentes concentraciones de BA 0, 0.2, 2.2, 5.6 y 11.2 mg/L	$p = 0.0001$, mejor dosis 2.2 mg/L con un promedio de 53.7 brotes (- 46.84, + 60.65)
7	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "Lucia p03" en MS con diferentes dosis de BA 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 2.2 mg/L	$p = 0.0003$, mejor dosis 0.3 mg/L con un promedio de 9.7 brotes (- 8.03, + 11.46)

8	Se utilizaron dos explantes del cultivar "blanca 1a", uno con ápice y otro sin ápice, se cultivaron en diferentes medios de cultivo (LOG, MS-NH ₄ , MS-NH ₄ + 500 mg/L de hidrolizado de caseína) adicionado con 0.3 mg/L de BA	Ápice $p = 0.0033$, el mayor promedio fue de 6.2 brotes (- 5.65, + 6.92) lo presento el explante con ápice. Medio de cultivo $p = 0.0000$, el mejor fue el medio MS-NH ₄ con 7.2 brotes promedio (- 6.36, + 8.2)
---	---	---

6.1.2.8 Experimento 8

En el experimento ocho se encontró alta significancia para ambos factores (con ó sin ápice ($p = 0.0033$) y medio de cultivo ($p = 0.0000$), donde el explante con ápice presenta un mayor promedio (6.2 brotes), algo parecido a lo encontrado por Mohamed-Yassen *et al.* (1995), donde reportaron un promedio de hasta 5.6 brotes utilizando explantes con ápice. El mejor promedio en cuanto al otro factor (medio de cultivo) lo presentó el medio MS-NH₄ (promedio = 7.2 brotes), ésto difiere a lo encontrado en el trabajo realizado por Castro-Concha, *et al.* (1990) donde utilizaron el medio LOG para producir brotes en otra especie de planta suculenta (*Agave tequilana* Weber) este medio con un promedio espectacular de hasta 37 brotes (Cuadro 3).

6.1.3 Etapa 3. Generación de raíces

6.1.3.1 Experimento 9

Este experimento mostró diferencia significativa ($p = 0.0176$) entre los tratamientos en la primera evaluación (15 d) para el factor analizado (reguladores de crecimiento: IBA o ANA al 1.0 y 0.1 mg/L) para el numero de raíces generadas, siendo el medio con carbón activado el de mayor promedio; sin embargo, los promedios entre este medio y el medio MS libre de reguladores de crecimiento (Figura 7a) son muy similares y bajos (1.250 y 1.125 raíces por explante respectivamente), contrario a lo reportado en el trabajo realizado por García-Saucedo *et al.*, (2005) con un promedio superior (24 raíces por explante) utilizando el medio 0.5x MS con 1.1 mg/L de IBA. No obstante en las evaluaciones siguientes no presentó significancia estadística ($p = 0.9559$), puesto que los promedios son muy similares entre sí ya que se dejó de generar raíces (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados para la proliferación de raíces

Experimento	Condiciones	Resultados
9	Se cultivó un explante con ápice del cultivar "desconocido" en MS libre de reguladores de crecimiento, otro MS adicionado con 0.1 y 1.0 mg/L de AIB o ANA y en MS adicionado con 2 g/L de carbón activado	$p = 0.0176$, el mejor promedio fue de 1.2 raíces (- 0.86, + 1.63) y lo presentó el medio con carbón activado
10	Se cultivaron dos explantes con ápice del cultivar "desconocido" en MS con diferentes dosis de AIB 0, 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/L y en MS con 2 g/L de carbón activado	$p = 0.0447$, el mejor promedio fue 6.8 raíces (- 5.67, + 7.92) y lo presentó el medio sin reguladores de crecimiento
11	Se utilizó un explante con ápice del cultivar "blanca 1A" en MS libre de reguladores de crecimiento, en MS adicionado con 0.1 y 1.0 mg/L de AIB o ANA y en MS con 2 g/L de carbón activado	$p = 0.1897$, no se presentó diferencias significativas entre los tratamientos (promedio - 1.09, + 8.23)
12	Se utilizaron dos explantes uno con o sin ápice del cultivar "morada 4" en MS libre de reguladores de crecimiento, AIB 0.1 mg/L y 2 g/L de carbón activado	No se presentó diferencias significativas para ningún de los factores analizados: reguladores de crecimiento $p = 0.2692$ (promedios - 0.96, + 2.36) y explante con ó sin ápice $p = 0.2840$ (promedios - 0.82, + 2.06)

6.1.3.2 Experimento 10

El análisis estadístico de este experimento presentó diferencias significativas ($p = 0.0447$), entre las dosis reguladores de crecimiento IBA al 0, 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/L (figura 7b), el mayor promedio de raíces producidas se observó en el medio MS libre de reguladores de crecimiento (6.8 raíces), esto concuerda con lo observado por Choreño-

Tapia *et al.*, (2002), donde se obtuvo la formación de raíz en medio MS libre de reguladores de crecimiento en *Cephalocereus seniles*, ya que la misma planta realiza una producción endógena de los reguladores de crecimiento (Cuadro 4).

6.1.3.3 Experimento 11

No se observaron diferencias significativas ($p = 0.1897$) entre los tratamientos (IBA o ANA al 1.0 y 0.1 mg/L), sin embargo, el mayor promedio fue la dosis de 0.1 mg/ L de ANA (10.3 raíces) (Figura 7c), esto concuerda con lo encontrado por Pelah *et al.*, (2002) donde para la producción de raíz en *Selenicereus megalanthus* utilizaron la misma dosis de ANA (Cuadro 4).

6.1.3.4 Experimento 12

En este último experimento no se obtuvo significancia entre los factores analizados (reguladores de crecimiento $p = 0.2692$ y explante con o sin ápice $p = 0.2840$), sin embargo, el medio adicionado con carbón activado y explante con ápice presenta el mayor promedio (2.3 raíces), todo lo contrario a lo reportado por Escobar *et al.*, (1986), donde observaron un mayor promedio (18 raíces por explante) en el medio suplementado con 9.3 mg/L de IBA (cuadro 4).

6.1.4 Etapa 4. Establecimiento *ex vitro*

Para el establecimiento *ex vitro* se logró un 98% de sobrevivencia (Figura 8a) a los 30 d de ser cultivado en el sustrato con arena de río, turba y agrolita (5.0: 2.5: 2.5) y puesto en el invernadero con una temperatura de 34°C y con la mayor intensidad de luz (10,000 luxes). En un trabajo realizado por Estrada-Luna *et al.*, (2002) reportaron un 100% de sobrevivencia utilizando un sustrato compuesto de arena de río, turba y vermiculita (1.0:2.0:1.0), ya que contiene menos arena de río, lo que permite una menor pérdida de agua y una mayor humedad en el sustrato; sin embargo, las plantas se alongaron al necesitar una mayor intensidad de luz (Figura 8b).

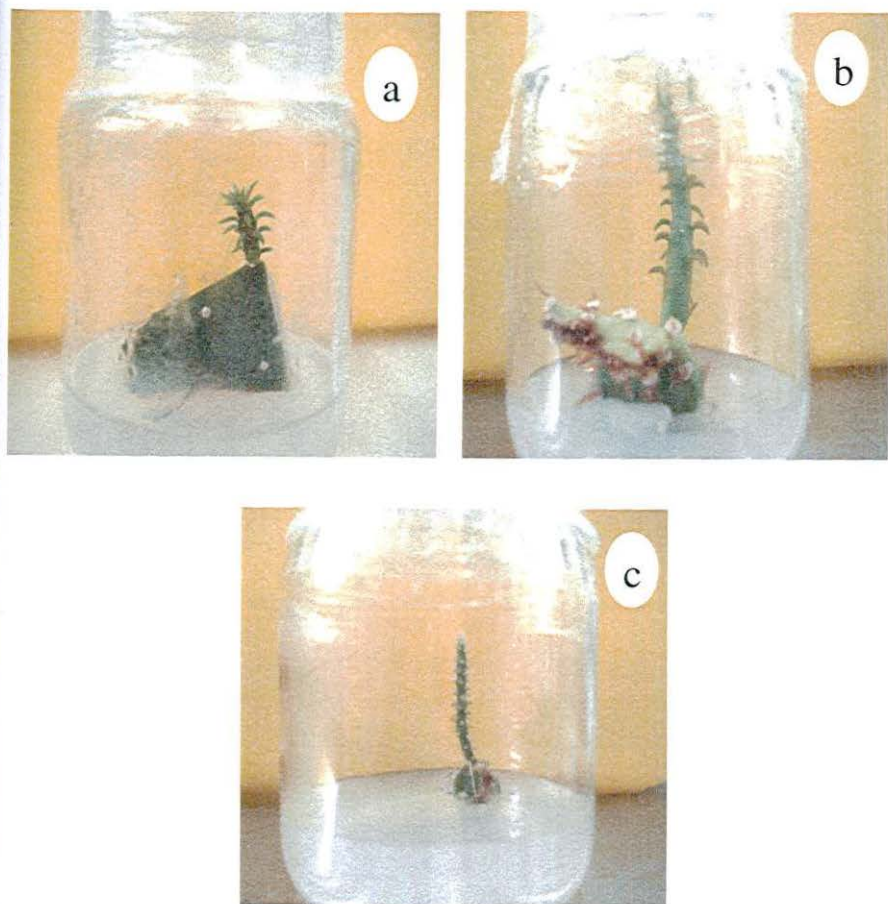


Figura 5. Establecimiento *in vitro* de explantes de *Opuntia ficus-indica*. a) explante del cultivar "Toño" cultivado en medio Murashigue y Skoog (MS) adicionado con 6-furfurilaminopurina (KIN), b) y c) explantes del cultivar "Filiberto" establecidos en MS adicionado con KIN.

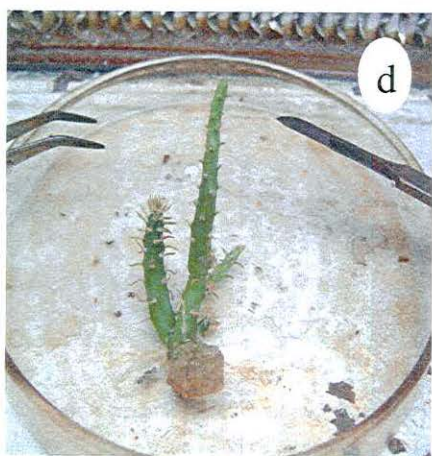
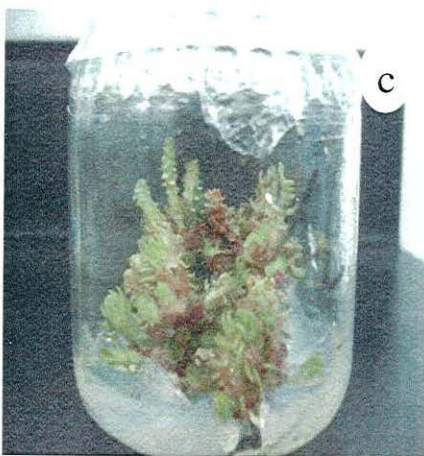
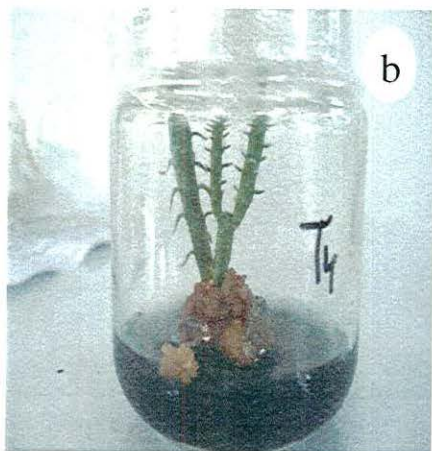


Figura 6. Proliferación de yemas de *Opuntia ficus-indica*. a) brote generado a los 15 d de cultivo de un explante en medio Murashigue y Skoog (MS) con 6-furfurilaminopurina (KIN) a 5.0 mg/L, b) brotes obtenidos de un explante a los 45 d de cultivo en el medio MS adicionado con 6- γ - γ - dimetililaminopurina (2ip) a 1mg/L y carbón activado (2g/L), c) brotes generados a los 75 d en el medio MS adicionado con 2.2 mg/L 6-bencilaminopurina (BA), d) generacion de brotes a los 30 d de un explante del cultivar "Lucia p03" cultivado en medio MS adicionado con BA.

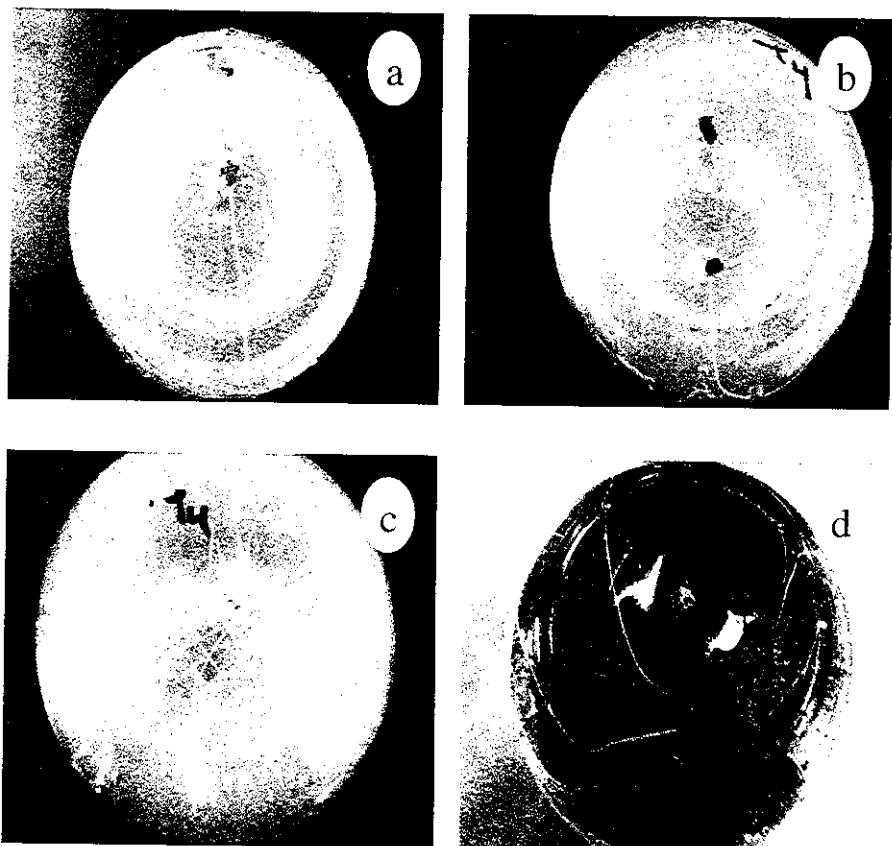


Figura 7. Producción de raíces de *Opuntia ficus-indica*. a) producción de raíz a los 15 d de un explante cultivado en medio Murashigue y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento, b) producción de raíz a los 15 d de cultivado en MS con 5.0 mg/L de ácido 3-indolbutírico (IBA), c) generación de raíz en un explante del cultivar "blanca 1A" a los 30 d de cultivo en MS adicionado con 0.1 mg/L de ácido α -naftalenacético (ANA) y d) producción de raíz a los 30 d de un explante del cultivar "morada 4" en medio MS con 2 g/L de carbón activado.

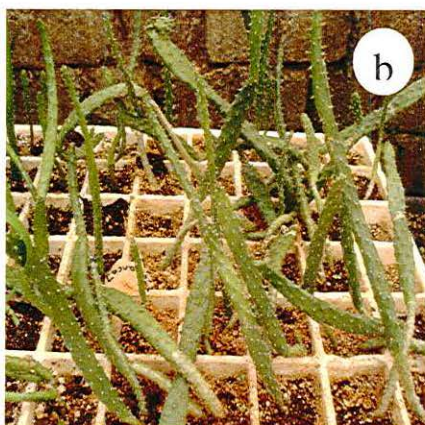


Figura 8. Establecimiento *ex vitro* de plántulas de *Opuntia ficus-indica* del cultivar “desconocido”. a) plántulas con 30 d de enraizamiento *in vitro* y recién sacadas para la adaptación a *ex vitro*, b) plántulas con 120 d de adaptación a condiciones de invernadero.

7. CONCLUSIONES

1. Para la proliferación de brotes se recomienda utilizar el medio MS adicionado con el regulador de crecimiento BA a una concentración de 2.2 mg/L, ya que se obtiene mayor cantidad de brotes (hasta 53 brotes por explante), con 3% de sacarosa ya que sería un ahorro de ésta, al usar una concentración más baja y sin carbón activado, ya que sin bien adsorbe moléculas de las sustancias de desecho de las plantas del medio, también captura reguladores de crecimiento.
2. En cuanto el tiempo de estimulación de meristemas se recomienda mantenerlos en medio de estimulación durante 30 d para después pasarlos a medio de expresión, ya que después de este tiempo dejan de desarrollarse brotes y se pueden pasar a medio de crecimiento o enraizamiento.
3. No se presentaron diferencias significativas al utilizar explantes con ápice o sin ápice; sin embargo, se recomienda utilizar explantes con ápice por tener una menor manipulación al momento de hacer el cultivo.
4. En la proliferación de raíces se recomienda utilizar medio libre de reguladores de crecimiento y sin carbón activado, puesto que sería más barato al no necesitarlos y hacer un gasto innecesario, ya que la misma planta realiza una producción endógena de sus propias auxinas. Pero si se va a utilizar reguladores de crecimiento se recomienda utilizar dosis bajas ya sea de IBA o ANA (0.1 mg/L).
5. El establecimiento *ex vitro* se realizó con éxito bajo condiciones de invernadero, a una temperatura de 34°C e intensidad de 10,000 lux. Se recomienda utilizar arena de río, turba y agrolita (5.0: 2.5: 2.5) como sustrato, ya que presentó un mayor porcentaje de sobrevivencia (98%).

8. LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel A., J. Vincent-Escalant. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba, Costa Rica, pp. 2-3
- Ancora G., E. Benvenuto, G. Bertoni, V. Buonomo, B. Honings, A. Lauria, F. Lucchini, P. Marsan, V. Mele, A. Pessina, E. Segreccia. 2004. Biotecnologías animales y vegetales: nuevas fronteras y nuevas responsabilidades. Trillas, México, pp. 11-14
- Angulo-Bejarano P. y O. Paredes-López. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) *Scientia Horticulturae* 128: 283-288.
- Ayala-Escobar V., M. Yáñez-Morales, U. Braun, J. Groenewald y P. Crous. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. Nvo. The causal organism of cactus leaf spot in Mexico. *Fungal diversity* 21: 1-9.
- Bautista C. R. 1982. Los agrosistemas nopaleros del Valle de México. Tesis, Chapingo, México, pp. 10.
- Berger H., A. Rodríguez-Félix, L. Galleti. 2006. Operaciones de campo para la utilización de los nopales. En: Sáenz, C., H. Berger, J. Corrales, L. Galleta, I. Higuera, C. Mondragón, A. Rodríguez-Félix, E. Sepúlveda, M. Varnero. Utilización agroindustrial del nopal. FAO. Roma, pp. 23-33.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, pp. 1.
- Castro-Concha L., V. Loyola-Vargas, J. Chan y M. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 147-151.
- Cañal M., R. Rodríguez, B. Fernández, R. Sánchez-Tames, J. Majada. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal* 1: 3-9.
- Choreño-Tapia J., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haworth Pfeiffer) a partir de areolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(2): 183-196.

- de la Rosa J. y Santamaría D. 1998. El nopal: usos manejo agronómico y costos de producción en México. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM. México, pp. 33, 43-46, 99.
- Escobar H., V. Villalobos y A. Villegas. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 7: 269-277.
- Estrada-Luna A., C. López-Peralta y E. Cárdenas-Soriano. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Scientia Horticulturae* 92: 317-327.
- Estrada-Luna A., F. Martínez-Hernández, M. Torres-Torres y F. Chable-Moreno. 2008. *In vitro* micropropagation of the ornamental Prickly pear cactus *Opuntia manicera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385.
- Ferreira F., F. Fernandes, S. Barbata, O. Faco y F. Paiva. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. (Cactacea). *Scientia Horticulturae* 108: 15-21.
- Financiera Rural. 2011. Monografía del nopal y la tuna. [http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna\(jul11\).pdf](http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna(jul11).pdf) (Consultado en línea 18 mayo de 2012).
- Flores-Valdez C. 1995. "Nopalitos" production, processing and marketing. En: Barbera G., P. Ingles y E. Pimienta (eds.) *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO. Roma, pp. 92-99.
- Flores-Valdez C. 1999. Aprovechamiento del nopal forrajero a nivel mundial. En: *Memoria del Curso-taller sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. Asociación de Productores de Nopal de Nuevo León, A.C. y Programa Universitario de Investigación y Servicio en Nopal Tuna. CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo. México, pp. 81-89.
- Flores-Valdez C. 2003. Importancia del nopal. En: Flores-Valdez (ed.) *Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización*. Universidad Autónoma Chapingo. México, pp. 1-18.
- Flores-Valdez C. y J. Aguirre. 1989. *El nopal como forraje*. Universidad Autónoma Chapingo. México, pp. 9-10.

- Gallegos C. y Méndez S. 2000. La tuna, criterios y técnicas para su producción comercial. Universidad Autónoma Chapingo. México, pp. 45-46.
- García-Saucedo P., M. Valdez-Morales. M. Valverde. A. Cruz-Hernández y O. Paredes-López. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 215-219
- George E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exegetics Limited. Inglaterra, pp. 5, 25-27.
- Granados D. y A. Castañeda. 1991. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Trillas, México D.F. pp. 135-137
- Granata G. 1999. Enfermedades bióticas y abióticas. En: Barbera G., P. Inglese y E. Pimienta (eds.) Agroecología, cultivo y usos del nopal. FAO. Roma, pp. 115-125.
- Griffith M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(11): 1915-1921.
- Hurtado D. y M. Merino. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México, pp. 15, 133-136.
- Inglese P. 1999. Plantación y manejo del huerto. En: Barbera G., P. Inglese y E. Pimienta (eds.) Agroecología, cultivo y usos del nopal. FAO. Roma, pp. 82-96.
- Juárez M. y C. Passera. 2002. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *BIOCELL* 26(3): 319-324.
- Llamoca-Zárate R., F. Campos y L. Landsmann. 1998. Establishment and transformation of callus and cell suspension cultures of the prickly-pear (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 4: 27-36.
- López-García J., J. Fuentes-Rodríguez y A. Rodríguez-Gámez. 2003. Producción y uso de *Opuntia* como forraje en centro-norte de México. En: Mondragón-Jacobo C. y S. Pérez-González (eds.) El nopal (*Opuntia spp.*) como forraje. FAO. Roma, pp. 35-43.
- Manzo S. 2010. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *Coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus playacanthus* Link y Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis de Maestría. Colegios de Postgraduados. Texcoco, México, pp. 42.

- Méndez G. 1999. Cultivo y manejo de la grana cochinilla. En: Llanderel C., y R. Nieto (eds.) Cría de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento. Instituto de fitosanidad Colegio de Postgraduados. México, pp. 69.
- Mohamed-Yassen Y., S. Barringer, W. Splittstoesser y R. Schnell. 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 117-119.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Murray G. 1997. El poder curativo del nopal. Selector. México, pp. 21.
- Pacheco M. 2010. Biología de *Symphorobius barberi* Banks (neuroptera: hemerbiidae) criado con *Dactylopius opuntiae* Cockerell (hemiptera: dactylopiidae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. pp. 4
- Pelah D., R. Kaushik, Y. Mizrahi y Y. Sitrit. 2002. Organogénesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.
- Pérez E, R. Ramírez, H. Núñez y N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, pp. 27, 51-63, 65.
- Pimienta E. 1900. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara, México.
- Pimienta E. y A. Muñoz-Urías. 1999. Domesticación de opuntias y variedades cultivadas. En: Barbera G., P. Inglese y E. Pimienta (eds.) *Agroecológica, cultivo y usos del nopal*. FAO. Roma, pp. 61-67.
- Portillo L. y H. Arreola. 1994. Los nopales hospederos de la cochinilla fina o cultivada (*Dactylopius coccus* Costa). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 39(4): 90-95.
- Ramírez-Serrano, C. y R. Soltero. 2007. Proceso de micropropagación aplicable a la Familia Cactácea. Solicitud Internacional PCT: WO2007043851A1, pp. 1-36.
- Reynolds S. y E. Arias. 2003. Introducción. En: Mondragón-Jacobo C., S. Pérez-González, E. Arias S. Reynolds y M. Sánchez. *El nopal (Opuntia spp.) como forraje*. FAO. Roma, pp. 1-6.
- Ríos J. y V. Quintana. 2004. Manual del participante. Manejo general del cultivo del nopal. Colegio de Postgraduados. México. pp. 24-30.

- Sáenz C. 2006. Los nopales como recurso natural. En: Sáenz, C., H. Berger, J. Corrales, L. Galleta, I. Higuera, C. Mondragón, A. Rodríguez-Félix, E. Sepúlveda, M. Varnero. Utilización agroindustrial del nopal. FAO. Roma, pp. 1-6.
- Salim N., C. Abdelwaheb, C. Rabah y B. Ahcene. 2009. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. African Journal of Biotechnology 8: 1623-1624.
- Salinas A., J. Islas, D. Rosales. E. Soriano. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlalnepantla. Morelos. México. Agrociencia 40: 641-653.
- Scheinvar L. 1999. Taxonomía de las Opuntias utilizadas. En: Barbera G., P. Inglese y E. Pimienta (eds.) Agroecología, cultivo y usos del nopal. FAO. Roma, pp. 21-28.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2008. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. (Consultado en línea 02 de Septiembre de 2012).
- Silos-Espino H., A. Valdez-Ortiz, Q. Rascón-Cruz, E. Rodríguez-Salazar y O. Paredes-López. 2006. Genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Culture 86: 397-403.
- Sodi P. 1968. Las cactáceas en la época precolombina y virreinal y en el siglo XIX. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 13(1): 3-12.
- Vigueras, A. L. 2010. Factores bióticos y abióticos que influyen en la cría de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). pp. 87-100. En: Portillo, L. y A. L. Vigueras (eds.). Conocimiento y Aprovechamiento de la Grana Cochinilla. Universidad de Guadalajara, México.