



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

Estudios de germinación y cultivo *in vitro* de *Escontria chiotilla* (Weber)

Rose y *Stenocereus griseus* Haworth presentes en el matorral xerófilo de la

Mixteca Baja

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Biología

PRESENTA

Biólogo: Jesús Ramírez Galindo

**El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de
la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó**

Biólogo: Jesús Ramírez Galindo

Abril 2013

Comité Tutorial:

Codirector: Dr. Manuel Robert Díaz (CICY)

Codirectora: Dra. Leticia Ponce de León García (UAM-I)

Asesor: Dr. Francisco José Fernandez Perrino (UAM-I)

Sinodal: Dr. José Alejandro Zavala Hurtado (UAM-I)

Sinodal: Dra. Alma Orozco Segovía (UNAM)

*Dedico esta Tesis a quién piensa que los
imposibles existen, esta Tesis es un ejemplo de lo
contrario.*

*Sólo cuando de verdad se desea que las cosas
pasen, se lucha por ellas y logran que suceda.*

*Aunque en ocasiones el cielo se nuble, sólo es
momentáneo, al final se despejará y la calma
vendrá, y con ella la satisfacción que valio la pena
el sacrificio.*

*De verdad lamento que no lo hayas pensado así,
porque yo sí.*

Esto es para ti.....

Los actos de cada persona marcan su destino.....

Me quedo con los mejores.....

Sempre te recordaré

A tú memoria, Padre.

Rodolfo Ramírez Hernández^{††}

*Esta página es tuya Madre mía.
Gracias por darme la vida y creer en mí.
Te amo.
Gloria Galindo Solano.*

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios y a mis Padres que me dieron la vida.

A mis hijos, Jesús Adrián Ramírez Sotero y Sahory Jocelín Ramírez Sotero, porque aún cuando el paisaje es nublado, sólo basta mirarlos para revitalizar mi fortaleza y continuar adelante.

A Fabiola Sotero Estrada, que de una u otra forma, a su manera me apoyo, gracias por todo.

Un especial y sincero agradecimiento a la Dra. Leticia Ponce de León García, maestra y amiga, que ha compartido sus conocimientos y experiencias.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Manuel L. Robert, por todo su apoyo, comprensión y amistad que me ha brindado, mil gracias.

Un especial agradecimiento al Dr. Francisco José Fernández Perrino, por todo su apoyo, atención y paciencia, mil gracias.

Un especial agradecimiento a mi compañero y amigo el Ing. Juan Juárez, gracias por todo su apoyo durante mi estancia en el CICY.

En general a todo mi comité, sinodales, maestros, y amigos que de una u otra forma me apoyaron para seguir adelante.

A mi Familia, Hermanos, Tíos, Primos, Sobrinos, Amigos, y más.

A la familia Torres de San Juan Joluxtla, Oaxaca, por brindarme la oportunidad de conocerlos y trabajar en sus huertos de Pitaya y Jiotilla, muchas gracias.

ÍNDICE

No.	Contenido	Páginas
	RESUMEN.	11
	ABSTRACT.	14
1.0	INTRODUCCIÓN.	17
1.1	Antecedentes y justificación.	18
1.1.1	Importancia de las especies en estudio.	18
1.1.2	Situación de las poblaciones silvestres de cactáceas.	20
1.1.3	Germinación y propagación de cactáceas.	21
1.1.4	Banco de semillas.	24
2.0	CULTIVO <i>IN VITRO</i>.	26
3.0	OBJETIVOS.	28
3.1	Objetivo general.	28
3.2	Objetivos específicos.	28
4.0	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.	29
5.0	MATERIALES Y MÉTODOS.	30
5.1	Metodología para germinación y sobrevivencia de semillas.	30
5.1.1	Colecta y caracterización de frutos 2007 y 2008.	32
5.1.2	Extracción de semillas y cuantificación.	33
5.1.3	Efecto de la temperatura en la germinación en laboratorio (10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) y alternancia 30/10 °C.	34
5.1.4	Almacenamiento en laboratorio y germinación a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses.	35

5.1.5	Banco de semillas, criterios de selección y localización de los sitios. Germinación de semillas a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses de enterramiento de la colecta 2007 y 2008 en bancos de diferentes sitios.	35
5.1.6	Germinación en campo de semillas recién cosechadas colecta 2007 y 2008. Localización de los sitios.	38
5.1.6.1	Primer diseño experimental.	38
5.1.6.2	Segundo diseño experimental.	39
5.1.7	Sobrevivencia de plántulas obtenidas en gradiente de temperatura (15-35 °C) y transferidas a 25 °C (5 meses).	40
5.2	Metodología para cultivo <i>in vitro</i>.	41
5.2.1	Selección y colecta de explantes.	41
5.2.2	Desinfestación de explantes.	42
5.2.2.1	Semillas.	42
5.2.2.2	Aislamiento y desinfestación de areolas.	43
5.2.2.3	Plántulas.	44
5.2.3	Siembra de areolas.	45
5.2.4	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>E. chiotilla</i> .	46
5.2.5	Multiplicación y enraizamiento.	47
5.2.6	Transplante a suelo.	47
6.0	RESULTADOS.	48
6.1	Germinación.	48
6.1.1	Caracterización de frutos.	48
6.1.2	Efecto de la temperatura en la germinación en laboratorio,	49

(temperaturas constantes 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C);	
Alternancia 30/10 °C colectas 2007 y 2008.	
6.1.3 Sobrevivencia y germinación de semillas en laboratorio y en banco de semillas en campo (6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses).	53
6.1.3.1 Germinación a 30 °C de semillas almacenadas 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses en laboratorio colecta 2007.	53
6.1.3.2 Germinación de semillas enterradas y exhumadas 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses en banco de semillas colecta 2007.	54
6.1.4 Germinación de semillas enterradas y exhumadas en tres sitios distintos durante 6.5, 9 y 12.5 meses en banco, colectas 2007 y 2008.	57
6.1.4.1 En matorral.	57
6.1.4.2 En huerta.	59
6.1.5 Germinación de semillas en campo. Experimentos 1 y 2. Y transferidas al laboratorio a 30 °C.	64
6.1.5.1 Primer diseño experimental.	64
6.1.5.2 Segundo diseño experimental.	67
6.1.6 Sobrevivencia de plántulas obtenidas en gradiente de temperatura (15-35 °C) y transferidas a 25 °C (5 meses).	69
6.2 Resultados cultivo <i>in vitro</i>.	71
6.2.1 Desinfestación de explantes.	71
6.2.1.1 Areolas.	71
6.2.1.2 Plántulas.	72

6.2.1.3	Agentes antimicrobianos.	72
6.2.1.4	Siembra de explantes.	75
6.2.2	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>E. chiotilla</i> .	76
6.2.3	Inducción de brotes a partir de areolas de plántulas germinadas <i>in vitro</i> .	77
6.2.4	Multiplicación y enraizamiento.	81
7.0	DISCUSIÓN.	82
7.1	Germinación y banco de semillas.	82
7.1.1	Gradiente de temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C), germinación en campo y alternancia de temperatura 30/10 °C.	82
7.1.2	Almacenamiento en laboratorio.	85
7.1.3	Semillas enterradas en campo colecta 2007.	86
7.2	Discusión cultivo <i>in vitro</i>.	95
7.2.1	Desinfestación de explantes.	95
7.2.1.1	Desinfestación de las semillas.	95
7.2.1.2	Desinfestación de las areolas.	97
7.2.2	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>E. chiotilla</i> .	102
8.0	CONCLUSIONES.	106
8.1	Germinación y banco de semillas.	106
8.2	Cultivo <i>in vitro</i> .	110
9.0	PERSPECTIVAS.	112
10.0	BIBLIOGRAFÍA.	114

RESUMEN

Entre las cactáceas endémicas del matorral xerófilo del municipio de Santiago Chazumba en Oaxaca, la especie dominante es *Escontria chiotilla* (Weber) Rose. En la misma región se cultiva *Stenocereus griseus* Haworth, especie introducida que puede representar una amenaza para las poblaciones de la primera. Ambas cactáceas producen frutos de excelente sabor y calidad nutricional.

E. chiotilla se propaga exclusivamente por semilla, mientras que, *S. griseus* se propaga en huertas de forma vegetativa y, ocasionalmente, se encuentra en las comunidades naturales del matorral xerófilo y en los “quiotillales”. El objetivo de este estudio fue comparar y estudiar la sobrevivencia y la germinación de semillas de dos especies de cactáceas, una endémica *Escontria chiotilla* y otra introducida *Stenocereus griseus*, que conviven en el matorral xerófilo. Además, estudiar métodos de propagación de *E. chiotilla* para producir material de plantación que facilite la conservación de esta especie en su ambiente. Se observaron sólo ligeras diferencias en la capacidad de germinación en función de la temperatura, a pesar de que una es silvestre y la otra domesticada. La velocidad de germinación fue mayor en las semillas de *S. griseus* en todo el gradiente de temperaturas.

En los experimentos de germinación en campo, las semillas de *E. chiotilla* no germinaron. Las semillas de *S. griseus* germinaron hasta en un 29% a la sombra y en porcentajes menores con insolación directa.

La nula germinación de semillas de *E. chiotilla* y los bajos porcentajes de germinación de *S. griseus* fueron atribuidos a las fluctuaciones en la

temperatura que se registraron en el matorral. Después de almacenadas en laboratorio durante 21 meses, la capacidad de germinación en ambas especies en promedio es 90%. La velocidad de germinación es ligeramente mayor en semillas de *S. griseus*. En campo, después de 21 meses de enterramiento, la capacidad y velocidad de germinación de las semillas exhumadas de *E. chiotilla* se redujo significativamente. En semillas de *S. griseus*, después de 21 meses, no se redujo significativamente, pero a los 12 y 18 meses de enterramiento se registraron diferencias significativas tanto en la capacidad como en la velocidad de germinación. Las diferencias fueron interpretadas como resultado de la entrada y salida en latencia de las semillas por el efecto de factores ambientales. Los resultados se confirmaron en un segundo experimento de semillas almacenadas en laboratorio y enterradas en campo. Las semillas de ambas especies pueden permanecer viables en el suelo del matorral xerófilo al menos 24 meses. Por ello se propone que puede existir un banco de semillas activo de estas especies en el matorral. Sin embargo, la velocidad superior de germinación, la germinación en campo y la propagación vegetativa de *S. griseus*, que contrasta con la ausencia de vástagos de *E. chiotilla*, alerta sobre un posible desplazamiento a largo plazo de esta especie, hasta ahora dominante y endémica de algunas comunidades del matorral xerófilo.

Los explantes seleccionados de plantas adultas de *E. chiotilla* así como de plántulas de cinco meses de edad, no fueron los adecuados para la inducción de brotes vegetativos. La contaminación del medio de cultivo por microorganismos, probablemente endofíticos, además de la liberación de

compuestos fenólicos de los explantes fueron las causas que impidieron la inducción de brotes vegetativos. Los antimicrobicidas (Proclin 300 y PPM) utilizados para reducir la contaminación microbiana fueron eficientes, sin embargo, en las concentraciones en que se utilizaron provocaron un efecto de estrés en los explantes. Las concentraciones de antioxidantes que se utilizaron para disminuir el daño a los explantes por la liberación de compuestos fenólicos no fueron eficientes. Los explantes obtenidos a partir de plántulas procedentes de semillas germinadas *in vitro*, fueron los más favorables para la inducción de brotes vegetativos: de esta manera se garantizaron las condiciones asépticas de los explantes. La formación de nuevos brotes se observó a las cuatro semanas de sembrados los explantes en el medio de cultivo. El desarrollo de los nuevos brotes se dio a partir de las areolas de las plántulas, lo que coincide con el tejido meristémico. Después de 4.5 meses, en promedio se obtuvieron 48 nuevos brotes por cada explante sembrado. Después de ocho meses, las nuevas plántulas de *E. chiotilla* fueron transferidas a suelo para su aclimatación. Las concentraciones de 6-BAP, el tipo de medio de cultivo, las condiciones de luz y temperatura utilizadas en este estudio, fueron favorables para la inducción de brotes vegetativos.

ABSTRACT

Among the endemic cactaceas of the xerophilous bushes in the community of Santiago Chazumba in Oaxaca, a dominant species is *Escontria chiotilla* (Weber) Rose. In the same region, *Stenocereus griseus* Haworth and introduced specie is cultivated and it can represent a threat for the native populations.

Both cactaceas produce high nutritional quality and flavored fruits. *E. chiotilla* its propagate exclusively by seed, while *S. griseus* can be propagated in gardens or vegetative form and occasionally it could be found in natural communities of xerophilous bushes and "quiotillales".

On the germination experiments on the field, the seeds of *E. chiotilla* didn't germinate. The seeds of *S. griseus* reach 29 % of germinative rate in the shade and in minor percentages with direct sunstroke. The arrested germination of *E. chiotilla* seeds and the low rate of germination of *S. griseus* can be due to attributed to the fluctuations in the temperature on the bushes regions. After been stored in laboratory for 21 months, the capacity of germination in both species reach 90 % in average.

The germination speed is lightly higher in seeds of *S. griseus*. Under specific conditions, after 21 months of being buried, the capacity and speed of germination of the exhumed seeds of *E. chiotilla* diminished significantly. In seeds of *S. griseus*, after 21 months, it didn't reduce significantly, but in 12 and 18 months of burial significant differences in the capacity and the speed of germination were observed. The differences can be due to a result

of the entry and exit of latency process of the seeds driven by the effect of environmental factors.

The results were confirmed in the second experiment using seeds stored in laboratory and buried in field. The seeds of both species can remain viable in the ground of the xerophilous bushes at least 24 months.

Based on those results an active bank of seeds of these species in the bushes must be started.

Nevertheless, the germination top speed, the germination in field and the vegetative spread of *S. griseus*, that contrasts with the absence of scions of *E. chiotilla*, alert on a possible long term displacement of this species, until now dominant and endemic of some communities of the xerophilous bushes. The explants selected of adult plants and seedling of *E. chiotilla* were five months of age, and were not adapted for the induction of vegetative outbreaks. The pollution by microorganisms, probably endofitic, besides the release of phenolic compounds of the explants were the reasons to prevented the induction of vegetative outbreaks.

The antimicrobicide compound (Proclin 300 and PPM) used to reduce the microbial pollution was efficient, nevertheless, an effect of stress in the explants was observed under the concentrations applied. The concentrations of antirust that were in use for diminishing the damage to the explants for the liberation of phenolic compounds were not efficient. The explants obtained from seedling proceeding from germinated *in vitro* seeds were the most favorable for the induction of vegetative outbreaks: in this way the aseptic conditions of the explants were guaranteed.

The formation of new outbreaks was observed 4 weeks after induction. The development of the new outbreaks gave itself from the areolas of the seedling, which contain the meristematic tissue. After 4.5 months in average 48 new outbreaks were obtained of every sowed explants. After 8 months, the new seedling of *E. chiotilla* were transferred to soil for acclimatization. The 6-BAP concentration, the culture medium, the light conditions and the temperature used in this study, were favorable for the induction of vegetative outbreaks.

1.- INTRODUCCIÓN

La vegetación del municipio de Santiago Chazumba en Oaxaca incluye un tipo de matorral xerófilo cuya especie dominante es *Escontria chiotilla* (Weber) Rose y ha sido denominado “quiotillal”, término que se deriva del nombre común “chiotilla” (Rzedowski, 1986; Valiente-Banuet *et al.*, 2000).

E. chiotilla es una especie endémica de la Mixteca Baja y pertenece a la familia *Cactaceae*. Esta familia ocupa el quinto lugar en diversidad en el país, con alrededor de 55 géneros y 850 especies (Rzedowski, 1978). México es el principal centro de diversificación de cactáceas, con un 70% de endemismos (Bravo-Hollis y Sánchez–Mejorada, 1991; Mandujano *et al.*, 2002).

De la gran variedad de cactáceas presentes en el país, algunas (muy poco estudiadas hasta la fecha) producen frutos comestibles con notables propiedades nutricionales y excelente calidad, tal es el caso de *E. chiotilla* (Arellano y Casas, 2003; Tinoco *et al.*, 2005).

El género *Escontria* es monoespecífico, pertenece a la Subtribu *Stenocereinae* y se distribuye principalmente en las regiones áridas y semiáridas de los Estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero, Morelos y Michoacán, en donde se recolectan los frutos para autoconsumo y comercialización local (Bravo-Hollis, 1978; Bravo-Hollis y Sánchez–Mejorada, 1991). En la misma región se cultiva *Stenocereus griseus* Haworth que pertenece a la misma Subtribu (Sánchez, 1984; González, 2006).

El origen del género *Stenocereus* se sitúa en las Antillas (Sánchez, 1984; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; González, 2006). Se ha sugerido que a partir de ahí emigró hasta llegar a México, (Martínez, 1983).

En México se encuentran 19 especies de las 24 que conforman el género *Stenocereus* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; González, 2006).

La presencia de *S. griseus* ha sido reportada en los Estados de Puebla y Oaxaca (Arellano y Casas, 2003). *S. griseus* se propaga en huertas y, ocasionalmente, se encuentra en las comunidades naturales del matorral xerófilo incluidos los “quiotillales” (Arellano y Casas, 2003).

E. chiotilla y *S. griseus* son dos especies de cactáceas cercanamente emparentadas, que se distinguen sin embargo por su origen y por su participación en la dinámica de las comunidades en las que se encuentran. El cultivo de cactáceas frutales en la región influye en la composición de los matorrales xerófilos, entre ellos los “quiotillales”. Puesto que la germinación y el establecimiento, así como la propagación, son los procesos de reclutamiento de individuos en las poblaciones y comunidades, en este trabajo se realizaron estudios sobre la fisiología de semillas en *E. chiotilla* y *S. griseus*, así como del cultivo *in vitro* de *E. chiotilla* como una alternativa de propagación.

1.1.- Antecedentes y justificación

1.1.1.- Importancia de las especies en estudio

E. chiotilla y *S. griseus* son dos especies que producen frutos de excelente sabor y gran calidad nutricional (Arellano y Casas 2003; Tinoco *et al.*, 2005; González, 2006). La primera se comercializa sólo en mercados locales del país y la segunda en mercados nacionales y latinoamericanos (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994). Los frutos de ambas especies son succulentos y tienen un alto contenido de proteínas y fibra, aunque sólo se consumen en la temporada de cosecha abril-mayo-junio

(González, 2006). *E. chiotilla* produce frutos de color rojo, *S. griseus* produce frutos de color naranja, rojo y amarillo, pudiendo ser ambas especies fuente de pigmentos para la industria alimentaria.

La evaluación del mercado potencial de ambas especies las identifica como productos de alta calidad con grandes oportunidades de comercialización, nacional e internacional (Arellano y Casas, 2003). Sin embargo, debe lograrse una producción sostenida y una calidad homogénea de frutos para satisfacer la demanda en la ventana comercial en la que se oferten.

Arellano y Casas (2003) han reportado que *E. chiotilla* se reproduce exclusivamente por semilla en el matorral espinoso que es su hábitat natural. No se reporta propagación vegetativa, como en el caso de otros cactus columnares, incluidas las especies de *Stenocereus*.

Experimentos agronómicos con *E. chiotilla*, no lograron obtener plantas por reproducción vegetativa; “un año después de la siembra las ramas de “jiotilla” no produjeron brotes. La mayoría de las ramas murieron y las pocas sobrevivientes presentaban serios daños producidos por insectos y patógenos” (López–Gómez *et al.*, 2000).

Un mejor conocimiento de la reproducción y sobrevivencia de semillas y de las dificultades que plantea el establecimiento de las plántulas, así como la exploración de tecnologías de micropropagación, podrían contribuir a promover métodos para un mejor aprovechamiento de *E. chiotilla*. La utilización del cultivo *in vitro* para propagar fenotipos seleccionados para su establecimiento en huertas sería un paso inicial para impulsar la producción de frutas con la continuidad y calidad que exigen los mercados.

En el caso de *S. griseus* existen reportes de que esta especie puede reproducirse vegetativamente (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; López-Gómez *et al.*, 2000), lo que ha permitido avances en su domesticación, pero como otras cactáceas tiene un crecimiento lento.

1.1.2- Situación de las poblaciones silvestres de cactáceas

Las poblaciones silvestres de *E. chiotilla* así como de otros géneros de la familia *Cactaceae* se encuentran frecuentemente fragmentadas, debido a la degradación de las comunidades naturales donde se distribuyen y crecen. Entre los factores que reducen el área de distribución y que modifican la dinámica de las poblaciones de cactáceas están: la agricultura, la ganadería, los asentamientos humanos y el desarrollo industrial, además de la colecta ilegal y la explotación excesiva de ejemplares para el comercio nacional e internacional y la introducción de especies ajenas a las comunidades naturales de la región (Benítez y Dávila, 2002; Arellano y Casas, 2003; Medeiros *et al.*, 2006).

Por lo anterior, resulta necesario implementar programas de rescate, manejo y conservación de especies amenazadas que incluyan métodos eficientes de reproducción *in vivo* e *in vitro* (Vyskot y Jara, 1984; Rubluo *et al.*, 1993; Pérez-Molphe *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 2002; Mandujano *et al.*, 2002; García-Saucedo *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2006; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007).

La reproducción *in vitro* de *E. chiotilla* no se ha reportado. El desarrollo de esta tecnología podría promover la propagación de plantas con mejores características agronómicas y de producción de frutos.

Las cactáceas están ligadas al desarrollo de las sociedades humanas asentadas en nuestro país desde tiempos remotos. Por su adaptación a condiciones de aridez, son recursos apreciados no solo por constituir una fuente de alimento humano y animal, sino además por la gama de usos que proporcionan a las poblaciones humanas asentadas en sitios con limitada disponibilidad de agua (Bravo-Hollis *et al.*, 1978; Casas, 2002). Las poblaciones de *E. chiotilla* se pueden encontrar en forma silvestre, pero también en poblaciones manejadas *in situ* (Arellano y Casas, 2003).

Casas (2002) ha reportado los siguientes usos para *E. chiotilla*: frutos comestibles, forraje, para la elaboración de bebidas alcohólicas, semillas y flores comestibles, cercas vivas y leña.

El impacto socioeconómico para los agricultores de la región, considerada como una de las de más bajos recursos económicos del país, justifica la investigación aplicada al aprovechamiento y conservación de *E. chiotilla*.

1.1.3.- Germinación y propagación en cactáceas

La germinación es el resultado de la interacción tanto de las características genéticas de las especies que determinan los procesos de desarrollo, la morfología y la fisiología de las semillas como de los factores ambientales (Ohto *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). Entre estos últimos se incluyen el agua, la temperatura, el oxígeno, la luz y el nitrato.

La reproducción sexual y la propagación vegetativa son mecanismos a través de los cuales las plantas regeneran sus poblaciones (Harper, 1977; Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998; Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007). En particular, la germinación

de semillas como producto de la reproducción sexual permite la recombinación genética, contribuyendo a la adaptación de las especies a los cambios medioambientales, además de la colonización de nuevos hábitats (Abrahamson, 1980; Godínez-Álvarez *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2004; Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2004; Ramírez-Padilla y Valverde, 2005).

En los estudios de germinación y latencia se toman en cuenta las interacciones entre las semillas y los diversos factores bióticos y abióticos (Allen *et al.*, 2007). El efecto de dichos factores sobre la germinación y la latencia de las semillas, están directamente relacionados con el hábitat de las especies y el papel ecológico que desempeñan en las comunidades vegetales a las que pertenecen.

En cuanto al comportamiento germinativo, existen numerosos enfoques: molecular (Salaita *et al.*, 2005; Nonogaki *et al.*, 2007), fisiológico (Bewley y Black, 1994; Yoshioka *et al.*, 1998), ecológico (Baskin y Baskin 1998); agronómico (Batlla *et al.*, 2004).

Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000) reportan el comportamiento germinativo de algunas especies de cactáceas en función a la temperatura en que fue evaluado (Tabla 1).

Las diferencias observadas en el efecto de la temperatura sobre la germinación se interpretan considerando la distribución geográfica de las especies, los períodos de fructificación y las posibles adaptaciones a diferentes microclimas de las regiones áridas y semiáridas.

Tabla 1. Reportes de germinación de especies de cactáceas obtenida a diferentes temperaturas.

ESPECIE	TEMPERATURA	REFERENCIA
<i>Carnegiea gigantea</i>	25 °C	(Alcorn y Kurtz, 1959)
<i>Pereskia aculeata</i>	33 °C	(Dau y Labouriau, 1974)
<i>Ferocactus latispinus</i> var. <i>Spiralis</i>	25 °C	(Cota-Sánchez, 1984)
<i>Ferocactus histrix</i>	24 ± 1.5 °C	(Del Castillo, 1986)
<i>Astrophytum myriostigma</i>	15-25 °C	(Arredondo-Gómez y Camacho-Morfin, 1995)
<i>Pachycereus hollianus</i> , <i>Cephalocereus chrysacanthus</i> , <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> , <i>Echinocactus platyacanthus</i> , <i>Ferocactus flavovirens</i> , <i>F. recurvus</i> var. <i>recurvus</i> , y <i>F. robustus</i>	10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C, Alternancia 0/10, 5/20, 10/25, 15/30 y 20/35 °C	(Rojas-Aréchiga et al., 1998)
<i>Stenocereus stellatus</i>	25 °C, 20/35 °C	(Rojas-Aréchiga et al., 2001)
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> , <i>N. tetetzo</i> y <i>N. macrocephala</i>	18-32 °C	(Ramírez-Padilla y Valverde, 2005)
<i>Opuntia rastrera</i>	30 °C	(Mandujano et al., 2005)
<i>Denmoza rhodacantha</i>	30 °C	(Méndez, 2007)
<i>Trichocereus terscheckii</i>	25 °C, 25/35 °C	(Ortega-Baes y Rojas Aréchiga, 2007)
<i>Stenocereus pruinosus</i> , <i>Polaskia chichipe</i> , <i>Myrtillocactus schenckii</i> y <i>Polaskia chende</i>	25 °C	(Guillén et al., 2009)

La domesticación es un proceso que implica cambios morfológicos y fisiológicos en las especies seleccionadas por el hombre (Evans, 1993b; Rojas-Aréchiga et al., 2001). Por ejemplo, la selección humana favorece el incremento en los

porcentajes de germinación, el vigor de las plantas y la variabilidad de los cultivos (Casas *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 1999a; Rojas- Aréchiga *et al.*, 2001).

Los mecanismos de dispersión de semillas y los agentes que participan en ella, tienen un particular interés en los estudios de germinación de las especies y de la dinámica de las comunidades a las que pertenecen, dado que las cactáceas participan no sólo como especies dominantes de los matorrales (Rzedowski, 1986), sino que pueden actuar como especies nodriza, facilitando la germinación de otras especies en esas comunidades. La reducción de las poblaciones de cactáceas en las comunidades naturales enfrenta, además, el riesgo adicional de desaparición de la fauna asociada a éstas.

Poco se conoce acerca de la biología de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* (Williams y Arias, 1978; Martínez, 1983; Martínez *et al.*, 1983), por lo que en este trabajo se estudió la germinación de semillas de estas especies en laboratorio y en campo.

1.1.4.- Banco de semillas

El banco de semillas participa en la dinámica de las comunidades en las regiones áridas y semiáridas, como reservorio natural de semillas en el suelo de una gran variedad de especies (Pablo, 2003). El banco de semillas está compuesto por abundantes semillas, se caracteriza por fluctuaciones en densidad en el espacio y tiempo (Harper, 1977; Thompson y Grime, 1979; Fenner, 1985; Thompson, 1987; Chambers y MacMahon, 1994; Guterman, 1994).

Las semillas viables disponibles para una potencial germinación y el reclutamiento de nuevos individuos constituyen el banco de semillas en las regiones áridas y semiáridas (Baker, 1989; Baskin y Baskin, 1998; Montiel y Montaña, 2003).

La importancia de este reclutamiento radica en que es derivado de la reproducción sexual, permitiendo mantener la variabilidad genética en la comunidad y permitiendo que algunos de los nuevos individuos reclutados puedan tolerar cambios en las condiciones ambientales (Harper, 1977; Simpson *et al.*, 1989; Thompson, 1992; Montiel y Montaña, 2003).

La latencia en semillas, además de otros factores como la granivoría, afecta directamente la efectividad del banco de semillas para reclutar nuevos individuos; además favorece la acumulación de semillas (Evans y Cabin, 1995; Baskin y Baskin, 1998; Montiel y Montaña, 2003).

Poco se sabe de la dinámica del banco de semillas en ambientes áridos y semiáridos, como es el caso del matorral xerófilo. Existen estudios de la estimación cuantitativa de semillas en el banco, por ejemplo en *Opuntia rastrera* (especie dominante del desierto de Chihuahua) se estima que de cada siete millones de semillas en una hectárea sólo una plántula se establece en este hábitat (Montiel y Montaña, 2003).

Estudios sobre longevidad, viabilidad y permanencia de semillas en el banco no han sido realizados, además de que se sabe poco sobre los procesos que afectan a la dinámica del banco de semillas, así como a la integridad de las semillas que lo forman, y en particular en especies perennes, como es el caso de las especies de cactáceas (Baskin y Baskin, 1998). Por esta razón, en el presente trabajo se realizaron estudios de banco de semillas de las especies seleccionadas.

2.0.- Cultivo *in vitro*

La micropropagación es la técnica de multiplicación vegetativa a través del cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales. El gran potencial de esta técnica radica en su capacidad de producir plantas libres de enfermedades, más vigorosas y de rápido crecimiento. Aunque aplicable a prácticamente todas las especies vegetales, la micropropagación tiene un amplio campo de utilización: en la agricultura, horticultura, y forestales, beneficia particularmente a plantas de ciclo de vida largo (Robert *et al.*, 2006), como es el caso de *E. chioitilla*.

El cultivo *in vitro* ha probado ser una herramienta eficaz para la micropropagación de diferentes géneros de cactáceas, tales como *Cereus* (Machado y Prioli, 1996), *Echinocereus*, *Ferocactus* y *Mammillaria* (Pérez-Molphe *et al.*, 1998), *Opuntia* (Escobar *et al.*, 1986; Juárez y Passera, 2002; García-Saucedo *et al.*, 2005) y *Notocactus* (Medeiros *et al.*, 2006), entre otros.

Se ha propuesto también, que la propagación *in vitro* es una alternativa factible para la multiplicación y conservación del germoplasma de especies de cactáceas (Medeiros *et al.*, 2006). Estas técnicas se han empleado tanto con fines comerciales como en laboratorios de investigación (Hartmann, 1989; Robert *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2006).

No existe un método universal para el cultivo *in vitro* de una especie, sin embargo, en los sistemas de micropropagación se reconocen estados secuenciales que se distinguen según el propósito del propagador (Murashige *et al.*, 1974; Wetherell, 1982; Hartmann y Kester, 1989; Robert *et al.*, 2004).

La metodología que se propuso en este estudio estuvo basada en los cinco estados secuenciales reportados por Murashige (1974) y Robert *et al.* (2004):

preparación de la planta madre (donadora del explante), establecimiento del cultivo *in vitro*, multiplicación, enraizamiento y transferencia a suelo.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Comparar y estudiar la sobrevivencia y la germinación de semillas de dos especies de cactáceas, una endémica *Escontria chiotilla* (Weber) Rose y otra introducida *Stenocereus griseus* Haworth, que conviven en el matorral xerófilo y, estudiar métodos de propagación de *E. chiotilla* para producir material de plantación que facilite la conservación de esta especie en su ambiente.

3.2.- Objetivos específicos

- Comparar la viabilidad y germinación de semillas en un gradiente de temperaturas de (10-35 °C) en dos períodos de fructificación (2007 y 2008) de *E. chiotilla* y *S. griseus*.
- Comparar la viabilidad y germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* sembradas en matorral y huerta en dos condiciones (luz y sombra).
- Comparar la viabilidad, sobrevivencia y germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* después de almacenadas en laboratorio y después de mantenerlas entre 6.5 y 21 meses en el suelo del matorral xerófilo.
- Determinar la sobrevivencia de plántulas de *E. chiotilla* y *S. griseus* durante cinco meses en laboratorio.
- Explorar técnicas de micropropagación, eficientes y de bajo costo, por medio del cultivo en medio semisólido para la producción de plántulas de *E. chiotilla*.

4- PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- A. ¿Se presentan diferencias en la capacidad y velocidad de germinación en semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* en el gradiente de temperatura comprendida entre 10 y 35 °C en dos años 2007 y 2008?
- B. ¿Se presentan diferencias en la capacidad y velocidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* cuando son sembradas en campo a insolación directa y bajo la cobertura vegetal?
- C. ¿El almacenamiento a lo largo de 21 meses en laboratorio modifica el comportamiento germinativo en semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus*?
- D. ¿La permanencia en el suelo del matorral xerófilo, a lo largo de 21 meses, modifica el comportamiento germinativo de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus*?
- E. ¿Cuál es la sobrevivencia de plántulas de *E. chiotilla* y de *S. griseus* mantenidas en laboratorio durante cinco meses?
- F. Para inducir el desarrollo de brotes vegetativos en *E. chiotilla* ¿qué tipo de explante es más adecuado, a partir de areolas obtenidas de ramas maduras o de plántulas de cinco meses de edad?

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1- Metodología para germinación y sobrevivencia de semillas

La Mixteca Baja Oaxaqueña y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán son dos regiones colindantes localizadas en el noroeste del Estado de Oaxaca y el sureste del Estado de Puebla. Estas regiones pertenecen a dos cuencas hidrológicas distintas (Balsas y Papaloapan), aunque probablemente en el pasado ambas formaron parte de la Cuenca del Balsas (Figura 1). Es por esto, entre otros aspectos biogeográficos, que comparten principalmente dos tipos de vegetación: bosque tropical caducifolio y el matorral espinoso y presentan relaciones en su composición florística (Rzedowski, 1978; Luna *et al.*, 2001). *Bursera spp.*, *Ceiba parvifolia*, *Stenocereus stellatus*, *Stenocereus griseus*, *Pachycereus weberi*, *Escontria chiotilla* y *Cyrtocarpa procera* son algunas de las especies que comparten las dos regiones.

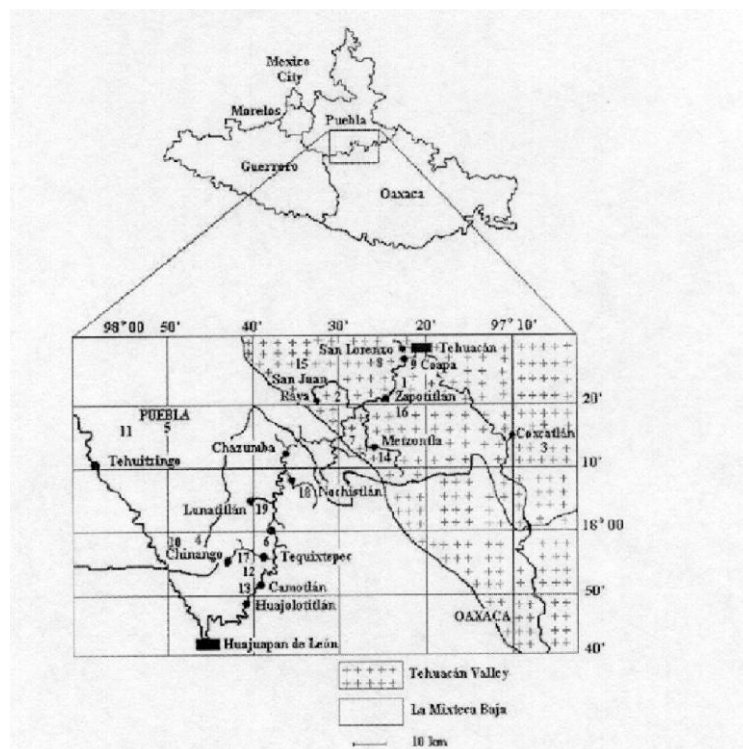


Figura 1. Valle de Tehuacán-Cuicatlán y Regiones de la Mixteca Baja Oaxaqueña.

La metodología para el estudio de la germinación y sobrevivencia de semillas se resume en el siguiente diagrama de flujo. Nota: Los sitios 1, 2, 3 y 4 son los mismos para experimentos de germinación en campo y para almacenamiento en campo (Banco). Tabla 2.

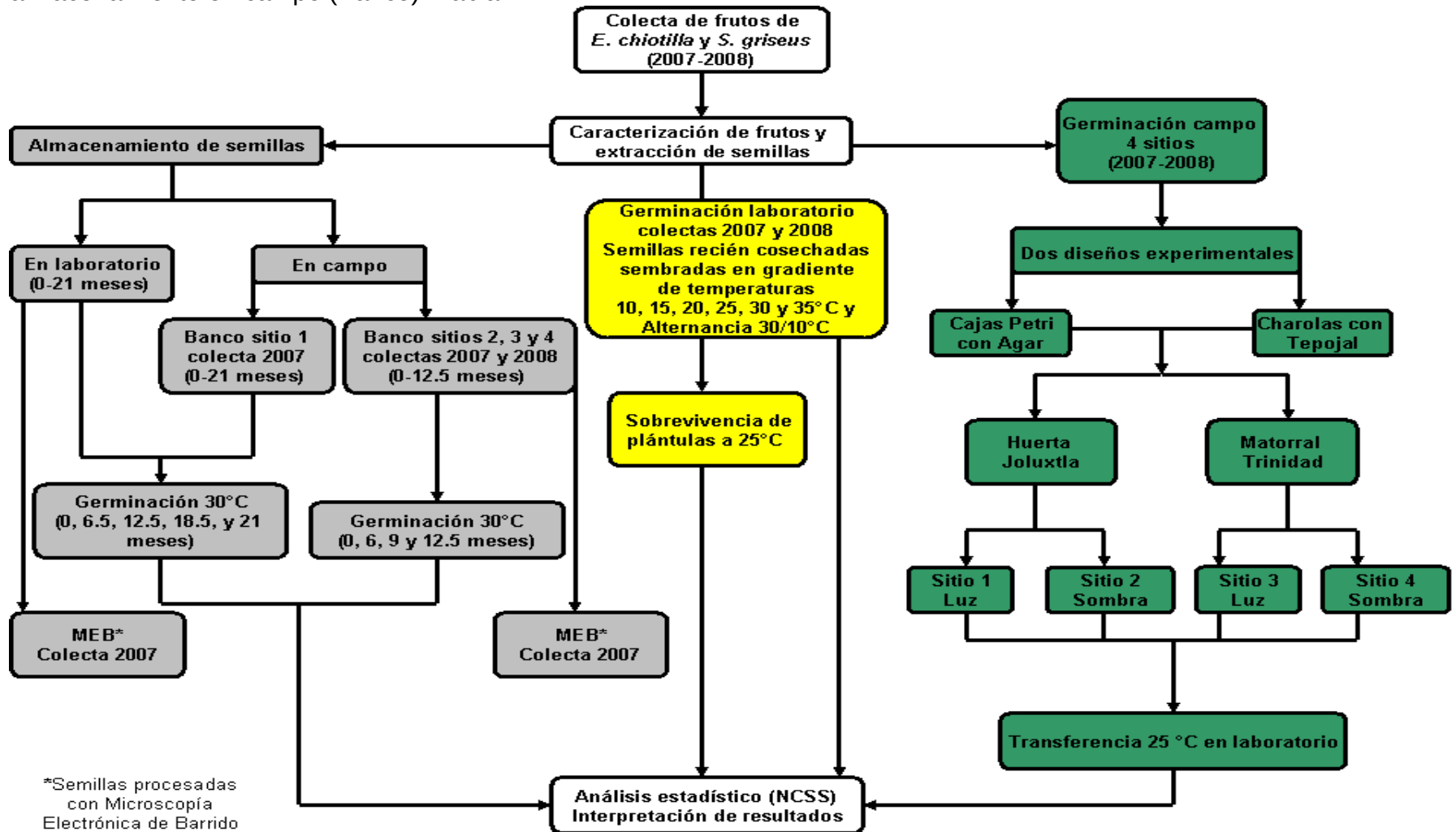


Tabla 2. Ubicación y temperatura promedio registrada en los sitios de estudio en campo.

Sitios		Ubicación	Georeferencia	Temperatura Promedio
HUERTA	1° Luz	Municipio de San Juan Joluxtla, Oaxaca.	18° 16' 37" N 97° 74' 36" O 2, 665 msnm.	43 °C
	2° Sombra	Municipio de San Juan Joluxtla, Oaxaca.	17° 31' N. 97° 32' O. 1,820 msnm.	36.2 °C
MATORRAL	3° Luz	Municipio de Santiago Chazumba, localidad de Trinidad Huaxtepec, Oaxaca.	18° 16' 96" N 97° 71' 18" O 1,805 msnm.	34.1 °C
	4° Sombra	Municipio de Santiago Chazumba, localidad de Trinidad Huaxtepec, Oaxaca.	18° 16' 24" N 97° 70' 93" O 1,794 msnm.	32.9 °C

Las temperaturas promedio reportadas en la Tabla 2 fueron obtenidas de mediciones hechas en los sitios de estudio, en total se realizaron 13 visitas del 20/06/08 al 13/11/10.

5.1.1.- Colecta y caracterización de frutos 2007 y 2008

El 26 de Mayo de 2007 y el 01 de Mayo de 2008 un total de 78 frutos maduros de *E. chiotilla* y 144 de *S. griseus* fueron colectados en huertas establecidas y en poblaciones silvestres en diferentes localidades del Estado de Oaxaca (Tabla 3). Para complementar la colecta se compraron frutos en el mercado de frutas de Tehuacan, Puebla, de acuerdo a la información proporcionada por el locatario, los frutos provienen de diferentes comunidades de la Mixteca Baja, entre ellas, Santiago Chazumba, San Juan Joluxtla y Trinidad Huaxtepec. Los frutos colectados y comprados se transportaron al Laboratorio de Ecofisiología Vegetal de la UAM-Iztapalapa, donde se realizó la caracterización de los frutos y la extracción de semillas.

Inventario de frutos colectados:

Colecta 2007 26 de Mayo de 2007	Frutos colectados
<i>Escontria chiotilla</i>	36
<i>Stenocereus griseus</i>	78
Colecta 2008 01 de Mayo de 2008	
<i>Escontria chiotilla</i>	42
<i>Stenocereus griseus</i>	66

Tabla 3. Ubicación de huertas de *S. griseus* y poblaciones silvestres de *E. chiotilla*.

Localidad	Georeferencia	Vegetación
Trinidad Huaxtepec.	18° 10' 20" N. 97° 41' 99" W. Altitud: 1,813 msnm.	Poblaciones silvestres mezcladas de <i>Escontria chiotilla</i> , <i>Lipia graviolis</i> , <i>Prosopis spp.</i> y <i>Stenocereus griseus</i> .
Santa María Acaquizapán.	18° 08' 01" N. 97° 42' 27" W. Altitud: 1,775 msnm.	Poblaciones silvestres de <i>Escontria chiotilla</i> , <i>Stenocereus griseus</i> y <i>Stenocereus stellatus</i> .
Huerta de Lunatitlán del Progreso.	18° 10' 4" N. 97° 44' 5" W. Altitud: 2,548 msnm.	Poblaciones manejadas de <i>Escontria chiotilla</i> .
Huerta de San Juan Joluxtla.	17° 31' N. 97° 32' W. Altitud: 1,820 msnm.	Poblaciones mezcladas de <i>Stenocereus griseus</i> y <i>Escontria chiotilla</i> .

5.1.2.- Extracción de semillas y cuantificación

Las semillas se separaron de los frutos tamizando la pulpa y enjuagando a chorro de agua. Para su secado, las semillas se juntaron en el tamiz y se colocaron en papel y toallas absorbentes. Se contó el número de semillas por fruto.

5.1.3- Efecto de la temperatura en la germinación en laboratorio (10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C) y alternancia 30/10 °C

Para conocer el comportamiento germinativo de ambas especies en función de la temperatura, el 29 de Junio y 02 de Julio de 2007 y el 03 de Julio de 2008, se sembraron tres lotes de 50 semillas en cajas de Petri con agar al 1% a temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C, fotoperíodo 12/12 h. Para determinar el fotoblastismo se sembró un lote de 25 semillas en la oscuridad recubriendo la caja con papel de aluminio. El 31 de Marzo de 2009 se sembraron seis lotes de 50 semillas de ambas colectas para ambas especies en alternancia de temperatura 30/10 °C; fotoperíodo 14 horas oscuridad/10 horas luz. Se estimó la capacidad y velocidad de germinación durante 21 días, los resultados fueron procesados estadísticamente utilizando el programa NCSS (Hintze, 2001).

Antes de la siembra, las semillas se desinfestaron con cloro comercial al 2% durante 20 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada.

Este procedimiento de germinación ha sido utilizado para otras especies de cactáceas, como *Pachycereus hollianus*, *Cephalocereus chrysacanthus*, *Neobuxbaumia tetetzo*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus flavovirens*, *Ferocactus recurvus*, *Ferocactus robustus*, y *Stenocereus stellatus* (Rojas-Aréchiga et al., 1998; Rojas-Aréchiga et al., 2001; Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007).

5.1.4.- Almacenamiento en laboratorio y germinación a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses

Para estimar la longevidad y viabilidad de las semillas almacenadas en el laboratorio, el 24 de Junio de 2007 se guardaron en bolsas de papel 10 lotes de 1000 semillas a temperatura ambiente (25 ± 5 °C) en laboratorio, método utilizado por otros autores (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001; Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007).

Aproximadamente cada seis meses (Tabla 4) durante un período de 21 meses, se recuperaron y se sembraron seis lotes de 50 semillas en cajas de Petri con agar al 1% a 30 °C, fotoperíodo 12/12 h. Se estimó la capacidad y velocidad de germinación después de almacenadas en el laboratorio. Se observó mediante microscopía electrónica de barrido la testa de las semillas a los 21 meses de almacenamiento en laboratorio.

5.1.5.- Banco de semillas, criterios de selección y localización de los sitios. Germinación de semillas a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses de enterramiento de la colecta 2007 y 2008 en bancos de diferentes sitios

Para estimar la longevidad y viabilidad de las semillas en el banco del matorral xerófilo, el 24 de Junio de 2007 se colocaron en bolsas de malla plástica reticulada de 5 X 5 cm, con reticulado de 1 mm, 10 lotes de 1000 semillas para cada especie. Las bolsas se enterraron a una profundidad de 5 a 7 cm en suelo de la huerta del Municipio de San Juan Joluxtla (Sitio 1, Tabla 2); este método ha sido utilizado por otros autores (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009). El reticulado de las

bolsas permite que las semillas estén en contacto directo con el suelo, como sí estuvieran enterradas de forma natural.

Aproximadamente cada seis meses (Tabla 4) durante un período de 21 meses, las semillas fueron retiradas del banco y se sembraron seis lotes de 50 semillas por cada especie en cajas de Petri con agar al 1% a 30 °C con fotoperíodo 12/12 h. Se estimó la capacidad y velocidad de germinación. Para estimar cambios en la testa de las semillas después de su permanencia en el suelo, un lote de 15 semillas se procesó mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados fueron procesados estadísticamente utilizando el programa NCSS (Hintz, 2001).

En un segundo experimento de sobrevivencia de semillas en el banco, se aumentaron los sitios para enterrar semillas, además del sitio inicial ubicado en la Huerta de San Juan Joluxtle y expuesto a insolación directa (S1), se eligió un sitio a la sombra en la misma huerta (S2). Por otra parte en el matorral xerófilo ubicado en el Km 67.5 de la desviación de la carretera federal Tehuacan-Huajuapán, Oaxaca se eligieron dos sitios más, expuestos tanto a insolación directa (S3) como en sombra (S4).

El 30 de Agosto de 2008 se colocaron 10 lotes de 1000 semillas para cada especie de las colectas 2007 y 2008. Las semillas se enterraron en bolsas de malla plástica a una profundidad de 5 ± 2 cm en tres sitios: en huerta sombra, en matorral insolación directa y en matorral a la sombra. Aproximadamente cada seis meses se recuperó un lote de semillas de cada sitio (Tabla 4) y se llevó al laboratorio, se tomaron 300 semillas, se desinfestaron con cloro y se sembraron en caja Petri con Agar en una germinadora a 30 °C fotoperíodo 12/12 h. Fueron sembradas a esta temperatura por ser la temperatura óptima de germinación en

ambas especies. Para determinar los parámetros de capacidad y velocidad de germinación, se obtuvieron datos diarios de número de semillas germinadas y se transformaron a porcentajes. Se comparó la capacidad y velocidad de germinación por año de colecta, por sitio y por especie. Cabe señalar que las semillas de la colecta 2007 antes de enterradas permanecieron 14 meses almacenadas en laboratorio a 25 ± 5 °C. Las semillas de la colecta 2008 se enterraron justo después de la cosecha. Los resultados fueron validados estadísticamente aplicando la prueba estadística ANOVA.

Tabla 4. Fechas de almacenamiento, enterramiento y exhumación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus*, colectas 2007 y 2008.

Sitios	Colectas	Fecha de enterramiento	Fecha de exhumación	Tiempo transcurrido
Huerta sitio 1 (Luz)	(26/05/2007)	24/06/2007	19/01/2008	6.5 meses
			01/07/2008	12.5 meses
			25/01/2009	18.5 meses
			29/06/2009	21 meses
Huerta sitio 2 (Sombra)	26/05/2007 01/05/2008	30/08/2008	25/01/2009	6 meses
			29/06/2009	9 meses
			13/09/2009	12.5 meses
Matorral sitio 1 (Luz)	26/05/2007 01/05/2008	30/08/2008	25/01/2009	6 meses
			29/06/2009	9 meses
			13/09/2009	12.5 meses
Matorral sitio 2 (Sombra)	26/05/2007 01/05/2008	30/08/2008	25/01/2009	6 meses
			29/06/2009	9 meses
			13/09/2009	12.5 meses

Se considera que una semilla ha germinado cuando la radícula emerge a través de los tegumentos de la semilla (Fenner y Thompson, 2005; Bradford y Nonogaki, 2007).

La germinación se evaluó mediante la determinación de la capacidad de germinación expresada en %. La velocidad de germinación se estimó mediante el

cálculo del índice de: Días Medios de Germinación (DMG)* durante 21 días después de la siembra (Avilán ,1998).

$$* (DMG) = (N_1T_1) + (N_2T_2) + \dots (N_nT_n) / N_1 + N_2 + \dots N_n.$$

Donde: N1 es el número de semillas germinadas en el tiempo T1, N2 es el número de semillas germinadas entre el intervalo de tiempo T1 y T2. Para comparar la velocidad de germinación los datos se analizan mediante la prueba estadística ANOVA.

5.1.6.- Germinación en campo de semillas recién cosechadas colecta 2007 y 2008. Localización de los sitios

5.1.6.1.- Primer diseño experimental

Para conocer el comportamiento germinativo en campo se eligieron cuatro sitios (Tabla 2). El 20 de Junio de 2008 se sembraron seis lotes de 50 semillas en cajas de Petri con agar al 1% para cada especie de la colecta 2007 (semillas almacenadas en laboratorio 13 meses) y la colecta 2008 (semillas recientes). Las cajas se colocaron a nivel del suelo en cuatro sitios del matorral xerófilo (Tabla 2) en dos condiciones: tres lotes a la luz y tres lotes a la sombra. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri debido a su tamaño (>3 mm). Sembrarlas de esta manera evitó que las semillas se extraviaran en el suelo o fueran depredadas. La capa superficial del suelo del matorral retiene la humedad por poco tiempo, en este diseño experimental el agua no fue un factor limitante, pues las cajas fueron cubiertas con bolsas de plástico para evitar la pronta evaporación.

Después de 20 días, el 09 de Julio de 2008 las semillas que no germinaron en campo se transfirieron a 25 °C al laboratorio. Allí, se sembraron tres lotes de 50

semillas en cajas de Petri con agar al 1% para cada especie y año de colecta a temperatura constante de 25 °C, fotoperíodo 12/12 h. Se estimó la capacidad y velocidad de germinación durante 21 días.

5.1.6.2.- Segundo diseño experimental

El 16 de Mayo de 2009, en contenedores de plástico transparente sin tapa de 22 X 20 cm y una altura de 4.5 cm, conteniendo 300 gramos de una mezcla de tepojal, vermiculita y agrolita en proporciones iguales (1:1:1), se sembraron seis lotes de 50 semillas por cada especie y año de colecta, además de dos lotes con semillas que permanecieron nueve meses en el banco. De la misma forma, se sembraron en una mezcla de suelo de la localidad, vermiculita y agrolita tres lotes de 50 semillas para cada especie y año de colecta.

Al igual que en el primer diseño experimental, el tamaño de las semillas (2-3 mm) dificultó que fueran sembradas directamente en el suelo. El suelo del matorral forma una capa cementante al ser humedecido y rápidamente pierde la humedad y se endurece, éste es un factor que podría limitar la germinación de las semillas. Para que el agua no fuera una limitante en la germinación de las semillas, el sustrato fue humedecido a saturación cada tercer día.

Los contenedores se dispusieron a nivel del suelo en el matorral xerófilo en dos condiciones: a la luz y a la sombra. Para evitar la depredación de las semillas y que los contenedores se inundaran de agua (debido a que la siembra se realizó durante la época de lluvias), éstos fueron cubiertos con una placa de vidrio transparente de 90 X 90 cm a una altura de 40 cm del suelo. Aunque la presencia de la lámina presenta inconvenientes, resultó necesaria para evitar la interferencia

por la lluvia de semillas o la pérdida, por dispersión zoócora o por depredación, entre otras.

Se estimó la capacidad y velocidad de germinación durante seis semanas (del 16 de Mayo al 27 de Junio de 2009), para comparar los resultados fueron procesados estadísticamente utilizando el programa NCSS.

5.1.7.- Supervivencia de plántulas obtenidas en gradiente de temperatura (15-35 °C) y transferidas a 25 °C (5 meses)

Las plántulas obtenidas en el gradiente de temperatura para la colecta 2007 se transplantaron a charolas de plástico que contenían una mezcla de tepojal y vermiculita en proporciones (3:1), durante el 03 y 16 de Julio y el 07 y 09 de Agosto de 2007 para *S. griseus* y *E. chiotilla* respectivamente. Las plántulas de colecta 2008 se transplantaron durante el 14 y 19 de Julio de 2008. Para evitar una excesiva evaporación, las charolas se cubrieron con bolsas de plástico y se colocaron en germinadora a 25 ± 2 °C; fotoperíodo 12/12 h. Se registró la supervivencia de las plántulas durante un período de cinco meses, a partir de la fecha de siembra y hasta el 03 de Diciembre de 2007 y el 31 de Diciembre de 2008.

5.2.- Metodología para cultivo *in vitro*

5.2.1.- Selección y colecta de explantes

La selección y colecta de explantes se realizó a partir de árboles que se encuentran en huertas de pitaya, tal es el caso de las ubicadas en el municipio de San Juan Joluxtla, Oaxaca (Tabla 3). Los árboles seleccionados fueron los visiblemente más sanos de acuerdo a las siguientes variables:

- Vigor.
- Producción y calidad de frutos (alta, mediana, escasa).
- Edad (aproximada).
- Diámetro del tallo.
- Amplitud de la copa.
- Número de ramas.

El 11 de Abril de 2008 se cortaron seis ramas jóvenes en árboles de *Escontria chiotilla*. Las ramas seleccionadas se colocaron en bolsas de papel y fueron llevadas al Laboratorio de Propagación Clonal del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Se registraron el peso, largo, ancho, número de costillas, número de areolas y coloración de las ramas (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros registrados a 6 ramas jóvenes de *E. chiotilla* colectadas en el matorral xerófilo de la Mixteca Baja, Oaxaca. VC (Verde claro).

Ramas	Peso (g)	Ancho (cm)	Largo (cm)	Costillas	Areolas	Coloración
1	58.8	4.5	7.0	8	6	V.C.
2	156.4	5.5	12.5	8	11	V.C.
3	63.8	5.5	5.0	7	7	V.C.
4	178.9	6.8	9.5	7	8	V.C.
5	27.1	4.5	3.7	7	3	V.C.
6	19.0	4.0	3.0	8	4	V.C.

5.2.2.- Desinfestación de explantes

5.2.2.1.- Semillas

Las semillas de *E. chiotilla* utilizadas fueron extraídas directamente de frutos colectados en la Mixteca Baja en Mayo de 2007 y 2008; lavadas con agua, secadas a temperatura ambiente y conservadas en bolsas de papel. Al momento de la cosecha se registró una capacidad de germinación mayor a 85%.

Antes de ser introducidas a una campana de flujo laminar, las semillas fueron lavadas con Extran MA al 2% (20 mL/L) durante 20 minutos, y enjuagadas con agua destilada. Se dispusieron en papel absorbente y una vez secas se colocaron en viales. Dos métodos de desinfestación fueron utilizados:

Primero:

- 1) Fueron sumergidas en solución de cloro (cloralex) al 20% durante diez minutos a concentraciones de 30 y 40% durante 20 y 30 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- 2) Después se colocaron en etanol al 70% durante cinco minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.
- 3) Posteriormente, se sumergieron en solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2.5-3.0%, durante un minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.
- 4) Finalmente se secaron con papel absorbente y se sembraron.

Las semillas desinfestadas fueron sembradas en frascos Gerber con 20 mL de agar al 1%, los frascos se colocaron en un cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C, fotoperíodo 16/8 h luz/oscuridad.

Segundo:

Las semillas se lavaron introduciéndolas durante 12 horas en soluciones de anti-fúngicos comerciales ANTRAK y MANZANTE 1 mg/L y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

En una campana de flujo laminar, las semillas se desinfestaron sumergiéndolas en solución de cloro comercial (Cloralex 6% [Allen]), al 30% durante 20 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

5.2.2.2.- Aislamiento y desinfestación de areolas

Las ramas en donde se encuentran las areolas se lavaron con Extran MA al 20% (200 mL/L) durante diez minutos, empleando un cepillo de cerdas suaves se retiró todo el polvo adherido a las areolas y se enjuagaron a chorro directo con agua corriente por cinco minutos.

Posteriormente las ramas se introdujeron en una solución de anti-fúngicos comerciales ANTRAK (Metil-butilcarbamoil-benzimidazol-2-il-carbamato) marca Dupont y MANZANTE (Etilen-bisditicarbamato de manganeso) marca Dupont 1 mg/L durante 60 minutos, se enjuagaron tres veces y se colocaron en frascos esterilizados.

En una campana de flujo laminar se cortaron segmentos de 1 a 2 cm² aislando las areolas que fueron desinfestadas nuevamente mediante el siguiente protocolo:

- 1) Se introdujeron en una solución de cloro al 2, 5 y 8% durante 5, 10 y 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- 2) Después se lavaron con etanol al 70% durante cinco minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.

3) Se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron.

Las areolas fueron sembradas en frascos Gerber con 20 mL de medio Murashige and Skoog modificado (MSB) sin reguladores de crecimiento. La contaminación se evaluó durante diez días observando la aparición de bacterias u hongos en el medio de cultivo.

5.2.2.3.- Plántulas

En este estudio también se utilizaron como explantes plántulas de 4 a 5 meses de edad obtenidas de semillas germinadas a 30 °C en cajas de Petri con agar al 1%, las cuales después de 21 días fueron transplantadas a charolas de plástico conteniendo una mezcla de sustratos (tepojal, vermiculita y agrolita en proporciones (1:1:1) por cinco meses. El 03 de Septiembre de 2008 las plántulas fueron llevadas al laboratorio de Propagación Clonal del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Antes de introducir las plántulas a una campana de flujo laminar, se lavaron con Extran MA al 2% (20 mL/L) durante diez minutos. Se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y posteriormente se sumergieron en una solución de antifúngicos durante 30 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua y se colocaron en frascos esterilizados.

En una campana de flujo laminar las plántulas se desinfestaron empleando el mismo protocolo usado con las areolas. Las plántulas fueron sembradas en frascos Gerber con 20 mL de medio (MSB) sin reguladores de crecimiento. La contaminación se evaluó durante diez días.

Para controlar la contaminación en el medio de cultivo, se utilizaron dos microbicidas: Proclin 300 (5-cloro-2 metil-1,2-thiazol-3,1) Marca (SIGMA) al 0.2% (200 µL/L) incluido en el medio que fue esterilizado a 120 °C durante 15 minutos en autoclave, y Plant Preservative Mixture (PPM) (5-Cloro-2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,1350 % + 2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,0412 % + ingredientes inertes 99,8238 %) al 0.8% (800 µL/L). La contaminación se evaluó durante diez días después de sembrados los explantes.

5.2.3.- Siembra de areolas

Medio semisólido: los explantes se sembraron en frascos Gerber con 20 mL de medio (MSB) suplementado con 30 g/L de azúcar refinada, 1 mg/L de N⁶-bencilaminopurina (6-BAP) y 0.025 mg/L de ácido diclorofenoacético (2,4-D). Como gelificante se utilizó una mezcla de agar bacteriológico y GelRite, a una concentración de 1.75 g/L para cada uno. El pH del medio fue ajustado a 5.75 con HCl o KOH 1 M. Los explantes se incubaron a 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad.

Para controlar el oscurecimiento del tejido en los explantes, se añadió al medio de cultivo carbón activado y ácido ascórbico en diferentes concentraciones (Tabla 6). Dieciséis tratamientos fueron evaluados. Se sembró un explante por cada tratamiento y el oscurecimiento del tejido fue evaluado durante ocho días después de sembrados.

Tabla 6. Arreglo de 16 tratamientos con diferentes concentraciones de carbón activado y ácido ascórbico para controlar el oscurecimiento en explantes de *E. chiotilla*.

	0	0.1	0.5	1.0	Ácido Ascórbico [mg/L]
0	T1	T5	T9	T13	
1	T2	T6	T10	T14	
2	T3	T7	T11	T15	
3	T4	T8	T12	T16	
Carbón Activado [g/L]					

5.2.4.- Germinación *in vitro* de semillas de *E. chiotilla*

Las semillas se lavaron introduciéndolas durante 12 horas en soluciones de anti-fúngicos comerciales ANTRAK y MANZANTE 1 mg/L y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

En una campana de flujo laminar, las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en solución de cloro comercial (Cloralex 6% [Allen]), al 30% durante 20 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron en cajas Magenta¹ con 40 mL de medio de cultivo MS adicionado con 30 g/L de sacarosa. Como agente gelificante se añadió Phytigel 2 g/L. El medio fue suplementado con 6-BAP a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 mg/L. El pH del medio fue ajustado a 5.75 con HCl ó KOH 1 M.

Las cajas se colocaron en una cámara de incubación a 27 ± 2 °C, con humedad relativa del 40% y fotoperíodo 16 horas luz por 8 horas de oscuridad. La luz

¹ Cajas de plástico de 6X6X9 cm que se utilizan para cultivo de tejidos vegetales.

blanca fue proporcionada por lámparas tubulares fluorescentes de intensidad lumínica $70 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se registraron diariamente los porcentajes de germinación y la aparición de brotes.

5.2.5.- Multiplicación y enraizamiento

Para su multiplicación y posterior enraizamiento, los brotes obtenidos de la etapa previa fueron transplantados a cajas Magenta con 40 mL de medio de cultivo MS fresco. Se adicionaron 30 g/L de sacarosa y Phytigel 2 g/L. Además de 2 mg/L de 6-BAP. El pH se ajustó a 5.75 con HCl o KOH 1 M. Las cajas se incubaron como se describió anteriormente.

5.2.6.- Transplante a suelo

Para su aclimatación, las plántulas obtenidas *in vitro* fueron lavadas con agua destilada y transplantadas individualmente sobre tezontle¹ en charolas de plástico y se colocaron en el invernadero a $25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con riego una vez cada siete días.

¹ Sustrato de grava volcánica que se utiliza para sembrar plantas de ambientes semiáridos.

6.0.- RESULTADOS

6.1.- Germinación

6.1.1.- Caracterización de frutos

Los parámetros de calidad registrados en una muestra de 31 frutos tanto de “jiotilla” como de “pitaya” se muestran en la Tabla 7. Aunque el tamaño de los frutos de “pitaya” es mayor, el número de semillas por fruto es ligeramente menor en “jiotilla”, sin diferencias significativas. Las semillas de *E. chiotilla* miden en promedio 2 mm y las de *S. griseus* 3.5 mm.

Ni la prueba de cloruro de trifenil-tetrazolio ni la de flotación resultan convenientes para determinar la viabilidad debido al tamaño y peso de las semillas, por lo que la viabilidad se estimó por germinación y en algunos casos se revisó la integridad de los tejidos de las semillas. La producción de semillas está directamente relacionada con el reclutamiento de nuevos individuos en las formaciones vegetales.

Tabla 7. Caracterización de frutos de *E. chiotilla* y *S. griseus* colectados en una población silvestre y en una huerta del municipio de Santiago Chazumba, Oaxaca.

Colecta	Especie	Peso (g)		Tamaño (cm)		°Brix	No. de semillas
		Fruto	Pulpa	Largo	Ancho		
2007	<i>E. chiotilla</i>	17.5±3.7	11.1±3.6	3.37±0.4	3.1±0.3	10.7±1.7	1154±250
	<i>S. griseus</i>	230±66.8	179±51.6	8.2±1.1	6.8±0.7	8.7±1.4	1917±745
2008	<i>E. chiotilla</i>	14.4±3.4	10.1±3.7	3.1±0.2	2.7±0.3	9.4±1.6	995±152
	<i>S. griseus</i>	167.9±61.1	133±50.2	8.3±1.3	6.3±0.9	7.7±1.2	1540±340

6.1.2.- Efecto de la temperatura en la germinación en laboratorio, (temperaturas constantes 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C); Alternancia 30/10 °C; colectas 2007 y 2008.

A 10 °C las semillas de ambas especies y ambos años de colecta, no germinan. Los porcentajes de germinación de *E. chiotilla* (cosecha 2007) a temperaturas constantes de 15 a 35 °C, son mayores a 95% a los 21 días después de la siembra. La velocidad de germinación es mayor a 30 °C, y disminuye a 25, 20 y 35 °C y la más baja es a 15 °C (Tabla 8). Diez días después de la siembra, los porcentajes de germinación presentan diferencias ($P < 0.0002$) (Figura 2A). La temperatura óptima para las semillas de *E. chiotilla* es de 30 °C, alcanza 70% de germinación tres días después de la siembra (Figura 2A).

El comportamiento germinativo de las semillas de la cosecha 2008 respecto a 2007 solo muestra diferencias en el porcentaje de germinación a 15 °C que se reduce a 86%; la velocidad de germinación es variable (Tabla 8 y Figura 2C). Se confirmó que las semillas presentan fotoblástismo positivo.

Respecto a las semillas de la cosecha 2007 de *S. griseus*, a los 21 días después de la siembra se observaron porcentajes de germinación superiores a 95% a las temperaturas constantes de 15, 20, 25, 30 y 35 °C, como también ocurrió en el caso de *E. chiotilla* (Tabla 8 y Figura 2B).

La velocidad de germinación es mayor en el rango 25-30 °C y la más baja se registra a 15 °C (Tabla 8). Aunque a 15 °C, las semillas de *S. griseus* germinan más rápido que las de *E. chiotilla*. El rango de temperatura óptima para las semillas de *S. griseus* es 25-30 °C, alcanzando el 90% de germinación al segundo

y tercer día de la siembra (Figura 2B). Se confirmó que estas semillas también son fotoblásticas positivas.

Para explicar la no germinación de las semillas de *E. chiotilla* sembradas en campo, se probó la alternancia 30°C/10 h luz/10°C/14 h oscuridad. Las semillas de *E. chiotilla* de 2008 germinaron en 78% y las de 2007 en 87% (Tabla 8 y Figura 2E). Las semillas de *S. griseus* cosecha 2007 y 2008 germinaron en 72 y 71%, respectivamente. En alternancia, la velocidad de germinación se reduce para ambas especies a las temperaturas óptimas (Tabla 8 y Figuras 2E). A temperatura constante de 30 °C las semillas de *E. chiotilla* germinan en porcentajes superiores a 90% para los dos años de colecta. Las semillas de *S. griseus* tienen un comportamiento similar (Figura 2E).

Tablas

Tabla 8. Parámetros de germinación de semillas de *Escontria chiotilla* (E) y *Stenocereus griseus* (S) en función de la temperatura, después de sembradas 21 días, cosechas 2007 y 2008.

	TEMPERATURAS CONSTANTES FOTOPERÍODO 12/12 h								ALTERNANCIA FOTOPERÍODO 14/10 h					
	10°C		15°C		20°C		25°C		30°C		35°C		30/10°C	
Especies	E ¹	S ²	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
Capacidad de germinación 2007 (%)	0	0	95±1.4	97±1.8	97±1.6	100±0.7	95±0.6	100±0.3	96±1.6	100±0.3	96±1.4	95±2.4	87±1.5	72±4
Capacidad de germinación 2008 (%)	0	6	86±1.1	96±1.5	99±0.7	95±1.9	90±4.4	96±6.1	90±3.7	94±2.7	96±0.9	93±2.7	78±2	71±4.9
Velocidad 2007 (días)	0	0	13±0.2	8.3±0.6	5±0.2	5±0.3	5.3±0.7	3.2±0.2	3±0.1	2.4±0.1	6.7±0.7	5.3±0.7	13±0.3	15.6±1
Velocidad 2008 (días)	0	0	15.6±0.5	11±0.3	6.2±0.1	7±0.2	3.3±0.2	5.4±2	4.6±0.4	5.1±0.3	4±0.2	5.4±0.9	16.2±0.6	16.5±1.1

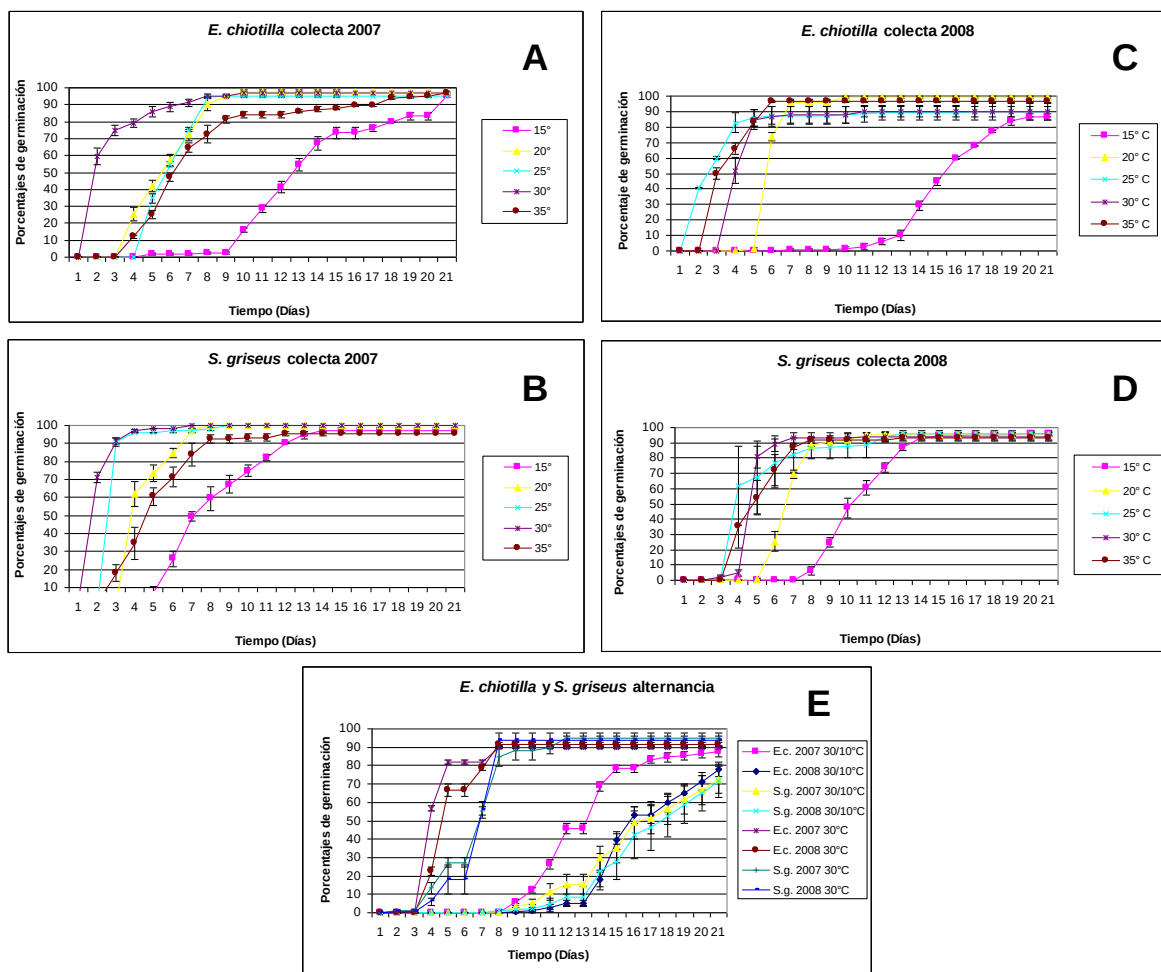


Figura 2. Capacidad y velocidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* (A y C) y *S. griseus* (B y D) en un gradiente de temperaturas constantes (10-35 °C), fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad colectas 2007 y 2008. (E) Alternancia de temperaturas 30/10 °C fotoperíodo 10/14 h luz/oscuridad colectas 2007 y 2008.

6.1.3.- Sobrevivencia y germinación de semillas en laboratorio y en banco de semillas en campo (6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses)

6.1.3.1.- Germinación a 30 °C de semillas almacenadas 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses en laboratorio colecta 2007

Al momento de la cosecha la capacidad germinativa de semillas de *E. chiotilla* fue 96%, después de almacenadas a 25 ± 2 °C durante 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses fue 90, 81, 96 y 97%, respectivamente (Tabla 9). No se registraron diferencias significativas en la capacidad de germinación después del almacenamiento en laboratorio (Figura 3A). Al momento de la cosecha se registró el valor más alto en velocidad de germinación, después del almacenamiento se redujo significativamente (Tabla 9).

Al momento de la cosecha, la capacidad germinativa de semillas de *S. griseus* fue 100%. Después de ser almacenadas durante 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses fue 96, 94, 100 y 97%, respectivamente (Tabla 9). No se registraron diferencias significativas en la capacidad de germinación después del almacenamiento en laboratorio. Al momento de la cosecha se registró el valor más alto en velocidad de germinación, después del almacenamiento se redujo significativamente (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de germinación en semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* sembradas a 30 °C fotoperíodo 12/12 h después del almacenamiento en condiciones de laboratorio a 25 ± 3 °C.

	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (MESES)									
	0		6.5		12.5		18.5		21	
Especie	E ¹	S ²	E	S	E	S	E	S	E	S
Capacidad de germinación (%)	96 ± 1.1	100	90 ± 1	96 ± 1.7	81 ± 3	94 ± 1	96 ± 1.7	100	97 ± 0.5	97 ± 1.5
Velocidad de germinación (Días)	3 ± 0.2	2.4 ± 0.1	7.2 ± 0.2	5.6 ± 0.8	6.8 ± 0.8	7.8 ± 0.7	6.3 ± 0.2	5.8 ± 0.3	5.2 ± 0.2	4.2 ± 0.3

*Escontria chiotilla*¹ *Stenocereus griseus*²

6.1.3.2.- Germinación de semillas enterradas y exhumadas 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses en banco de semillas colecta 2007

Para comprender la dinámica del banco de semillas se obtuvieron datos de germinación de semillas enterradas.

Antes de ser enterradas, la capacidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* fue 96%. Después de su permanencia en el banco durante 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses fue 92, 93, 90 y 78%, respectivamente (Tabla 10). Sólo se registraron diferencias significativas a los 21 meses ($P < 0.00001$) (Figura 3C). Antes de enterradas, la velocidad de germinación fue 3 días, a los 6.5, 12.5 y 18.5 meses fluctúa entre 5 y 6 días, pero a los 21 fue de 8 días. Las diferencias son significativas ($P < 0.00001$) (Tabla 10). En cuanto a la velocidad de germinación el

número de días se incrementa con respecto al tiempo de enterramiento en el banco.

Antes de enterradas, la capacidad de germinación en semillas de *S. griseus* fue 100%. Después de su permanencia en el banco durante 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses fue 96, 61, 72 y 89%, respectivamente (Tabla 10). Se registraron diferencias significativas a los 12.5 y 18.5 meses ($P < 0.002$) (Figura 3D).

Antes de enterradas, la velocidad de germinación en semillas de *S. griseus* fue 2.4 días, a los 6.5, 12.5 y 18.5 meses la velocidad de germinación fluctúa entre 5 y 7 días, pero a los 21 meses es de 3.8 días. Se registraron diferencias significativas a los 6.5, 12.5 y 18.5 meses ($P < 0.00004$) (Tabla 10).

Las variaciones en los parámetros de germinación respecto al tiempo de enterramiento, hacen suponer que se presenta latencia de semillas y que puede eliminarse a los 21 meses.

Tabla 10. Parámetros de germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* sembradas a 30 °C fotoperíodo 12/12 h. Las semillas permanecieron enterradas en la huerta de San Juan Joluxtle, en la Mixteca Baja Oaxaqueña.

		SEMILLAS COLECTA 2007 TIEMPO DE ENTERRAMIENTO (MESES)									
		0		6.5		12.5		18.5		21	
Especie		E ¹	S ²	E	S	E	S	E	S	E	S
Huerta Sitio 1 (Luz)	Capacidad de germinación (%)	96 ± 1.1	100	92 ± 1.7	96 ± 1	93 ± 1.1	61 ± 4	90 ± 0.5	72 ± 3.5	78 ± 2.1	89 ± 3.5
	Velocidad de germinación (días)	3 ± 0.1	2.4 ± 0.8	5.7 ± 0.6	5.3 ± 0.3	6.3 ± 0.3	7.5 ± 1	5.2 ± 0.2	5.2 ± 1	8.4 ± 0.6	3.8 ± 0.2

*Escontria chiotilla*¹ *Stenocereus griseus*²

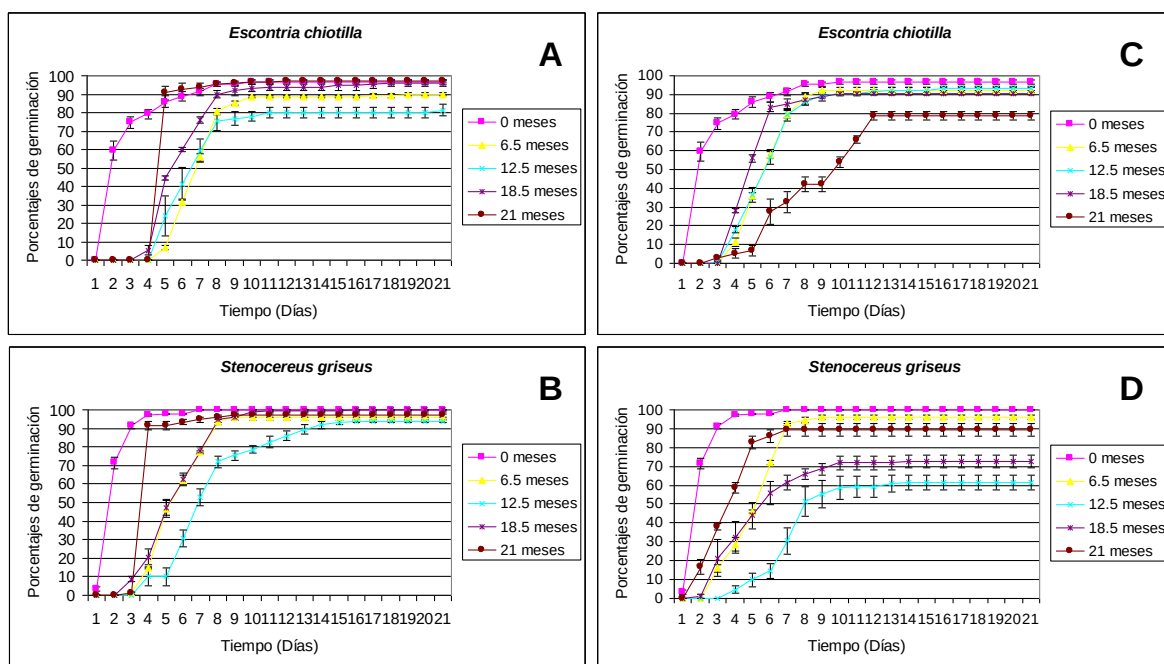


Figura 3. Capacidad y velocidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* colecta 2007, sembradas a 30 °C fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad después de ser almacenadas en laboratorio (A y B) y enterradas y exhumadas en huerta sitio 1 luz (C y D).

6.1.4.- Germinación de semillas enterradas y exhumadas en tres sitios distintos durante 6.5, 9, y 12.5 meses en banco, colectas 2007 y 2008

Para confirmar los resultados obtenidos en el primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco, se realizó un segundo experimento, en el cual las semillas en bolsas de malla plástica se colocaron en tres sitios adicionales quedando: el sitio (1) inicial en insolación directa y huerta, el sitio (2) en sombra y en huerta, el sitio (3) en insolación directa y matorral y el sitio (4) a la sombra en matorral. Después de 6.5, 9 y 12.5 meses, se desenterraron las semillas y se comparó la capacidad y velocidad de germinación de las dos especies. A diferencia del primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco, las semillas de la colecta 2007 fueron enterradas en el suelo después de haber sido almacenadas durante 12 meses en bolsas de papel a temperatura ambiente. Las semillas de la colecta 2008 se enterraron justo después de la cosecha.

6.1.4.1.- En matorral

Al momento de la cosecha la capacidad germinativa en semillas de *E. chiotilla* colecta 2007 fue 96% (Tabla 11). A insolación directa (sitio 3) después de 6.5, 9 y 12.5 meses los porcentajes de germinación fueron 96, 84 y 86. A la sombra (sitio 4) fueron 91, 92 y 88%, respectivamente (Tabla 11a) (Figura 4 A-C). Para la colecta 2008 el porcentaje de germinación al momento de la cosecha fue de 90% (Tabla 11a) En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, los porcentajes de germinación fueron 93, 88 y 96. En el sitio 4 fueron 67, 68 y 84% respectivamente (Tabla 11a) (Figura 4 A-C). Para este sitio y año de colecta, se registraron

reducciones significativas a los 6.5 y 9 meses ($P < 0.0004$) (Tabla 11a) (Figura 4 A-C).

Al momento de la cosecha, la velocidad de germinación en semillas de *E. chiotilla* de la colecta 2007 fue tres días (Tabla 11a). En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses la velocidad de germinación fue 4.3, 5.1 y 6.5 días. En el sitio 4 fue 4.8, 5.3 y 6.1 días, respectivamente (Tabla 11a) (Figura 4 A-C). Para la colecta 2008 la velocidad de germinación al momento de la cosecha fue 5.6 días. En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, la velocidad de germinación fue 6.7, 3.9 y 6.3 días. En el sitio 4 fue 5.4, 4.7 y 6 días, respectivamente (Tabla 11a) (Figura 4 A-C). Para la colecta 2007 el índice de velocidad registra un incremento significativo del número de días en ambos sitios ($P < 0.000001$). Para la colecta 2008 se registraron fluctuaciones sin diferencias significativas (Tabla 11a) (Figura 4 A-C).

Al momento de la cosecha la capacidad germinativa en semillas de *S. griseus* colecta 2007 fue 100% (Tabla 11b). En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses los porcentajes de germinación fueron 86, 91 y 83. En el sitio 4 fueron 84, 83 y 64%, respectivamente (Tabla 11b) (Figura 4 D-F). Para la colecta 2008 el porcentaje de germinación al momento de la cosecha fue 94 (Tabla 11b). En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, los porcentajes de germinación fueron 91, 89 y 87. En el sitio 4 fueron 84, 80 y 45% respectivamente (Tabla 11b) (Figura 4 D-F). Para el sitio 4 en ambos años de colecta, se registraron diferencias significativas a los 12.5 meses ($P < 0.000$) (Tabla 11b) (Figura 4 D-F).

Al momento de la cosecha la velocidad de germinación en semillas de *S. griseus* colecta 2007 fue 2.4 días (Tabla 11b). En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses la velocidad de germinación fue 4.7, 5.2 y 8.7 días. En el sitio 4 fue 4.6, 4.8

y 4.9 días, respectivamente (Tabla 11b). Para la colecta 2008 la velocidad de germinación al momento de la cosecha fue 5.2 días (Tabla 11b). En el sitio 3 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, la velocidad de germinación fue 4.6, 7 y 9.8 días. En el sitio 4 fue 5.3, 4.1 y 4.6 días, respectivamente (Tabla 11b) (Figura 4 D.F). Para la colecta 2007 el número de días se incrementó significativamente en ambos sitios (3 y 4) ($P<0.042$) (Tabla 11b). Para la colecta 2008, sitio 3 el índice de velocidad muestra un incremento significativo hasta los 12.5 meses ($P<0.000$), en el sitio 4 se registraron fluctuaciones sin diferencias significativas (Tabla 11b).

6.1.4.2.- En huerta

Al momento de la cosecha la capacidad germinativa en semillas de *E. chiotilla* colecta 2007 fue 96% (Tabla 11a). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses los porcentajes de germinación fueron 86, 85 y 82 (Tabla 11a) (Figura A-C). Para la colecta 2008 el porcentaje de germinación al momento de la cosecha fue 90 (Tabla 11a). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, los porcentajes de germinación fueron 81, 80 y 80 (Tabla 11a) (Figura 4 A-C).

Al momento de la cosecha la velocidad de germinación en semillas de *E. chiotilla* colecta 2007 fue tres días (Tabla 11a). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses la velocidad de germinación fue 4.6, 5.6 y 4.5 días (Tabla 11a). Para la colecta 2008 la velocidad de germinación al momento de la cosecha fue 5.6 días (Tabla 11a). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, la velocidad de germinación fue 4.6, 5.6 y 4.8 días (Tabla 11a). Para la colecta 2007 el número de días del índice de velocidad se incrementó significativamente ($P<0.037$). Para la colecta 2008 se registraron fluctuaciones sin diferencias significativas (Tabla 11a).

Al momento de la cosecha la capacidad germinativa en semillas de *S. griseus* colecta 2007 fue 100% (Tabla 11b). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses los porcentajes de germinación fueron 86, 82 y 76 (Tabla 11b) (Figura 4 D-F). Para la colecta 2008 el porcentaje de germinación al momento de la cosecha fue 94 (Tabla 11b). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, los porcentajes de germinación fueron 88, 86 y 95 (Tabla 11b) (Figura 4 D-F). Para la colecta 2007, se registró una disminución significativa a los 12.5 meses ($P<0.000$), para la colecta 2008 se registraron fluctuaciones, que no fueron significativas (Tabla 11b) (Figura 4 D-F).

Al momento de la cosecha la velocidad de germinación en semillas de *S. griseus* colecta 2007 fue 2.4 días (Tabla 11b). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses la velocidad de germinación fue 4, 5.5 y 4.1 días (Tabla 11b). Para la colecta 2008 la velocidad de germinación al momento de la cosecha fue 5.2 días (Tabla 11b). En el sitio 2 después de 6.5, 9 y 12.5 meses, la velocidad de germinación fue 4, 4.6 y 4 días (Tabla 11b) (Figura 4 D-F). Para la colecta 2007 el número de días del índice de velocidad se incrementó significativamente ($P<0.0001$). Para la colecta 2008 el índice de velocidad se redujó, pero no fue estadísticamente significativo (Tabla 11b).

Tabla 11a. Parámetros de germinación de semillas de *E. chiotilla* sembradas a 30 °C fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad después de ser enterradas en suelo de la Mixteca Baja. En rojo, valores con diferencias significativas.

Localidad	Condición	Colectas	Parámetros de Germinación	Tiempo de enterramiento (meses)			
				0	6.5	9	12.5
Huerta	Luz (sitio 1)	2007	Capacidad de germinación (%)	96	92		93
			Velocidad de germinación (días)	3±0.2	5.7±0.6		6.3±0.3
	Sombra (sitio 2)	2007	Capacidad de germinación (%)	96	86	85	82
			Velocidad de germinación (días)	3±0.2	4.6±0.2	5.6±1	4.5±0.2
		2008	Capacidad de germinación (%)	90	81	80	80
			Velocidad de germinación (días)	5.6±0.4	4.6±0.1	5.6±0.1	4.8±0.1
Matorral	Luz (sitio 3)	2007	Capacidad de germinación (%)	96	96	84	86
			Velocidad de germinación (días)	3±0.2	4.3±0.3	5.1±0.4	6.5±0.4
		2008	Capacidad de germinación (%)	90	93	88	96
			Velocidad de germinación (días)	5.6±0.4	6.7±0.2	3.9±0.1	6.3±0.3
	Sombra (sitio 4)	2007	Capacidad de germinación (%)	96	91	92	88
			Velocidad de germinación (días)	3±0.2	4.8±0.5	5.3±1	6.1±0.4
		2008	Capacidad de germinación (%)	90	67	68	84
			Velocidad de germinación (días)	5.6±0.4	5.4±0.3	4.7±0.4	6±0.3

Tabla 11b. Parámetros de germinación de semillas de *S. griseus* sembradas a 30°C fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad después de ser enterradas en suelo de la Mixteca Baja. En rojo, valores con diferencias significativas.

Localidad	Condición	Colectas	Parámetros de germinación	Tiempo de enterramiento (meses)			
				0	6.5	9	12.5
Huerta	Luz (sitio 1)	2007	Capacidad de germinación (%)	100	96		61
			Velocidad de germinación (días)	2.4±0.1	5.3±0.3		7.5±1
	Sombra (sitio 2)	2007	Capacidad de germinación (%)	100	86	82	76
			Velocidad de germinación (días)	2.4±0.1	4±0.5	5.5±0.2	4.1±0.1
		2008	Capacidad de germinación (%)	94	88	86	95
			Velocidad de germinación (días)	5.2±0.3	4±0.5	4.6±0.3	4±0.1
Matorral	Luz (sitio 3)	2007	Capacidad de germinación (%)	100	86	91	83
			Velocidad de germinación (días)	2.4±0.1	4.7±0.7	5.2±0.8	8.7±0.5
		2008	Capacidad de germinación (%)	94	91	89	87
			Velocidad de germinación (días)	5.2±0.3	4.6±0.4	7±0.5	9.8±0.7
	Sombra (sitio 4)	2007	Capacidad de germinación (%)	100	84	83	64
			Velocidad de germinación (días)	2.4±0.1	4.6±0.6	4.8±1	4.9±0.4
		2008	Capacidad de germinación (%)	94	84	80	45
			Velocidad de germinación (días)	5.2±0.3	5.3±2.4	4.1±0.2	4.6±0.1

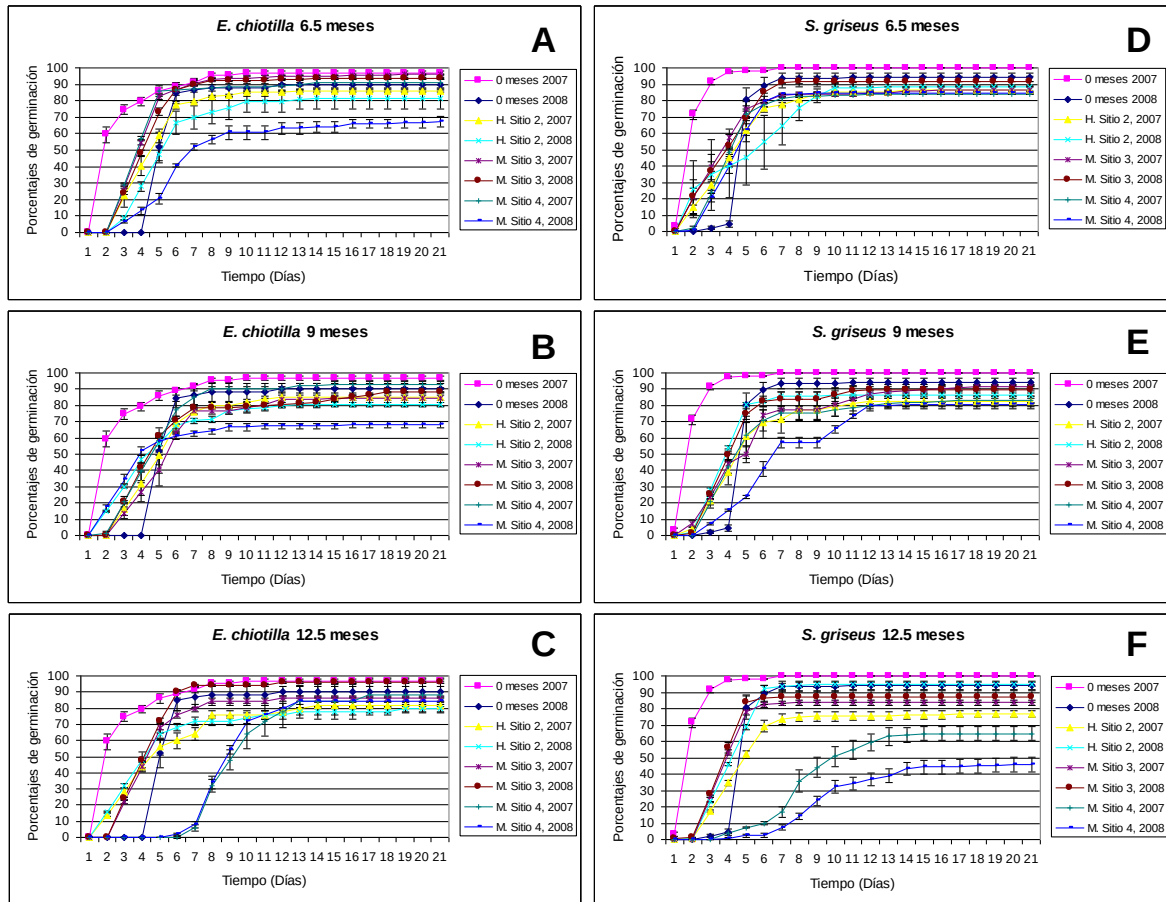


Figura 4. Capacidad y velocidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* (A-C) y *S. griseus* (D-F) sembradas a 30 °C fotoperíodo 12/12 h, después de permanecer enterradas en suelo huerta (H) y matorral (M) durante 6.5, 9 y 12.5 meses.

6.1.5.- Germinación de semillas en campo. Experimentos 1 y 2. Y transferidas al laboratorio a 30 °C

6.1.5.1.- Primer diseño experimental

Después de 21 días de permanecer en campo (del 20 de Junio al 09 de Julio de 2008), las semillas de *E. chiotilla* de colecta reciente (2008) y de un año de edad (2007) no germinaron en ninguna localidad (Tabla 12). Para saber si las semillas que no germinaron en campo perdieron la viabilidad, fueron transferidas al laboratorio después de tres semanas y colocadas a 25 °C fotoperiodo 12/12 h.

Se confirmó la viabilidad de las semillas, ya que germinaron en porcentajes superiores al 70% para ambos años de colecta (Tabla 12, Figura 5 A y B), excepto *S. griseus* que provenía del matorral en condiciones de sombra donde la colecta 2007 alcanza 29% y la 2008, 59% (Tabla 12, Figura 5 D). Sin embargo, se presentan diferencias significativas en la velocidad de germinación respecto a las semillas que no se colocaron en campo y fueron sembradas inmediatamente después de la cosecha *E. chiotilla* 2007 ($P < 0.005$) y *E. chiotilla* 2008 ($P < 0.0004$) (Tabla 12).

Las semillas de *S. griseus* de cosecha reciente (2008) germinaron a la sombra en 7% en matorral y 11% en huerta, mientras que germinaron en porcentajes menores a la luz, tanto en matorral como en huerta (Tabla 12 y Figura 5C). Las semillas de la cosecha 2007 colocadas a la sombra germinaron en 29% en matorral y 27% en huerta. En huerta a la luz sólo germinaron 7% (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros de germinación de semillas de *E. chiotilla*¹ y *S. griseus*² sembradas en cajas Petri colocadas en huerta y matorral y transferidas a los 21 días al laboratorio a 25 °C. Fotoperíodo 12/12 h. Luz/oscuridad. En rojo, valores con diferencias significativas.

	SITIOS								TRANSFERIDAS A LABORATORIO A 25 °C							
	HUERTA				MATORRAL				HUERTA				MATORRAL			
	S.1 Luz		S.2 Sombra		S.1 Luz		S.2 Sombra		S.1 Luz		S.2 Sombra		S.1 Luz		S.2 Sombra	
ESPECIE	E ¹	S ²	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
Capacidad de germinación 2007 (%)	0	7±1	0	27±5	0	0	0	29±11.8	92±3.3	92±3.9	79±3.5	62±5.2	85±3	94±2.8	70±4.9	29±11.8
Capacidad de germinación 2008 (%)	0	6±1.5	0	11±1.3	0	1±0.5	0	7±0.8	92±0.9	++++++	86±3.4	78±4.9	78±5.4	92±2.9	83±0.8	59±7.2
Velocidad 2007 (días)	0	12.5±3	0	11.7±2.6	0	0	0	10.3±4.5	4.7±0.2	5.8±0.6	5±0.8	3.8±2.2	6.4±1	4±0.3	7.8±0.6	10.3±4.5
Velocidad 2008 (días)	0	0	0	8.4±2.2	0	0	0	15±1	6±0.3	++++++	7±1	6.1±1.2	7.4±0.4	16.2±0.4	10.2±0.2	5.3±1.6

[++Semillas extraviadas en campo]

Para explicar la no germinación de las semillas de *E. chiotilla* sembradas en campo, se probó la alternancia 30°C/10 h luz/ 10°C/14 h oscuridad. Las semillas de *E. chiotilla* de 2008 germinaron en 78% y las de 2007 en 87% (Tabla 8 y Figura 2E). Las semillas de *S. griseus* cosecha 2007 y 2008 germinaron en 72 y 71% respectivamente. En alternancia, la velocidad de germinación se reduce para ambas especies con respecto a la temperatura óptima (Tabla 8). A temperatura constante de 30 °C las semillas de *E. chiotilla* germinan en porcentajes superiores a 90% para los dos años de colecta. Las semillas de *S. griseus* tienen un comportamiento similar (Figura 2E).

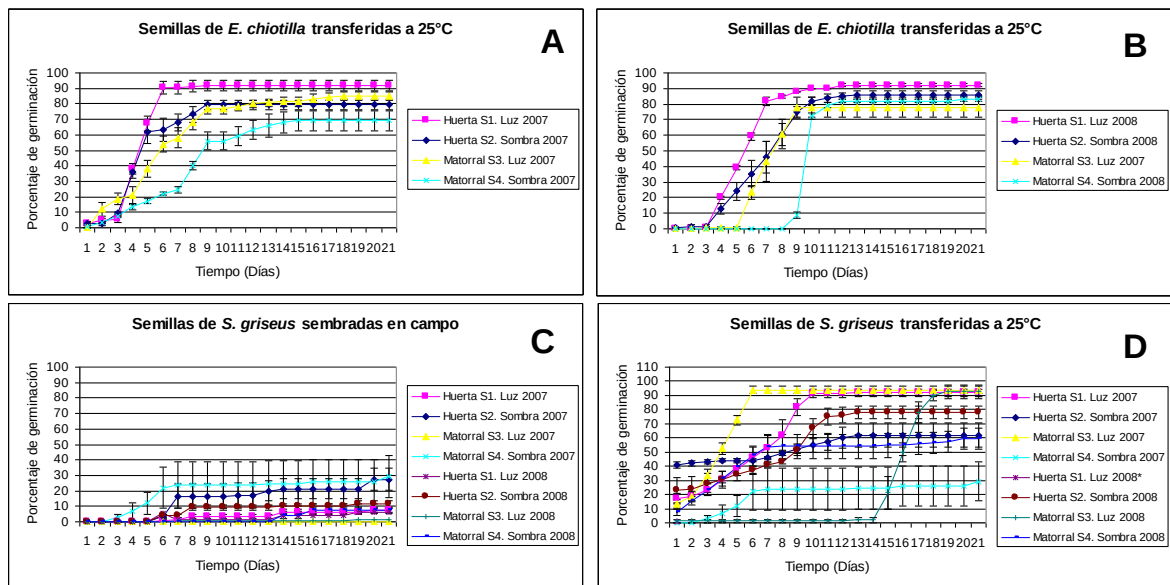


Figura 5. Capacidad y velocidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus*, colectas 2007 y 2008. (A y B) Semillas de *E. chiotilla* transferidas a 25 °C después de ser sembradas en campo. C) Semillas de *S. griseus* sembradas en 4 sitios en campo. D) Semillas de *S. griseus* transferidas a 25 °C después de ser sembradas en campo.

6.1.5.2.- Segundo diseño experimental

Después de seis semanas de permanecer en campo (del 16 de Mayo al 27 de Junio de 2009), las semillas de *E. chiotilla* de colecta reciente (2008), de un año de edad (2007) y después de nueve meses de enterradas en el banco (colectas 2007 y 2008), sembradas en contenedores con una mezcla de tepojal, vermiculita y agrolita, y las semillas sembradas en suelo de la localidad con agrolita y vermiculita, no germinaron en condiciones de insolación directa. A la sombra, las semillas (sembradas en tepojal, vermiculita y agrolita) de *E. chiotilla* de colecta reciente, de un año de edad y de nueve meses de enterradas en banco (colecta 2007), germinaron en 5.6, 9 y 10% respectivamente (Tabla 13, Figura 6 A). Las semillas sembradas en suelo, vermiculita y agrolita no germinaron a la sombra.

Las semillas de *S. griseus* de colecta reciente (2008), de un año de edad (2007) y después de nueve meses de enterradas en el banco (colectas 2007 y 2008), sembradas en contenedores con una mezcla de tepojal, vermiculita y agrolita, y las sembradas en suelo de la localidad con agrolita y vermiculita, no germinaron en insolación directa. A la sombra, las semillas (sembradas en tepojal, vermiculita y agrolita) de *S. griseus* de colecta reciente, de un año de edad y de nueve meses de enterradas en banco (colectas 2007 y 2008), germinaron en 30, 8.6, 22 y 10% respectivamente (Tabla 14, Figura 6 B). A la sombra, las semillas (sembradas en suelo, vermiculita y agrolita) de *S. griseus* de colecta reciente y de un año de edad, germinaron en 2.6 y 0.7% respectivamente. Las semillas de nueve meses de enterradas en banco (colectas 2007 y 2008) no germinaron.

Tabla 13. Parámetros de germinación de semillas de *E. chiotilla* sembradas en contenedores con tepojal, vermiculita y agrolita, colocadas seis semanas en dos condiciones (insolación directa y sombra) en campo.

Parámetros	Colectas				9 meses de enterradas			
	2007		2008		2007		2008	
	Luz	Sombra	Luz	Sombra	Luz	Sombra	Luz	Sombra
Capacidad de germinación (%)	0	9±2.6	0	5.6±1.4	0	10±3.8	0	0
Velocidad de germinación (Semanas)	0	1.8±0.9	0	2±0	0	2.5±0.7	0	0

Tabla 14. Parámetros de germinación de semillas de *S. griseus* sembradas en contenedores con tepojal, vermiculita y agrolita, colocadas seis semanas en dos condiciones (insolación directa y sombra) en campo.

Parámetros	Colectas				9 meses de enterradas			
	2007		2008		2007		2008	
	Luz	Sombra	Luz	Sombra	Luz	Sombra	Luz	Sombra
Capacidad de germinación (%)	0	8.6±3.7	0	30±6.9	0	22±1.4	0	10±1.6
Velocidad de germinación (Semanas)	0	0.9±0.5	0	1.4±0.3	0	1.9±0.1	0	1.5±0.7

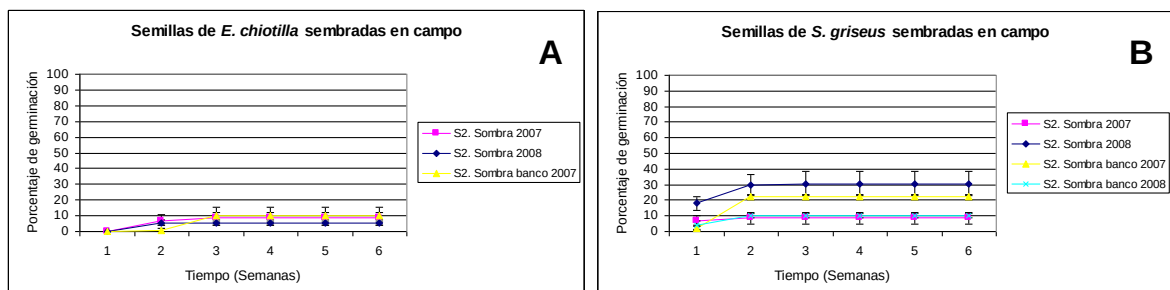


Figura 6. Capacidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* (A) y *S. griseus* (B) sembradas en contenedores con una mezcla de tepojal, vermiculita y agrolita, colocadas en campo sitio 2 sombra durante seis semanas.

6.1.6.- Supervivencia de plántulas obtenidas en gradiente de temperatura (15-35 °C) y transferidas a 25 °C (5 meses)

Para comparar y registrar la supervivencia de plántulas de ambas especies, después de 21 días, las plántulas obtenidas en el gradiente de temperaturas se transplantaron en charolas de plástico conteniendo una mezcla de tepojal y vermiculita en proporciones (3:1). Las charolas se colocaron en una germinadora a 25 ± 2 °C, fotoperíodo 12/12h luz/oscuridad. Se registró y comparó la supervivencia de plántulas por un período de cinco meses.

Para la colecta 2007, los porcentajes de supervivencia en plántulas de *E. chiotilla* germinadas a 35, 30, 25, 20 y 15 °C y transferidas a 25 ± 2 °C fueron 51, 33, 30, 61 y 75% respectivamente (Figura 7A). Para la colecta 2008, fueron 26, 78, 51, 92 y 98%, respectivamente (Figura 7B). En ambos años de colecta el porcentaje de supervivencia más elevado se obtiene en plántulas obtenidas de semillas germinadas a 15 °C.

Para la colecta 2007, los porcentajes de supervivencia en plántulas de *S. griseus* germinadas a 35, 30, 25, 20 y 15 °C y transferidas a 25 ± 2 °C fueron 95, 81, 70, 81 y 93% respectivamente (Figura 7C). Para la colecta 2008, fueron 70, 60, 58, 67 y 95%, respectivamente (Figura 7D). Para ambos años de colecta, el mayor porcentaje de supervivencia se obtiene en plántulas que fueron obtenidas de semillas germinadas a 15 °C, para la colecta 2008 a 35 °C también se registró un 95% de supervivencia (Figura 7D).

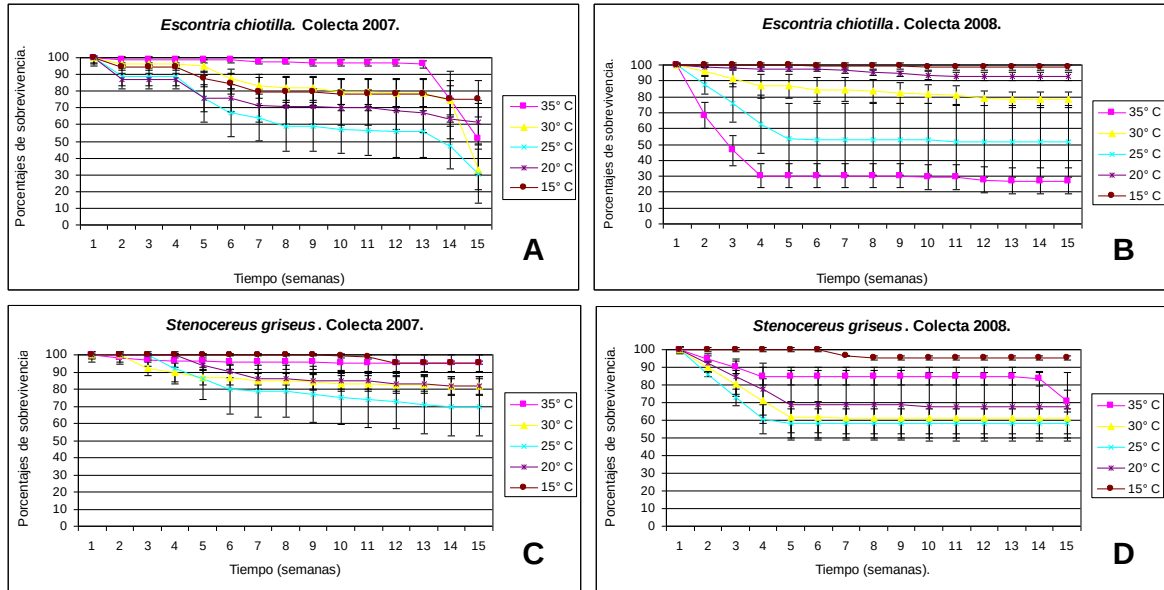


Figura 7. Supervivencia de plántulas de *E. chiotilla* (A y B) y *S. griseus* (C y D) a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ fotoperíodo 12/12h luz /oscuridad por cinco meses en laboratorio.

6.2.- Resultados cultivo *in vitro*

6.2.1.- Desinfestación de explantes

La primera etapa para establecer un método de micropropagación de una especie vegetal es obtener explantes en condiciones asépticas. La contaminación con hongos, bacterias y levaduras causa grandes pérdidas en la micropropagación comercial de especies vegetales y en los trabajos de investigación. Por lo que su control es fundamental para aumentar la eficiencia de la micropropagación. Los resultados de las pruebas de desinfestación de los explantes se describen a continuación.

6.2.1.1.- Areolas

Diez días después de sembradas las areolas en los tratamientos con 2, 5 y 8% de cloro, con un tiempo de inmersión de 15 minutos y etanol al 70% durante cinco minutos, no se observó contaminación. Sin embargo, horas después de sembradas, el tejido de las areolas de *E. chiotilla* se oscurece, debido a la liberación de compuestos fenólicos que matan al explante. Además resulta difícil observar la presencia de bacterias en el medio de cultivo por el cambio de color (Figura 8).

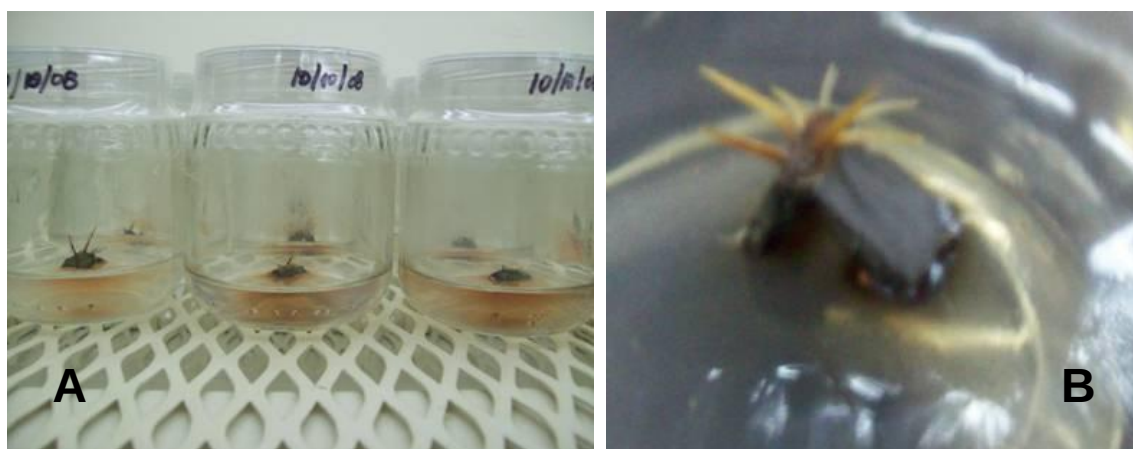


Figura 8. Areolas de *E. chiotilla* sembradas en medio de cultivo (MSB) sin reguladores de crecimiento. A) 15 minutos después de sembradas. B) 30 minutos después.

6.2.1.2.- Plántulas

A pesar de los diferentes tratamientos de desinfestación utilizados, después del quinto día de sembradas, las plántulas se contaminaron con bacterias y hongos (Figura 9).

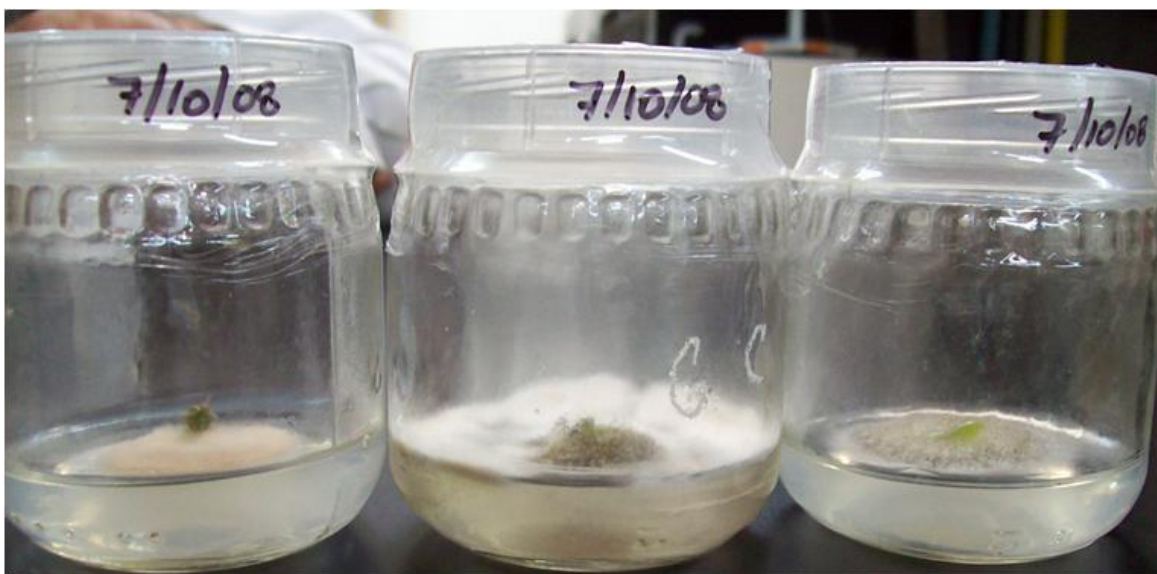


Figura 9. Plántulas de *E. chiotilla* después de cinco días de sembradas en medio (MSB) a 25 °C. La formación de colonias de bacterias y hongos son los principales agentes contaminantes.

6.2.1.3.- Agentes antimicrobianos

Las concentraciones de cloro y etanol utilizadas no resultaron eficientes para desinfestar las plántulas de *E. chiotilla* de cinco meses de edad, por lo que se utilizaron dos microbicidas: Proclin 300 y PPM en diferentes concentraciones. Ambos compuestos fueron utilizados tanto en semillas como en plántulas. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

Quince días después de sembradas las semillas, no se observó contaminación en ninguno de los los diferentes tratamientos. Sin embargo, los porcentajes de germinación disminuyen con el compuesto (Proclin 300 al 0.2%), y se observó poco desarrollo de las raíces en las plántulas que lograron establecerse (Figura 10).

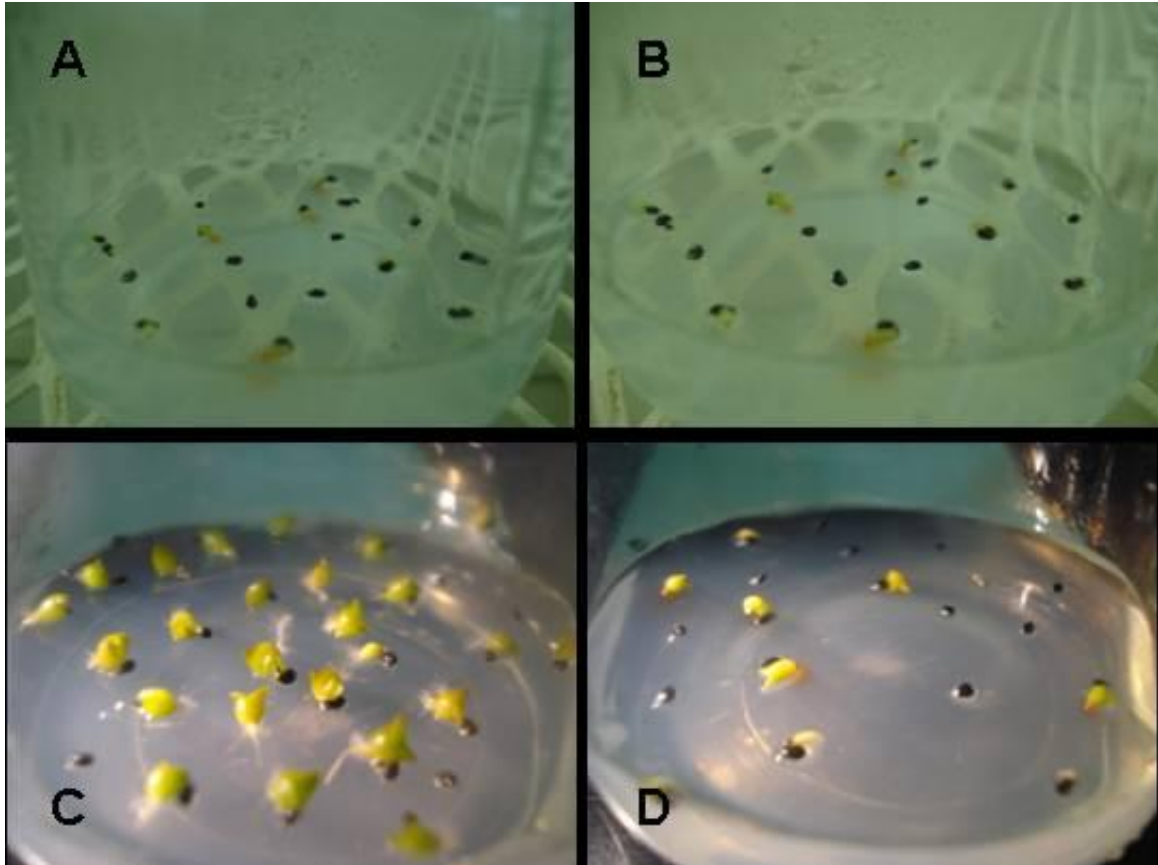


Figura 10. Semillas de *E. chiotilla* sembradas en un medio (MSB) con Proclin 300 al 0.2%. (A, B y D). Tres días después de sembradas. (C) Tratamiento sin Proclin 300.

El uso del Proclin 300 afectó tanto la capacidad de germinación como el desarrollo de raíces de las plántulas, por lo que se descartó su uso.

Debido a que los tratamientos de desinfestación aplicados a plántulas de tres meses de edad no resultaron favorables, se probaron dos tratamientos con: cloro al 8% durante 30 y 40 minutos, seguido de etanol al 90% durante diez minutos. Se sembraron tres plántulas con dos repeticiones en medio (MSB) suplementado con Proclin 300 al 0.2% (200 $\mu\text{L/L}$) y PPM al 0.8% (800 $\mu\text{L/L}$), evaluándose la contaminación durante diez días.

Ambos tratamientos fueron efectivos en el control de la contaminación, sin embargo, las plántulas se necrosaron y después de quince días la mayoría murió en ambos tratamientos (Figura 11).

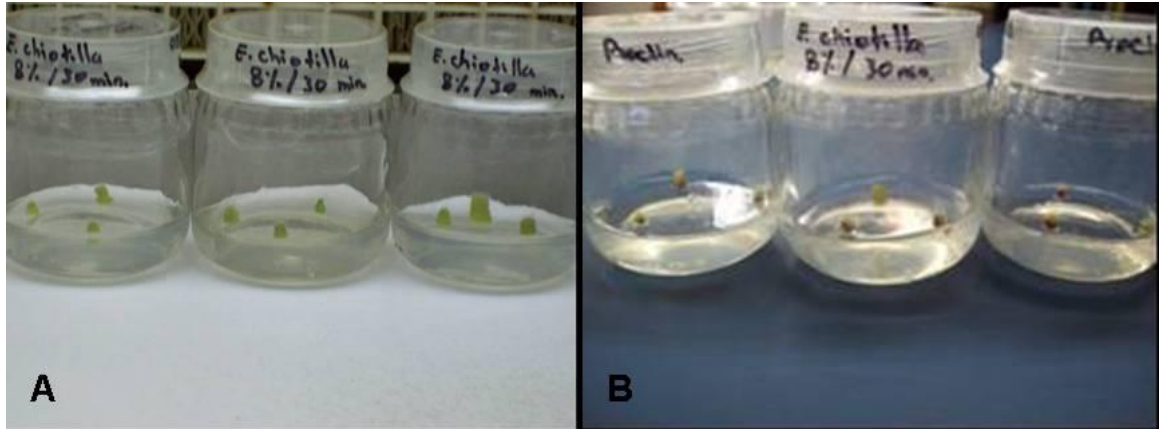


Figura 11. Plántulas de *E. chiotilla* de tres meses de edad sembradas en medio (MSB) suplementado con Proclin 300 al 0.2%. (A) Plántulas al momento de la siembra. (B) Plántulas 10 días después de sembradas.

Los resultados revelaron que la concentración de Proclin 300 que se utilizó en este estudio, resultó perjudicial en el establecimiento de las plántulas.

La apariencia de las plántulas de *E. chiotilla* sembradas en los tratamientos con PPM es de marchitez, oxidadas y necrosadas (Figura 12). Después de quince días la mayoría murió. Los resultados mostraron que la concentración de PPM que se utilizó en este estudio resulta perjudicial para el establecimiento de las plántulas.



Figura 12. Plántulas de *E. chiotilla* de tres meses de edad sembradas en medio (MSB) suplementado con PPM al 0.8%.

6.2.1.4.- Siembra de explantes

Para controlar el oscurecimiento de las areolas de *E. chiotilla* se utilizaron dos agentes antioxidantes, carbón activado en combinación con ácido ascórbico a diferentes concentraciones.

En los 16 tratamientos, el tejido de las areolas se oscurece tres días después de sembradas (Figura 13).

Las concentraciones de antioxidantes utilizados en este estudio, no controlaron el oscurecimiento del tejido en areolas de *E. chiotilla*. La muerte del tejido fue provocada por la liberación de fenoles, que resultan tóxicos para las células.

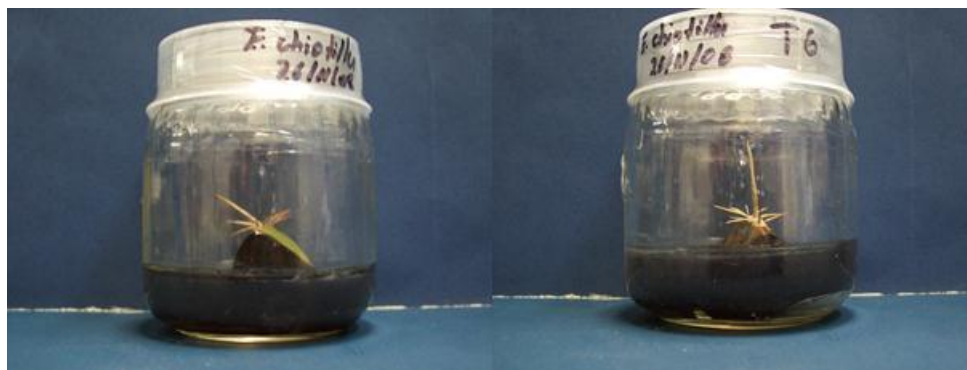


Figura 13. Areolas de *E. chiotilla* sembradas en medio (MSB) con carbón activado y ácido ascórbico Tres días después de sembradas, las areolas en todos los tratamientos evaluados se oscurecen.

6.2.2.- Germinación *in vitro* de semillas de *E. chiotilla*

Los resultados descritos mostraron que, dados los niveles de contaminación endofítica de los tejidos y su susceptibilidad a los tratamientos de desinfestación empleados, ni las areolas de plantas adultas ni las plántulas de cinco meses de edad, resultan adecuadas para la inducción de brotes vegetativos, por lo que, se decidió emplear plántulas germinadas *in vitro*.

Después de quince días, las semillas desinfestadas con cloro al 20, 30 y 40% con un tiempo de inmersión de diez minutos, seguido de cinco minutos de etanol al 70% y peroxido de hidrógeno durante un minuto no presentaron contaminación.

Se registraron porcentajes de germinación superiores al 80% (Figura 14).

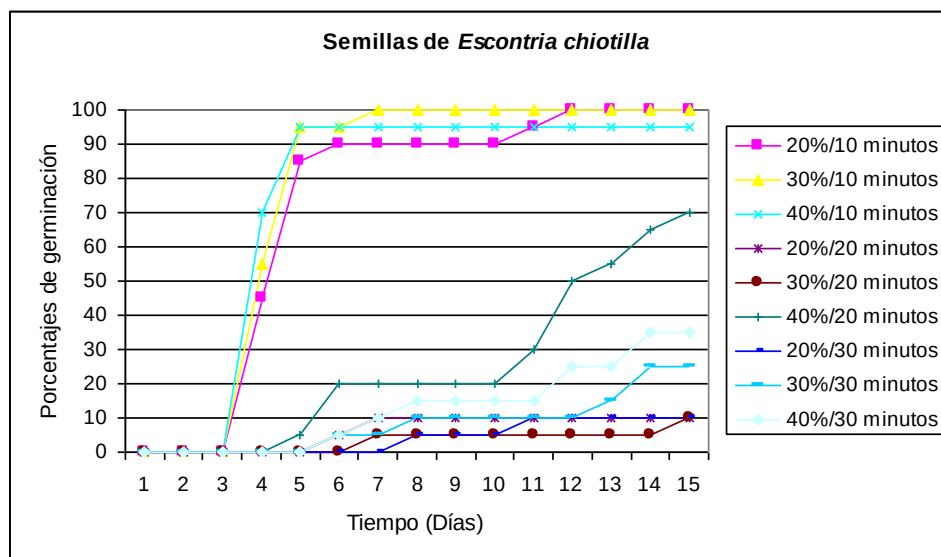


Figura 14. Capacidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* desinfestadas con cloro, etanol y peroxido de hidrógeno.

La combinación de cloro, etanol y peroxido de hidrógeno utilizadas en este estudio resultaron eficientes para desinfestar las semillas de *E. chiotilla*.

6.2.3.- Inducción de brotes a partir de areolas de plántulas germinadas *in vitro*

Las plántulas germinadas de semillas fueron tratadas con diferentes concentraciones de BAP. Después de 44 días, las plántulas obtenidas en los diferentes tratamientos con 6-BAP presentaron un desarrollo tanto aéreo como radicular diferente. En los tratamientos con 6-BAP, las plántulas de *E. chiotilla* desarrollaron yemas en la parte apical, las plántulas control desarrollaron las primeras areolas que darán origen a la columna de la planta adulta.

Las plántulas de *E. chiotilla* del tratamiento sin regulador de crecimiento, alcanzaron en la parte aérea una altura promedio de 0.6 cm. El sistema radicular consta de tres raíces laterales, con una longitud promedio de 0.5 cm en cada una. En la parte apical se desarrollaron las primeras areolas de la columna del cactus, y en la base hojas cotiledonarias (Figura 15A).

El sistema radicular de las plántulas control, fue más desarrollado comparado con las plántulas expuestas a las diferentes concentraciones de 6-BAP, donde sólo se desarrolló un eje radicular sin ramificaciones secundarias (Figura 15 B, C y D).

Aunque se observó daño en el tejido de las plántulas, probablemente producto de la fenolización del tejido, este no resultó perjudicial. El tamaño aéreo en promedio fue de 0.5 cm, independientemente del tratamiento con 6-BAP (Figura 15 B, C y D).



Figura 15. Plántulas de *E. chiotilla* de 44 días de edad obtenidas *in vitro* en un medio MS con diferentes concentraciones de 6-BAP. **A)** Sin regulador, **B)** 1 mg/L, **C)** 3 mg/L y **D)** 5 mg/L. Aunque el tamaño de la parte aérea es similar, el desarrollo radicular fue menor en los tratamientos con 6-BAP. En las plántulas con 6-BAP se inició la formación de yemas en la parte apical, a diferencia del tratamiento control donde se desarrollaron las areolas apicales que darán origen a la columna de la plántula. La barra presente en la figura A representa 0.5 cm.

En los tres tratamientos con 6-BAP, después de 4.5 meses, las plántulas de *E. chiotilla* desarrollaron brotes de color blanco, a partir de las areolas de la columna, el cual coincide con el tejido meristemático. Las plántulas obtenidas en los tratamientos con 6-BAP tienen en promedio de 2 a 3 mm y no desarrollaron espinas en las areolas de la columna (Figura 16 y 17 B, C y D).

Las plántulas control no desarrollaron brotes y continuaron con su crecimiento y desarrollo normal (Figura 17 A). El tamaño promedio de la parte aérea de las plántulas control fue de 1.3 cm. El sistema radicular fue ramificado, con al menos cinco raíces secundarias de 1 cm cada una. Las costillas de la columna del cactus aún no se desarrollan, sin embargo, se observaron de seis a siete areolas bien definidas y hojas cotiledonarias en la base de la columna (Figura 17 A). Las plántulas de los tratamientos con 1 y 3 mg/L de 6-BAP, desarrollaron un sistema radicular, aunque menos diferenciado que las plántulas control. Las plántulas

tratadas con 5 mg/L de 6-BAP sólo desarrollaron un eje radicular y no se observaron raíces secundarias (Figura 16 y 17).

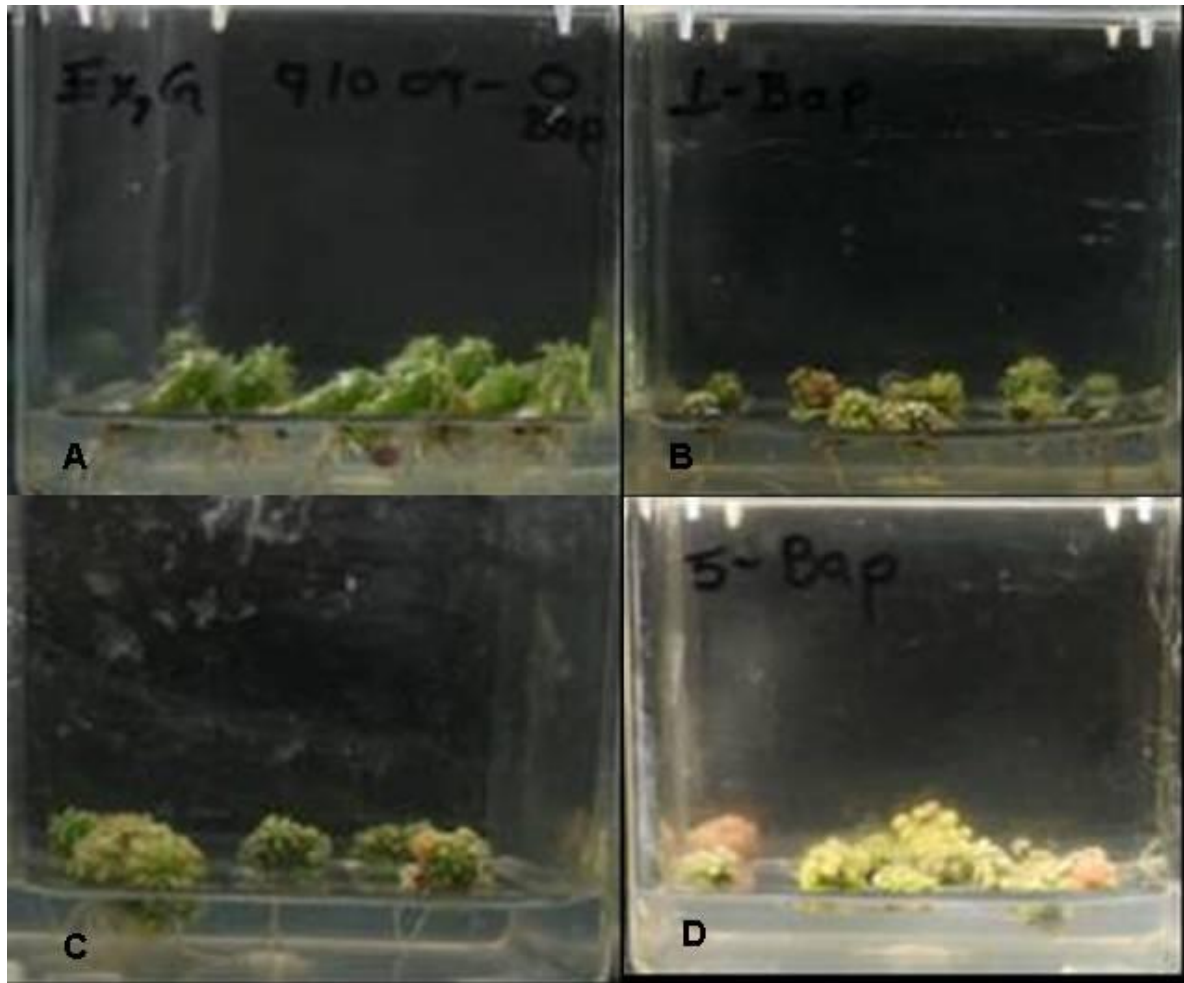


Figura 16. Panorama general de plántulas de *E. chiotilla* de 4.5 meses de edad obtenidas *in vitro* en un medio MS con diferentes concentraciones de 6-BAP. **A)** Sin regulador, **B)** 1 mg/L, **C)** 3 mg/L y **D)** 5mg/L. Las plántulas del tratamiento con 1 y 3 mg/L de 6-BAP desarrollaron sistema radicular.

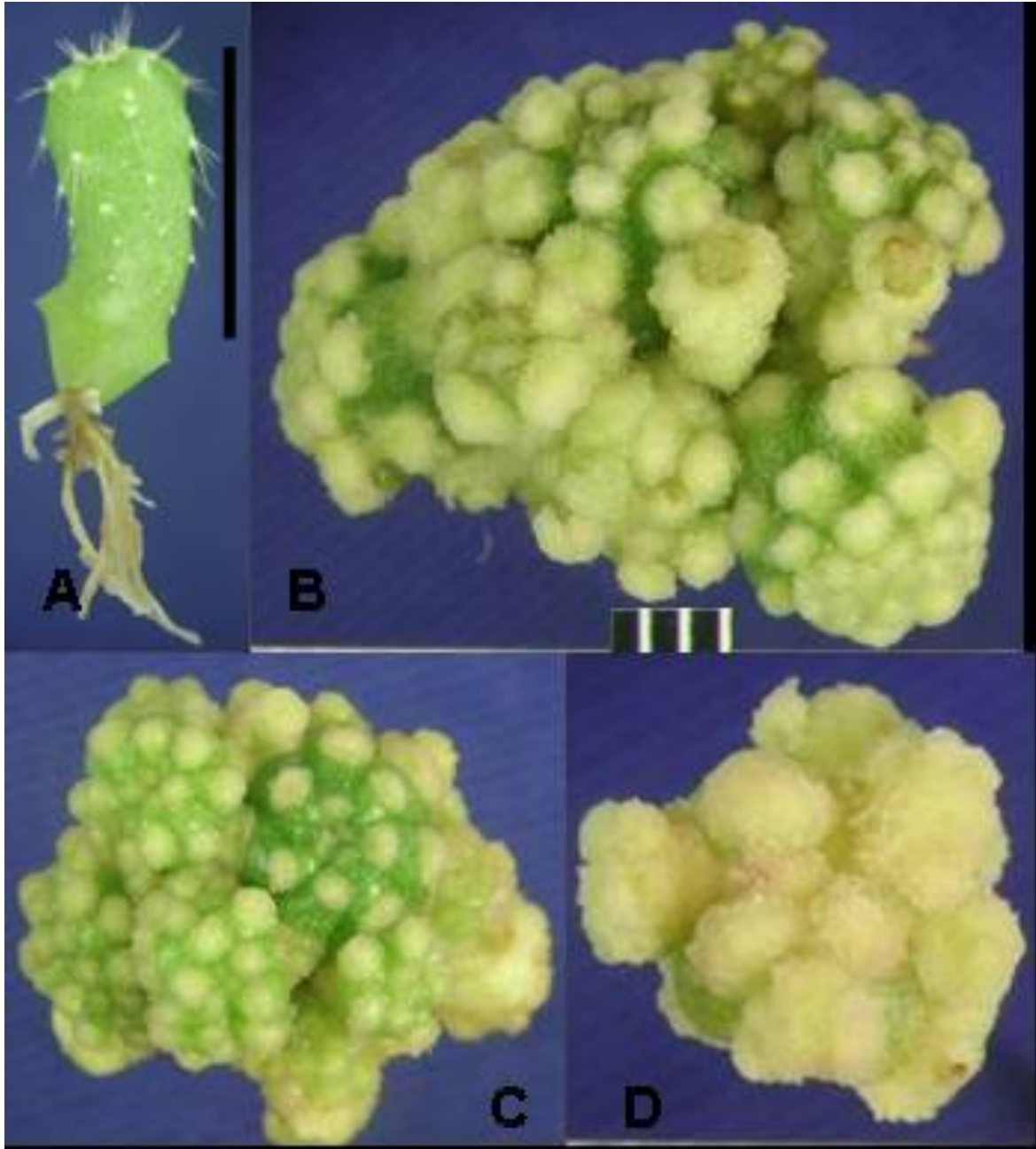


Figura 17. Inducción de brotes a partir de plántulas de *E. chiotilla* de 4.5 meses de edad, obtenidas *in vitro* con diferentes concentraciones de 6-BAP. **A)** Plántula de *E. chiotilla* sin regulador de crecimiento; **B, C y D)** Brotes obtenidos a 1, 3 y 5 mg/L de 6-BAP. El desarrollo de los brotes se inicia en el tejido meristématico de las areolas de la columna de la plántula.

6.2.4.- Multiplicación y enraizamiento

Por cada plántula de *E. chiotilla* sembrada *in vitro*, ocho meses después se obtuvieron en promedio 48 brotes, los cuales fueron individualizados y resembrados para su crecimiento. Los brotes desarrollaron de siete a ocho costillas, con cuatro a cinco areolas bien definidas, cada areola desarrolló espinas dispuestas en circunferencia. El color de las nuevas plántulas fue verde claro y el color de las areolas café claro, tal y como se observa en plantas adultas en su ambiente natural (Figura 18A y B).



Figura 18. Multiplicación y transplante de plántulas de *E. chiotilla* **A)** brotes de ocho meses de edad obtenidos a partir de una plántula germinada en medio MS suplementado con 2 mg/L de 6-BAP. **B)** brotes individualizados. **C)** brotes cultivados en medio MS para su enraizamiento. **D)** las plántulas de 5 cm de altura pueden ser multiplicadas otras vez ó transplantadas a tierra.

7.0.- DISCUSIÓN

7.1.- Germinación y banco de semillas

7.1.1.- Gradiente de temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C), germinación en campo y alternancia de temperatura 30/10 °C

El número de semillas por fruto fue semejante en *E. chiotilla* y *S. griseus* (Tabla 7), pero el tamaño de las semillas fue menor en la primera de ellas. La estructura de las testas presentó diferencias, siendo más gruesas en *E. chiotilla*.

La germinación en función a la temperatura coincide con la de la mayoría de las cactáceas reportadas, así como con el de plantas desérticas en general (Guterman, 1993; Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 2004; Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007; Mayor *et al.*, 2007).

A 10 °C, las semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* no germinan, o lo hacen escasamente, como también ocurre en *Trichocereus terscheckii* (Ortega-Baes y Rojas-Aréchiga, 2007), *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus flavovirens*, *Ferocactus robustus* y *Ferocactus* (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998), que son también cactáceas columnares. Otras cactáceas, como *Cephalocereus chrysacanthus*, *Neobuxbaumia tetetzo* y *Pachycereus hollianus*, germinan a 10 °C en porcentajes de 40, 25, y 20% respectivamente, y se encuentran en el Valle de Tehucán-Cuicatlán asociadas a las especies estudiadas en el presente trabajo.

Sólo se observaron ligeras diferencias en la velocidad en función de la temperatura, siendo superior en *S. griseus* (Tabla 8). Resultados similares se obtuvieron comparando poblaciones de cactáceas columnares silvestres y domesticadas en *Polaskia chichipe*, *Mirtilocactus eschenkii* y *Polaskia chende* (Guillen *et al.*, 2009).

Guillén *et al.* (2009) han descrito que la selección artificial (domesticación) en plantas determina cambios en las frecuencias genotípicas y fenotípicas de las poblaciones, comparadas con las poblaciones silvestres, y que estos cambios se reflejan en la pérdida de la latencia, germinación más rápida y sincronización, entre otros aspectos fisiológicos (Hawkes, 1983; Evans, 1993; Fray y Doganlar, 2003 Guillén *et al.*, 2009). En particular en cactáceas.

Rojas-Aréchiga *et al.* (2001), en semillas de *Stenocereus stellatus*, y Otero-Arnaiz *et al.* (2003), en semillas de *Polaskia chichipe*, reportan que las semillas de poblaciones cultivadas tienen más altos porcentajes de germinación, además de que germinan más rápido, comparándolas con semillas de poblaciones silvestres. Los experimentos de germinación en campo mostraron porcentajes de 29% en el caso de *S. griseus* a la sombra y 0% en el caso de *E. chiotilla*. En la mayoría de los trabajos de cactáceas en campo, se reportan porcentajes bajos de germinación, que frecuentemente se explican por la escasa disponibilidad de agua en el suelo (Valverde *et al.*, 2004; Mayor *et al.*, 2007; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009); tal es el caso de las semillas de *Mammillaria magnimamma* (Valverde *et al.*, 2004).

En semillas de *Piptochaetium napostaense*, las altas temperaturas son además señaladas como causantes de los bajos porcentajes obtenidos en campo (Mayor *et al.*, 2007).

El diseño de nuestros experimentos garantizó la disponibilidad de agua para la germinación de las semillas que fueron sembradas en agar y en macetas con suelo de la localidad que fueron regadas periódicamente, por lo que la baja germinación obtenida en campo en este caso no puede atribuirse a falta de agua.

Aunque los experimentos se realizaron en la época de lluvias, la baja germinación podría atribuirse al régimen de temperaturas extremas al que las semillas fueron sometidas en condiciones naturales.

Los resultados muestran que las semillas de las especies estudiadas mantuvieron la viabilidad y germinaron en elevados porcentajes una vez colocadas a temperaturas favorables. En semillas de *Piptochaetium napostaense* la viabilidad reportada se mantuvo a pesar de las altas temperaturas registradas en el suelo.

En dicho trabajo, la ausencia de germinación se interpretó como una adaptación que reduce la germinación a temperaturas altas o con amplias fluctuaciones diurnas para impedir la mortalidad de las plántulas (Mayor *et al.*, 2007). Esta consideración podría ser válida para las especies estudiadas en el presente trabajo.

Las temperaturas promedio registradas en la Región de este estudio son de 33.1 °C, máxima y 14.3 °C, mínima, pero en el mes de junio, en el período de experimentación, la superficie del suelo del matorral registramos temperaturas de 35 °C, a la sombra y 45 °C, al sol entre las 12 y las 15 h. La temperatura tiende a ser más alta en el suelo que en el aire, y tiene fluctuaciones mayores (Mayor *et al.*, 2007). Por ello se determinó el porcentaje de germinación en un régimen de alternancia 10/30 °C y se confirmó que esta alternancia redujo la capacidad y velocidad de germinación; el porcentaje de germinación disminuyó en 10% respecto al obtenido a temperatura óptima de 30 °C en *E. chiotilla* y en 30% en *S. griseus*.

Hay menos estudios realizados en alternancia, pero se reporta que en *Stenocereus stellatus* el régimen de 20/35 °C reduce la germinación en 20%

respecto a la obtenida a la temperatura optima de 25 °C (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001), *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus flavovirens*, *Ferocactus robustus* y *Ferocactus recurvus* no germinan a 10 °C. En alternancia 10/25 °C, el porcentaje de germinación se redujo en 32% en las dos primeras y 50% en las últimas en relación al obtenido a temperatura optima (25-30 °C) (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998). En zonas áridas, la sombra es indispensable para lograr la germinación de semillas de algunas especies (Valverde *et al.*, 2004; Mayor *et al.*, 2007; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009b), como observamos en el caso de *S. griseus* mientras que *E. chiotilla* en nuestro experimento no germino ni a la sombra ni a la luz.

7.1.2.- Almacenamiento en laboratorio

A 30 °C, la capacidad de germinación de semillas de ambas especies después de 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses de almacenamiento en laboratorio fue superior a 80% (Tabla 9). Los resultados revelan que el tiempo de almacenamiento en laboratorio evaluado durante este experimento no redujo ni la viabilidad, ni la capacidad germinativa de las semillas en ambas especies que fueron equivalentes a los obtenidos al momento de la cosecha (Figuras 3 A y B).

Resultados similares fueron reportados para semillas de *Opuntia tomentosa* almacenadas en laboratorio a 23 ± 25 °C, a pesar de que el tiempo de almacenamiento sólo fue de ocho meses después de cosechadas (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009b).

Por otra parte Olvera-Carrillo *et al.* (2009a) reportaron que las semillas de *O. tomentosa* presentan bajos porcentajes de germinación después cinco años de almacenamiento en laboratorio. La reducción en la capacidad germinativa se

atribuyó según los autores a la presencia de latencia adquirida, inducida por la temperatura y humedad durante el almacenamiento, por lo que sugieren que estas especies cuentan con un banco de semillas en el suelo.

Montiel y Montaña (2003) señalaron que la latencia en semillas es el principal factor que constituye y mantiene al banco de semillas del matorral. En el caso de las semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* no se registra latencia durante los 21 meses de almacenamiento en laboratorio: por lo que las semillas germinan cuando son colocadas en condiciones de temperatura, luz y humedad favorables. En términos de velocidad de germinación, ambas especies registraron la velocidad más elevada al momento de la cosecha, con respecto a las obtenidas a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses (Tabla 9). En número de días de germinación se incremento significativamente en semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* después de almacenadas durante 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses en laboratorio.

7.1.3.- Semillas enterradas en campo colecta 2007

Antes de enterradas, la capacidad germinativa de las semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* es superior al 96%. En *E. chiotilla* después de 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses de enterradas en el banco, la capacidad germinativa fue: 92, 93, 90 y 78% respectivamente. (Tabla 10, Figura 3C y D). En estudios posteriores a los 24 meses se obtuvo 56% y a los tres años se reduce hasta 8%. Datos no incluidos. Debido a que las semillas que no germinan se observan intactas, aducimos la baja germinación a la entrada en latencia. Se proponen estudios anatómicos de embrión en las semillas que no germinan para discriminar el porcentaje de semillas muertas.

En el caso de semillas de *S. griseus*, la capacidad germinativa a los 6.5, 12.5, 18.5 y 21 meses se registran porcentajes de 96, 61, 72, y 89 respectivamente, sólo se registran diferencias significativas a los 6.5 meses. Tanto la reducción como los incrementos en los porcentajes de germinación en semillas de *S. griseus* durante el periodo de enterramiento podrían asociarse a periodos de latencia de semillas.

Baskin y Baskin (2004) reportaron que la presencia de latencia fisiológica o impuesta es común entre las especies de cactáceas, lo cual sugiere que estas especies forman un banco de semillas en el suelo (Nikolaeva, 1969; Koller, 1972; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009a).

Resultados similares se obtuvieron en semillas de *O. tomentosa*, en la que también se observa una variación en los porcentajes de germinación con respecto al tiempo de almacenamiento, que van desde 30% a los ocho meses hasta superiores al 80% a los 18 meses de almacenadas (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009a). Sin embargo, a diferencia de nuestro experimento de 21 meses, las semillas de *O. tomentosa* sólo permanecieron enterradas en el suelo durante un período de ocho meses, y después de exhumadas fueron almacenadas en laboratorio a 25 ± 3 °C durante diez meses.

Las semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* que no fueron enterradas en suelo y que permanecieron almacenadas en laboratorio durante el mismo período (21 meses), presentan porcentajes de germinación superiores al 80% durante todo el período evaluado (Tabla 9). Estos resultados sugieren que durante el periodo de enterramiento se indujo latencia en las semillas, que puede atribuirse a factores ambientales como las fluctuaciones en la temperatura y humedad que las semillas

experimentaron en el suelo. Las diferencias en los porcentajes de germinación de las semillas exhumadas con respecto a las que no fueron enterradas y permanecieron almacenadas en laboratorio durante el mismo período apoyan esta idea.

Baskin y Baskin (2000) reportaron que las fluctuaciones de la temperatura y la humedad en el suelo pueden inducir latencia en las semillas (Vegis, 1964; Forcella *et al.*, 2000; Mayor *et al.*, 2007), además de la acción de microorganismos que afectan la disponibilidad de O₂, nitratos y pueden deteriorar la testa (Bradford y Nonogaky, 2007).

La latencia en semillas puede ser interpretada como un mecanismo que permite la dispersión de la germinación en el tiempo, y está asociada a las condiciones ambientales que son más favorables para el establecimiento y la perpetuación de las especies (Bewley y Black, 1982; Vleeshouwers *et al.*, 1995; Hilhorst, 1998).

El efecto de los microorganismos sobre la cubierta de las semillas, así como sus implicaciones en la viabilidad y germinación han sido reportados según el caso como desfavorable (Kremer y Shulte, 1989; Greenfield, 2000), benéfico (Pfeiffer, 1934; Gogue y Emino, 1979; Morpeth y Hall, 2000) e inocuo (Espinosa-García *et al.*, 2003; Schafer y Kotanen, 2003). Un efecto benéfico, se reportó en semillas de *Empetrum hermaphroditum*, *Teutona grandis* y *Opuntia tomentosa* (Rajput y Tiwari, 2001; Baskin *et al.*, 2002; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009).

En semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* se mantuvo la viabilidad de las semillas a pesar del período de enterramiento en el suelo (Tabla 10) (Figura 3C y D).

En el caso de semillas de *E. chiotilla* se observó una disminución significativa en los porcentajes de germinación con respecto al tiempo de enterramiento de 21

meses, pudiera ocurrir que se se trate de latencia. Como ocurre en periodos relativamente cortos de tiempo con *S. griseus* en donde las variaciones pueden interpretarse considerando estados de latencia.

Las observaciones del estado de las testas realizadas en MEB con semillas enterradas durante 21 meses no muestran daños evidentes que pudieran causar la muerte de las semillas, lo cual sugiere que las semillas que no germinaron permanecieron latentes. Se observaron algunas esporas de hongos en el relieve de los tegumentos y no se detectó crecimiento de micelio. Mayor *et al.* (2007) reportaron que la actividad fúngica y el daño que ésta provoca en las semillas están directamente relacionados con la humedad relativa del suelo, mientras que las condiciones de aridez tienden a reducir el deterioro causado por actividad fúngica.

Los resultados de germinación de semillas enterradas durante 21 meses (Tabla 10 y Figura 3 C y D) pueden ser un indicador de que las semillas de *E. chiotilla*, que tiene testas más gruesas, son menos susceptibles a las variaciones en la temperatura y humedad del suelo del matorral xerófilo que las de *S. griseus*.

Los resultados de sobrevivencia de semillas sugieren que las semillas de *E. chiotilla* pudieron permanecer viables en el suelo del matorral xerófilo hasta por 21 meses.

La apariencia tanto de semillas almacenadas en laboratorio como las que fueron enterradas en suelo no mostraron diferencias (Figura 18). La combinación de latencia fisiológica e impuesta podría explicar la ausencia de germinación en algunas de las semillas exhumadas.

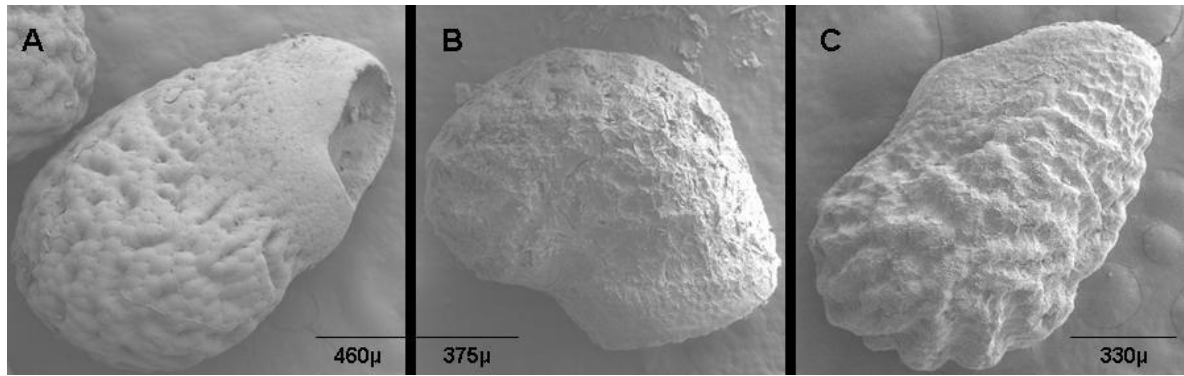


Figura 18. Semillas de *Stenocereus griseus* (A) y *Escontria chiotilla* (B y C) procesadas con MEB. Las semillas permanecieron enterradas en suelo del matorral xerófilo por 21 meses (A y C). (B). Semillas de *E. chiotilla* almacenadas en bolsas de papel estraza en laboratorio a 25 ± 5 °C durante el mismo período de tiempo. La integridad externa en ambas (enterradas y almacenadas en laboratorio) no muestra daños evidentes por la actividad de microorganismos en el suelo.

Las semillas de *O. tomentosa* después de su permanencia en el suelo durante 8 meses presentan erosión en los tegumentos externos, provocados por hongos. Esta actividad resulta, benéfica, ya que la capacidad germinativa se incrementa después del enterramiento (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009).

En cuanto a la velocidad de germinación, en ambas especies el valor más alto se obtuvo al momento de la cosecha. En *E. chiotilla* durante todo el tiempo de enterramiento se incrementa significativamente el número de días de germinación (Tabla 10), lo que refuerza la posibilidad de que las semillas entran en estado de latencia. En *S. griseus* se registra un incremento significativo hasta los 18.5 meses y luego una disminución que se aproxima a la velocidad obtenida al inicio (Tabla 10, Figura 3 C).

En semillas de *Stenocereus stellatus* (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001) y *Polaskiia chichipe* (Otero-Arnaiz *et al.*, 2003), la velocidad de germinación de poblaciones cultivadas es mayor que la de semillas que provienen de poblaciones silvestres.

Las semillas de *S. griseus* que es cultivada germinan ligeramente más rápido que las semillas de *E. chiotilla* (Tabla 10).

Para confirmar los resultados del primer experimento y siguiendo la misma metodología que en el primero, se realizó un segundo experimento de sobrevivencia de semillas en el banco.

Los resultados obtenidos después de 12.5 meses en matorral, muestran que a insolación directa en ambos años de colecta y a la sombra sólo en la colecta 2007, las semillas de *E. chiotilla* mantuvieron la capacidad de germinación. A la sombra para la colecta 2008 se redujó significativamente a los 6.5 y 9 meses. (Tabla 11a, Figura 4 B).

El número de días de germinación se incrementó significativamente con respecto al tiempo de enterramiento. (Tabla 11a). Confirmando los resultados obtenidos en el primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco.

En semillas de *S. griseus*, a insolación directa para ambos años de colecta, la capacidad de germinación a los 12.5 meses se mantiene elevada (Tabla 11b). A la sombra en ambos años de colecta, se registró una disminución significativa (Tabla 11b).

Para la colecta 2007 tanto a insolación directa como a la sombra, el número de días de germinación se incremento significativamente. Para la colecta 2008, a insolación directa el número de días de germinación se incremento significativamente, a la sombra se registraron fluctuaciones sin diferencias significativas (Tabla 11b).

Los resultados obtenidos después de 12.5 meses en huerta, muestran que a la sombra, en ambos años de colecta, las semillas de *E. chiotilla* mantuvieron la

capacidad de germinación. Para la colecta 2007, el número de días de germinación se incrementó significativamente con respecto al tiempo de enterramiento (Tabla 11a). Confirmando los resultados obtenidos en el primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco.

A la sombra para la colecta 2007, la capacidad de germinación en semillas de *S. griseus* a los 12.5 meses, se redujó significativamente (Tabla 11b). Para la colecta 2008 se mantuvo elevada (Tabla 11b). Para la colecta 2007, el número de días de germinación se incrementó significativamente con respecto al tiempo de enterramiento (Tabla 11b). Confirmando los resultados obtenidos en el primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco.

Existen pocos reportes que evalúen el comportamiento germinativo de semillas enterradas en diferentes sitios y años de colecta, pero se ha reportado que en semillas de *O. tomentosa* enterradas en tres sitios distintos y contrastantes (bajo la sombra del fuste de *Buddleja cordata*, en un espacio abierto con vegetación herbácea y bajo la sombra de una roca de dos metros de altura), los porcentajes de germinación después de ocho meses de enterradas dependen de la sombra que provee la cobertura vegetal o rocas. Las semillas que se enterraron debajo de la sombra de la roca de dos metros de altura, después de exhumadas obtuvieron los porcentajes más altos de germinación, en comparación con las de los otros dos sitios (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009).

Este comportamiento es explicado por la heterogeneidad del ambiente (microambientes) en los sitios en que fueron enterradas las semillas, algo normalmente atribuido a las condiciones de temperatura y humedad en el suelo.

En nuestro experimento, las semillas fueron enterradas bajo la sombra de un árbol adulto de *E. chiotilla* y *S. griseus* y en dos áreas abiertas. Los registros de temperatura se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Temperaturas promedio registradas con un termómetro al nivel del suelo entre las 12:00 y las 15:00 horas.

Sitios de enterramiento	Temperatura promedio en °C	
	Sombra	Insolación
1	30	35
2	26	37
3	28	37
4	27	38

Estas variaciones en la temperatura podrían modificar el comportamiento germinativo de las semillas.

Como se ha explicado en párrafos anteriores, la entrada y salida de latencia de las semillas podría estar relacionada con la variación en la temperatura y humedad de los sitios en que se enterraron las semillas.

Después de la dispersión, las semillas están expuestas a variaciones en las condiciones ambientales. Estas determinan la viabilidad, inducen la latencia, modifica los porcentajes de germinación y el establecimiento de las plántulas (Chambers y MacMahon, 1994; Vázquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1994; Allen y Meyer, 1998 y Baskin y Baskin, 1998). Los resultados de sobrevivencia de

semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* después de almacenadas en laboratorio y banco confirman esas observaciones.

Los resultados de sobrevivencia de semillas sugieren que estas especies pueden formar un banco de semillas en el suelo del matorral xerófilo, como ha sido descrito para *O. tomentosa* (Olvera-Carrillo *et al.*, 2009). Nuestros resultados sugieren como lo proponen Montiel y Montaña (2003) que la formación de un banco de semillas en el suelo de zonas áridas favorecería la conservación de las especies en el matorral xerófilo.

7.2.- Discusión cultivo *in vitro*

7.2.1.- Desinfestación de explantes

Con el objeto de establecer un sistema de micropropagación de individuos elite de *E. chiotilla*, se utilizaron como explantes las areolas de los brazos más jóvenes de plantas adultas (de 4 a 5 meses de edad), y plántulas de semillas germinadas *in vivo*, bajo condiciones asépticas.

En los sistemas de micropropagación, la etapa de desinfestación de los explantes, es primordial, ya que de ella depende el establecimiento del cultivo. Medeiros *et al.* (2006), han reportado que la desinfestación de la superficie de los explantes es extremadamente importante, dado que en las espinas y tricomas del cactus, normalmente se encuentran una amplia variedad de microorganismos que son los principales agentes contaminantes.

Varios compuestos químicos han sido reportados para este procedimiento, hipoclorito de sodio (Johnson y Emino, 1979), Cloramina B (Vyskot y Jara, 1984) e hipoclorito de calcio (Escobar *et al.*, 1986), entre otros.

7.2.1.1.- Desinfestación de las semillas

Las concentraciones de blanqueador comercial al 20, 30 y 40%, con un tiempo de inmersión de diez minutos, seguido de etanol al 70% y peróxido de hidrógeno durante un minuto, permitieron la desinfestación de las semillas de *E. chiotilla*.

La capacidad germinativa de las semillas desinfestadas con este tratamiento no se redujo: cinco días después de la siembra, 80% de las semillas de *E. chiotilla* germinaron (Figura 14).

Las semillas desinfestadas con blanqueador comercial en las mismas concentraciones, pero con mayor tiempo de inmersión (20 y 30 minutos), disminuyeron su capacidad germinativa hasta en un 60% (Figura 14).

Resultados similares de descontaminación, se obtuvieron con semillas de *Notocactus magnificus* esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 25% durante diez minutos, seguido de seis lavados con agua destilada y esterilizada (Medeiros, *et al.*, 2006). Sin embargo a diferencia con las semillas de *E. chiotilla*, la capacidad germinativa de las semillas de *Notocactus magnificus* fué del 26%. Los bajos porcentajes de germinación obtenidos se atribuyeron a la baja viabilidad de las semillas, un inadecuado potencial osmótico del medio y una alta humedad.

La viabilidad de las semillas de *E. chiotilla*, es superior al 90% y no se redujo después del tratamiento de desinfestación.

En semillas de *Turbinicarpus laui*, el uso de hipoclorito de sodio tuvo resultados satisfactorios en la etapa de desinfestación, pero al igual que otras semillas de cactáceas, la capacidad germinativa es menor al 50%. En este caso, los bajos porcentajes de germinación se atribuyeron al establecimiento de latencia (Mata *et al.*, 2001).

El hipoclorito de sodio, etanol y peróxido de hidrógeno han sido utilizados en la desinfestación de otras semillas de cactáceas, *Pelecypora aselliformis*, *Pelecypora strobiliformis* (Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), entre otras.

7.2.1.2.- Desinfestación de areolas

Como explantes, en este estudio se utilizaron las areolas de las ramas más jóvenes de plantas adultas. Se cortaron segmentos de tejido de 1 cm² de la rama del cactus. Para la desinfestación de las areolas se utilizó blanqueador comercial marca Cloralex (hipoclorito de sodio) en diferentes concentraciones y etanol al 70%. Para retirar cualquier residuo de los agentes desinfectantes, las areolas fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril.

En el caso de las areolas, los tratamientos con blanqueador a 2, 5 y 8%, con un tiempo de inmersión de diez minutos, seguidos de etanol al 70% durante cinco minutos no presentaron contaminación. Sin embargo, las areolas de *E. chiotilla* se oscurecen rápidamente, el color de las areolas pasa de verde claro a negro en menos de una hora (Figuras 8 A y B).

Después de varios días, se registró una mortalidad total de las areolas de *E. chiotilla* probablemente debido a la necrosis del tejido, como producto de la oxidación y liberación de compuestos fenólicos.

Explantes de *Schlumbergera* y *Rhipsalidopsis* (Sriskandarajah y Serek, 2004), *Mammillaria albicoma* (Wyka et al., 2006), y *Selenicereus megalanthus* (Pelah et al., 2002), tratados de manera similar no presentaron oscurecimiento del tejido, ni necrosis producto de la oxidación y liberación de compuestos fenólicos.

La liberación de compuestos fenólicos por parte de las células vegetales es interpretada como un mecanismo de defensa ante un estrés (mecánico, químico, físico, ó patógeno) y es común en las especies vegetales.

Gao (1999) en Cheng-Mei *et al.*, (2003) reportó que la contaminación por fenoles es un problema común en el cultivo de tejidos vegetales y está directamente relacionado con la actividad de la polifenol oxidasa en los explantes.

Los fenoles son compuestos inestables que fácilmente son oxidados por la polifenol oxidasa, lo que produce el oscurecimiento de los explantes (Cheng-Mei *et al.*, 2003).

Resultados similares de fenolización se han reportado en el cultivo *in vitro* de tres variedades del género *Saccharum* sp. (Badila, GT11 y ROC16), en este estudio, la mortalidad de los explantes se debió al oscurecimiento de los explantes como producto de la oxidación del tejido, causando necrosis (Cheng-Mei *et al.*, 2003).

Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004) reportaron el oscurecimiento de los explantes de *Fragaria ananassa* como producto de la liberación de compuestos fenólicos, los explantes presentaron necrosis y finalmente murieron. El mismo problema presentaron cultivos de *Dendrocalamus latiflorus*, *Phyllostachys nigra* (Li-Chun *et al.*, 2002), varios clones del género *Musa* spp. (Parecido al Rey (AAA), Gran Enano (AAA), UCRS (AAA), CEMSA ¾ (ABB) y Burro CEMSA (ABB)) (Kosky *et al.*, 1995).

En este estudio, para controlar el oscurecimiento de las areolas de *E. chiotilla* y evitar su posterior necrosis, se utilizaron dos agentes antioxidantes: carbón activado de 1 a 3 g/L y ácido ascórbico de 0 a 1 mg/L. Ambos agentes antioxidantes han sido ampliamente reportados para controlar el oscurecimiento de los explantes provocado por la oxidación del tejido (Kosky *et al.*, 1995; Pan y Staden, 1998; Li-Chun *et al.*, 2002; Cheng-Mei *et al.*, 2003; Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004).

En particular, el carbón activado ha sido utilizado por sus características de alta capacidad de absorción de gases, vapores, compuestos coloidales y compuestos aromáticos (polifenoles) (Pan y Staden, 1998).

En el presente estudio, las concentraciones de carbón activado y ácido ascórbico que se utilizaron, no evitaron el oscurecimiento de las areolas (Figura 14). Dos semanas después, la mortalidad de las areolas fue provocada por la liberación de compuestos fenólicos por parte del tejido.

El carbón activado en combinación con otros agentes antioxidantes como: ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrodina (PVP), policar, tidiazuron y la cisteína han sido reportados para controlar la oxidación y mejora la calidad de los explantes en los medios de cultivo. Estos agentes antioxidantes podrían utilizarse para reducir el oscurecimiento de las areolas de *E. chiotilla* y así reducir la mortalidad. La desinfestación de plántulas de tres meses de edad utilizadas como explantes en este estudio, no fue exitosa. Los tratamientos con cloro y etanol no fueron eficientes.

Resultados opuestos se han reportado en plántulas de *Opuntia ficus-indica* (Llamota-Zárate *et al.*, 1999), *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002) e *Hylocereus undatus* (Mohamed-Yasseen, 2002), entre otras, pues en estos casos la utilización del blanqueador comercial, etanol al 70 y 90% y los lavados con agua destilada y esterilizada lograron desinfestar las plántulas. No sólo los microorganismos de origen externo pueden provocar la contaminación del medio de cultivo. La contaminación por bacterias y hongos llamados endofíticos es común en el cultivo de tejidos (Sarasan *et al.*, 2006).

Las concentraciones de cloro, etanol y los lavados con agua destilada y esterilizada que se utilizaron en el presente estudio han sido ampliamente utilizadas en la desinfección de los explantes, por lo que la contaminación del medio de cultivo no se puede atribuir sólo a un origen externo, sino también a la de origen interno.

Para evitar la contaminación del medio de cultivo por hongos y bacterias de tipo endofítico, al medio de cultivo se le agregaron dos antimicrobicidas, Proclin 300 y PPM, en concentraciones de 0.2% y 0.8%, respectivamente.

Pence (1996) citado en Sarasan *et al*, (2006) reportó que la reducción de la contaminación de tipo endofítico puede reducirse considerablemente agregando al medio de cultivo antimicrobicidas y fungicidas. Entre los más comunes están Plant Preservative Mixture (PPM) y Isotiazilona, en concentraciones entre 0.5 y 4 mL/L. El Proclin 300 ha sido poco utilizado en el cultivo de tejidos vegetales; se ha reportado su uso, por ejemplo en el cultivo de tejidos de manzana (Nagy *et al.*, 2005).

Como se ha citado en párrafos anteriores, la liberación de compuestos fenólicos es común en todas las especies vegetales, y es interpretada como una respuesta ante un estrés de tipo mecánico, físico, químico, ó patógeno. La exposición de las plántulas al Proclin 300 y PPM, provocó un estado de estrés químico, induciendo la liberación de compuestos fenólicos. Cuando la liberación de polifenoles excede a la actividad de la polifenol oxidasa (PPO), y dado que los polifenoles son compuestos tóxicos para las células, el exceso provoca la muerte celular, que finalmente provoca la necrosis del tejido y la muerte de la plántula.

Los resultados obtenidos al utilizar el Proclin 300 y PPM, hacen suponer que la contaminación del medio de cultivo, no fue de origen externo, porque los medios de cultivo no se contaminaron cuando se agregaron los dos microbicidas.

Pelecypora aselliformis y *Pelecypora strobiliformis* (Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer et al., 2003), *Turbinicarpus laui*; *Turbinicarpus lophophoroides*; *Turbinicarpus pseudopectinatus*; *Turbinicarpus schmiedickeanus* Subsp. *flaviflorus*; *Turbinicarpus schmiedickeanus* Subsp. *klinkerianus*; *Turbinicarpus schmiedickeanus* Subsp. *schmiedickeanus*; *Turbinicarpus subterraneus* y *Turbinicarpus valdezianus* (Dávila-Figueroa et al., 2005), *Notocactus magnificus* (Medeiros et al., 2006), son algunas de las especies de cactáceas donde se han obtenido con éxito los explantes de plántulas de menos de un año de edad.

En nuestro estudio, no fue posible obtener explantes a partir de plántulas de cinco meses de edad, dado que la muerte de las plántulas fue provocada por la oxidación del tejido ocasionada por la liberación de polifenoles, muy presumiblemente al ser expuestas al Proclin 300 y PPM como respuesta a un tipo de estrés químico.

Las pruebas de desinfestación de *E. chiotilla*, presentan una contaminación severa y producen exceso de polifenoles liberados por las células, por lo que, se decidió abandonar el cultivo *in vitro* de areolas de las plantas adultas y a partir de plántulas de cinco meses de edad. Lo anterior no significa que no sea posible establecer cultivos de plántulas maduras, pero se requiere continuar con los experimentos para lograr su desinfestación. Lo más deseable es el establecimiento

de material adulto seleccionado, pero este, como en este caso no siempre es posible, es por ello que cambiamos de material a material juvenil de semilla.

7.2.2.- Germinación *in vitro* de semillas de *E. chiotilla*

Las semillas de *E. chiotilla* mostraron porcentajes de germinación superiores al 80% en los tratamientos evaluados. Para promover la inducción de brotes, el medio de cultivo fue enriquecido con diferentes concentraciones de 6-BAP.

El uso del 6-BAP ha sido ampliamente reportado en la inducción de brotes en diferentes especies de cactáceas: *Turbinicarpus laui* (Mata et al., 2001), *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis* (Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer et al., 2003), *Opuntia ficus-indica* (García-Saucedo et al., 2005), *Notocactus magnificus* (Medeiros et al., 2006) y *Mammillaria albicoma* (Wyka et al., 2006), entre otras.

Después de seis semanas los explantes de *E. chiotilla* en los tres tratamientos con 6-BAP, se apreció la formación de yemas en el ápice de las plántulas. Los explantes no expuestos al compuesto no las desarrollaron (Figura 15 A-D).

El 6-BAP es un regulador de crecimiento que pertenece a las citocianinas, cuyo efecto principal es promover la multiplicación celular en las células vegetales. Básicamente es sintetizado en los meristemos apicales de las plantas. En el medio de cultivo, los explantes tienen disponible el compuesto de manera directa. La disponibilidad directa del regulador de crecimiento permite que se lleve a cabo la proliferación celular en los meristemos del explante, formando yemas, estas generalmente se observan de color blanco (Figura 15 B, C, y D). Los meristemos en las cactáceas se encuentran en las areolas de la columna, pero en plántulas

jóvenes (de menos de 1 mes), las primeras areolas se encuentran en el apice, por esta razón las yemas se observan en esta posición.

Resultados similares se obtuvieron en plántulas de *Turbinicarpus laui* (Mata *et al.*, 2001), *Pelecyphora aselliformis* y *Pelecyphora strobiliformis* (Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006) y *Notocactus magnificus* (Medeiros *et al.*, 2006). Las concentraciones de 6-BAP utilizadas fluctuaron entre 0 y 22.2 μ M, en combinación con otros reguladores de crecimiento (ácido naftalenoacético (NAA), kinetina y 2, 4 ácido diclorofenoacético (2,4-D), en diferentes concentraciones. En estas especies, las yemas desarrolladas se observaron en las primeras cuatro semanas tal es el caso de *Mammillaria albicoma* y después de cuatro meses, en explantes de *Notocactus magnificus*. Las diferencias en la respuesta de organogénesis entre las diferentes especies, se explican en función de las concentraciones del 6-BAP y la combinación con otros reguladores de crecimiento, así como por las condiciones del medio de cultivo.

Las yemas de los explantes de *E. chiotilla* en los tres tratamientos con 6-BAP después de 4.5 meses dan origen a nuevos brotes con un tamaño promedio de 2-3 mm independientemente del tratamiento (Figura 17 B-D).

Para su multiplicación y posterior enraizamiento, los nuevos brotes obtenidos en la etapa previa fueron sembrados en un medio MS adicionado con 2 mg/L de 6-BAP. Los ingredientes del medio de cultivo y las condiciones de temperatura y luz fueron los mismos.

Después de ocho meses, en promedio, por cada plántula obtenida *in vitro* se obtuvieron 48 nuevos brotes, con un tamaño promedio de 0.5 mm. Los nuevos brotes formados desarrollaron costillas y areolas bien diferenciadas, rodeadas de espinas periféricas definidas (Figura 18 A-D). La concentración de 6-BAP utilizada en este estudio, promovió el desarrollo de nuevos brotes a partir de la activación de las areolas de las plántulas sembradas *in vitro*.

Resultados similares se obtuvieron en *Pelecypora aselliformis* y *Pelecypora strobiliformis*, donde se obtuvo un alto índice de formación de nuevos brotes. Sin embargo, las concentraciones utilizadas de 6-BAP fueron cuatro veces superiores a las utilizadas para *E. chiotilla*. En ese estudio, el número de brotes desarrollados por explante fue de 66 hasta 136, dependiendo de la concentración de 6-BAP. El mayor índice de multiplicación se obtuvo a concentraciones de 8.8 μM , independientemente del tipo de explante (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002).

Resultados similares se han reportado en otras especies de cactáceas, como *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), *Notocactus magnificus* (Medeiros *et al.*, 2006).

El uso de otros reguladores de crecimiento, con efecto positivo en la fase de multiplicación, por ejemplo el 2iP, han sido previamente reportados, (Hubstenberger *et al.*, 1992 en Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002).

El NAA en combinación con el TDZ en diferentes concentraciones han tenido efectos positivos sobre el índice de multiplicación en *Hylocereus undatus* (Mohameed-Yasseen, 2002).

Los ingredientes del medio de cultivo, la temperatura y la luz son adecuadas para inducir la formación de nuevos brotes a partir de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, tanto para la fase de inducción como para la etapa de multiplicación.

En explantes de *E. chiotilla*, la concentración de 2 mg de 6-BAP resultó positiva en la fase de multiplicación, al obtener 48 nuevos brotes.

No se ha observado la propagación vegetativa de *E. chiotilla* en su hábitat natural, varias pruebas con métodos agronómicos han resultado infructuosas en el intento de propagarla a partir de ramas o “brazos” de plantas adultas: la mayoría muere por efecto de la fenolización del tejido, la contaminación por patógenos y el daño por insectos (López-Gómez *et al.*, 2000).

Para los productores de la región, el no poder propagar a *E. chiotilla* por medios vegetativos, es una desventaja con respecto a otras cactáceas frutícolas, como *S. griseus* o *S. stellatus*, siendo favorecidas por los propios productores e intensificando su propagación. Esto puede provocar un desplazamiento de las especies endémicas como es el caso de *E. chiotilla*. La propagación *in vitro* de *E. chiotilla* para la obtención de plántulas más vigorosas y con un crecimiento más rápido podría disminuir esta desventaja con respecto a *S. griseus* y otras especies frutícolas.

8.0.- CONCLUSIONES

8.1.- Germinación y banco de semillas

La viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* es igualmente elevada a la cosecha, momento en el que la capacidad y velocidad de germinación son más elevadas en las semillas fotoblasticas estrictas de ambas especies.

Se observaron sólo ligeras diferencias en la capacidad de germinación en función de la temperatura, el rango optimo se situa entre 25 y 30 °C, a 10 °C no germinan y en alternancia 30/10 °C, la capacidad de germinación disminuye y la velocidad es mucho más lenta. La velocidad de germinación fue ligeramente mayor en las semillas de *S. griseus* en todo el gradiente de temperaturas, siendo más acentuada a 15 °C. El porcentaje más elevado de sobrevivencia de plántulas en ambas especies se obtuvo en aquellas que germinaron a 15 °C y se transfirieron a 25 °C.

En los experimentos de germinación en campo, las semillas de *E. chiotilla* no germinaron. Las semillas de *S. griseus* germinaron hasta en un 29% a la sombra y en porcentajes menores con insolación directa. La nula germinación de *E. chiotilla* y los bajos porcentajes de *S. griseus* pueden ser en parte atribuidos a las fluctuaciones en la temperatura que se registraron en el matorral.

El efecto de las condiciones ambientales en las semillas sembradas y colocadas en campo no redujo significativamente la viabilidad de las semillas, ni induce latencia adquirida, pues transfiriendo las semillas a condiciones favorables se obtuvieron porcentajes de germinación elevados en ambas especies.

En alternancia de temperatura 30/10 °C, la capacidad y velocidad de germinación en *E. chiotilla* y *S. griseus* se redujo con respecto a la obtenida en la temperatura óptima.

Las temperaturas de 45 hasta 50 °C registradas en el suelo durante los experimentos de germinación en campo y los resultados de la exposición de las semillas en alternancia 30/10 °C, sugieren que las temperaturas extremas a las que las semillas imbibidas son expuestas redujeron la germinación en condiciones naturales, independientemente de la disponibilidad de agua en el sustrato.

Se ha enfatizado del papel de las especies nodriza en la germinación de semillas de algunas especies en zonas áridas, la germinación a la sombra en los experimentos de campo de *S. griseus* coinciden con estas observaciones.

Después de que las semillas fueran almacenadas en el laboratorio durante 21 meses, se observaron sólo ligeras diferencias en la capacidad de germinación en ambas especies, en cuanto a la velocidad de germinación de ambas especies se reduce, pues se incrementan los días de germinación.

Después de 21 meses de enterradas en suelo a insolación directa, las semillas de la colecta 2007 de *E. chiotilla* reducen su capacidad de germinación. Las semillas de *S. griseus* registran una disminución a los 12 meses, pero a los 21 meses vuelve a incrementarse.

En un segundo experimento de sobrevivencia de semillas en el banco, después de 12 meses de enterradas, tanto a la sombra como a insolación directa se registraron variaciones en los porcentajes de germinación en ambos años de colecta. Al igual que en el primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco, los días de germinación se incrementaron independientemente del sitio de

enterramiento y año de colecta, siendo las semillas de *S. griseus* las que germinan más rápido. Confirmando los resultados del primer experimento de sobrevivencia de semillas en el banco.

Después de 21 meses de cosechadas, las semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* permanecieron viables en más del 80%, tanto las almacenadas en laboratorio a 25 °C como las enterradas en el suelo. Se propone por tanto, que puede existir un banco de semillas activo de estas especies en el matorral.

Después de ser almacenadas en el laboratorio, la capacidad de germinación de semillas de *E. chiotilla* y *S. griseus* fue del 97%. En campo, la semillas exhumadas germinaron en porcentajes variables, que van del 60 al 90%. Las diferencias en la capacidad y velocidad de germinación podrían ser interpretadas como resultado de la entrada y salida en latencia de las semillas por el efecto de factores ambientales.

Las semillas exhumadas de *S. griseus* presentaron mayor variabilidad en la capacidad y velocidad de germinación, en comparación con las semillas de *E. chiotilla*, que es una especie endémica.

Se concluye que las semillas de ambas colectas y de ambas especies pueden permanecer viables en el suelo al menos 21 meses. Las observaciones en MEB mostraron que las semillas de ambas especies presentaban intemperización en las testas, además de la presencia de esporas de hongos. Estas diferencias no parecieron influir ni en la viabilidad ni en la germinación, pues la mayoría fueron viables y germinaron tan rápidamente como al momento de cosecharlas, una vez que son colocadas en condiciones adecuadas de agua, luz y temperatura.

Aunque la invasión de especies es un proceso natural en la dinámica de las comunidades vegetales y los efectos pueden ser variados, habría que monitorear el efecto a mediano y largo plazo del establecimiento de huertas de *S. griseus* en las poblaciones de otras cactáceas de la Mixteca Baja.

La velocidad superior de germinación, el porcentaje de germinación obtenido en campo y la propagación vegetativa de *S. griseus*, que contrasta con la ausencia de vástagos de *E. chiotilla*, alerta sobre un posible desplazamiento a largo plazo de esta especie, hasta ahora dominante y endémica de algunas comunidades del matorral xerófilo. Por ello el interés de desarrollar métodos de propagación que faciliten la instalación de huertas que no ha sido posible hasta ahora.

8.2.- Cultivo *in vitro*

La contaminación del medio de cultivo por agentes patógenos y la liberación de compuestos fenólicos de los explantes de *E. chiotilla* fueron las principales causas que impidieron el establecimiento de explantes de plantas maduras. La contaminación del medio de cultivo fue causada por patógenos de origen endofítico.

Para eliminar la contaminación de origen endofítico, las concentraciones de Proclin 300 y PPM utilizadas fueron efectivas; sin embargo, los explantes (plántulas) presentaron daño por oxidación, que fueron atribuidas a la liberación de compuestos fenólicos como una respuesta de defensa ante un estrés químico provocado por los compuestos.

Se empleó sin éxito carbón activado en combinación con ácido ascórbico para reducir el oscurecimiento en las areolas de *E. chiotilla* causada por compuestos fenólicos.

Los diferentes agentes desinfectantes utilizados en este estudio resultaron eficientes en la desinfestación de las semillas de *E. chiotilla*, la capacidad de germinación no se redujo después de los tratamientos evaluados.

Los ingredientes del medio de cultivo, las condiciones de temperatura y luz utilizadas en este estudio, resultaron favorables para la germinación de semillas *in vitro* de *E. chiotilla*, obteniéndose altos porcentajes de germinación.

Los explantes obtenidos a partir de plántulas procedentes de semillas germinadas *in vitro*, fueron los más favorables para la inducción de brotes vegetativos: de esta manera se garantizaron las condiciones asépticas de los explantes.

Las concentraciones de 6-BAP, el tipo de medio de cultivo, las condiciones de temperatura y luz utilizadas en este estudio, fueron favorables para la inducción de brotes vegetativos a partir de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*.

La primera evidencia de la formación de nuevos brotes, se observó a las cuatro semanas. El desarrollo de los nuevos brotes se dió a partir de las areolas de las plántulas, lo que coincide con el tejido meristématico. Se obtuvieron en promedio 48 nuevos brotes por cada plántula sembrada *in vitro*.

A los ocho meses, las nuevas plántulas de *E. chiotilla* obtenidas de la etapa previa se encontraron completamente diferenciadas y fueron transferidas a suelo para su aclimatación.

El medio de cultivo MS adicionado con 30 g/L de sacarosa, suplementado con 1, 3, y 5 mg/L de 6-BAP gelificado con 2 g/L de Phytigel, la temperatura y la luz son adecuadas para inducir la formación de nuevos brotes a partir de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, tanto para la fase de inducción como para la etapa de multiplicación.

Se concluye que los explantes obtenidos de plántulas procedentes de semillas germinadas *in vitro*, son los más adecuados para la inducción de brotes vegetativos. Los explantes obtenidos de areolas de plantas adultas y plántulas de cinco meses de edad no resultaron favorables. La contaminación de origen endofítico y la liberación de compuestos fenólicos fueron los principales problemas para su establecimiento.

9.0.- PERSPECTIVAS

Considerando los resultados obtenidos durante los experimentos de sobrevivencia de semillas, además para una mejor comprensión de la dinámica que las semillas experimentan en el banco y en las poblaciones de cactáceas, es necesario continuar los experimentos en por lo menos cinco años consecutivos, también se podría considerar otros experimentos como por ejemplo:

La densidad de semillas en ambientes áridos y semiáridos ha sido poco estudiada, algunos reportes han documentado que de cada siete millones de semillas de *Opuntia rastrera* sólo una plántula logra establecerse en campo (Montiel y Montaña, 2003). En el caso de las dos especies estudiadas, no se han realizado estudios ni de densidad de semillas, sobrevivencia y el posterior establecimiento de plántulas en campo. No se han realizado estudios de densidad de semillas, así como los efectos de factores como la granivoría que afectan la densidad.

La interacción de las semillas con (hormigas, roedores, murciélagos, etc.) juega un papel en el desplazamiento de las semillas en las poblaciones de cactáceas, algo que en el caso de estas dos especies ha sido poco estudiado. Por ello resultaría necesario incluir estudios donde se tomen en cuenta estas interacciones bióticas.

Se ha enfatizado mucho el papel de especies nodrizas tanto en la germinación de semillas como en el establecimiento de plántulas en ambientes áridos y semiáridos. Por ello se propone que se realicen experimentos de establecimiento de plántulas de ambas especies en campo, considerando el papel de especies nodrizas e inclusive de rocas.

Los explantes de *E. chiotilla* presentan una contaminación severa y producen exceso de polifenoles, por lo que, se decidió abandonar el cultivo *in vitro* de areolas de las plantas adultas y a partir de plántulas de cinco meses de edad. Lo anterior no significa que no es posible establecer cultivos de plántulas maduras, pero se requiere continuar con los experimentos para lograr su desinfestación debido a que lo más deseable es el establecimiento de material adulto seleccionado. En cacáceas, los explantes más utilizados son las areolas de la planta adulta, sin embargo, también han sido utilizados con éxito otras partes de la planta, raíz, pétalos son tan sólo algunas que también podrían ser utilizados en el caso de *E. chiotilla*. Se podría continuar con las areolas, pero es necesario probar otros antioxidantes en combinación con carbón activado en concentraciones diferentes. En este trabajo se logró obtener con éxito plántulas a partir de brotes vegetativos obtenidos *in vitro*, sin embargo, para estandarizar el método se requiere continuar con los experimentos de multiplicación, enraizamiento y aclimatación. En cultivo *in vitro*, la etapa de aclimatación probablemente sea la más crucial, pues de ella depende que las plántulas obtenidas *in vitro* logren establecerse en campo, por ello es necesario que las plántulas de *E. chiotilla* obtenidas *in vitro* se sometan a diversas pruebas de aclimatación incluyendo en campo, para ello, después de aclimatadas en invernadero, se requiere sean transplantadas directamente en el matorral xerófilo y monitorear su establecimiento por lo menos en los próximos tres años.

10.0.- BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson W. G. (1980). Demography and vegetative reproduction. In: Solbrig O. T. (edt.). Demography and evolution in plant population. University of California Press, Berkely, USA, 89-106 pp.
- Alcorn S. M and Kurtz E. B. (1959). Some factor affecting the germination of seed of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Journal of Botany* 46: 526-529.
- Allen P. S. and Meyer S. E. (1998). Ecological aspects of seed dormancy loss. *Seed Science Research* 8: 183-191.
- Allen P. S., Benech-Arnold R. L., Battala B. and Bradford K. (2007). Modeling seed dormancy. In: Bradford K. and Nonogaki H (edt.). Seed development dormancy and germination. Blakwell Pub. UK.
- Arredondo-Gómez A. y Camacho-Morfin F. (1995). Germinación de *Astrophytum myriostigma* en relación con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubación. *Cactáceas Suculentas Mexicanas*. 40: 34-38.
- Arellano E. and Casas A. (2003). Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacán Valley, Central México. *Journal Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 439-453.
- Avilán R. L., Rodríguez M. y Ruíz J. (1998). Germinación de algunas variedades de mango con bajo y mediano porte para ser usadas como patrones. *Agronomía Tropical* 54: 445-456.

- Baker H. G. (1989). Some aspects of the natural history of seed banks. In: Leck M. A., Parker V. T. and Simpson R. L. (edt.). Ecology of soil seed Banks. Academic Press, New York. 9-21 pp.
- Baskin C. C., Zackrisson O. and Baskin J. M. (2002). Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *American Journal of Botany* 89: 486-493.
- Baskin C. C. and Baskin J. M. (1998). Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press, NY.
- Baskin J. M. and Baskin C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Baskin J. M. and Baskin C. C. (2000). Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Science Research* 10: 409-413.
- Batlla D., Kruk B. C. and Benech-Arnold R. L. (2004). Modeling changes in dormancy in weed soil seed bank; implications for the prediction of weed emergence. In: Bench R. L. and Sanchez R. A. (edt.). Handbook of seed physiology: Applications to Agriculture. Haworth Press NY.
- Benítez H. y Davila P. (2002). Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 40: 8-11.
- Bewley J. D. and Black M. (1982). Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: Viability, dormancy, and environmental control. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 359 pp.

- Bewley J. D. and Black M. (1994). Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press. NY.
- Bradford K. and Nonogaki H. (2007). Seed development, dormancy and germination. *Annual Plant Reviews* 27: 367.
- Bravo-Hollis H. (1978). Las cactáceas de México. Vol. I Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bravo-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. (1991). Las cactáceas de México. Vol. II y III. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Casas A. (2002). Uso y manejo de cactáceas columnares Mesoamericanas. *Biodiversitas* 40: 18-23.
- Casas A., Caballero J. and Valiente-Banuet A. (1999a). Use, management and domestication of columnar cacti in south-central México: A historical perspective. *Journal of Ethnobiology* 19: 71-95.
- Casas A., Valiente-Banuet A., Rojas-Martínez A. and Dávila P. (1999b). Reproductive biology and the process of domestication of the columnar cactus *Stenocereus stellatus* in central México. *American Journal of Botany* 86: 534-542.
- Casas A., Pickersgill B., Caballero J. and Valiente-Banuet A. (1997). Ethnobotany and the process of domestication of the xoconochtli *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley and La Mixteca Baja, México. *Economic Botany* 51: 279-292.

- Chambers J. C. and MacMahon J. A. (1994). A day in the life of a seed: movements and fates of seeds and their applications for natural and managed systems. *Annual Review Ecology System* 25: 263-292.
- Cheng-Mei H., Yang-Rui Li and Yan-Ping Ye. (2003). Minimizing phenol pollution in sugarcane stem apical meristem culture. *Sugar Technology* 5: 297-300.
- Clark-Tapia R. and Molina-Freaner F. (2004). Reproductive ecology of the clonal cactus *Stenocereus eruca* in the Sonora desert. *Plant System Evolution* 247: 155-164.
- Cota-Sánchez J. H. (1984). Influencia de la luz, temperatura y sustancias químicas sobre la germinación de semillas de *Fereocactus latispinus* (Haw) Br. and Rose (Cactaceae). Bachelor Thesis. ENCB- Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. 82.
- Dávila-Figueroa A. C., De la Rosa-Carrillo M. L. and Pérez-Molphe-Balch E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 41: 540-545.
- Dau L. and Labourian L. G. (1974). Temperature control of seed germination in *Pereskia aculeate* Mill. *Academia Brasileira de Ciencias* 46: 311-322.
- Del Castillo R. F. (1986). Semilla, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 31: 5-11.

- Escobar H. A., Villalobos V. M. and Villegas A. (1986) *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cellular Tissue Organ Culture* 7: 269-277.
- Espinosa-García F. J., Vázquez-Bravo R. and Martínez-Ramos M. (2003). Survival, germinability and fungal colonization of dimorphic achenes of the annual weed *Galinsoga parviflora* buried in the soil. *Weed Research* 43: 269-275.
- Evans A. S. and Cabin R. J. (1995). Can dormancy effects the evolution of post-germination traits? The case of *Lesquerella fendleri*. *Ecology* 76: 344-356.
- Evans L. T. (1993a). Crop evolution, adaptation and yield. Cambridge: Cambridge University Press. 500 pp.
- Evans L. T. (1993b). Crops yields and world food supply. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fenner M. and Thompson K. (2006). The ecology of seeds. University press, Cambridge. 1ra. Edition. 250 pp.
- Fenner M. (1985). Seeds ecology. Chapman and Hall, London, UK. 151 pp.
- Forcella F., Benech Arnold R. L., Sanchez R. and Ghera C. M. (2000). Modeling seedling emergence. *Field Crops Research* 3884: 1-17.
- Fray A. and Doganlar S. (2003). Comparative genetics of crop plant domestication and evolution. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 27: 59-69.

- Gao G. X. (1999). Browing in plant tissue culture. *Plant Physiology Community* 35: 501-506.
- García-Saucedo P. A., Valdez-Morales M., Valverde M. E., Cruz-Hernández A. and Paredes-López O. (2005). Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 80: 215-219.
- Giusti P., Vitti D., Fiocchetti F., Colla G., Saccardo F. and Tucci M. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Science Horticulture* 93: 319-332.
- Godínez-Álvarez H., Valiente-Banuet A. and Valiente-Banuet L. (1999). Biotic interactions and the populations dynamics of the long-lived columnar cactus *Neubuxbaumia tetetzo* in the Tehuacán Valley, México. *Canadian Journal of Botany* 77: 203-208.
- Gogue G. J. and Emino E. R. (1979). Seed coat scarification of *Albizia julibrissin* Durazz by natural mechanisms. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 104: 421-423.
- González C. I. (2006). Desarrollo y aplicación de procesos tecnológicos para la elaboración de conservas a base de pitaya (*Stenocereus spp*) de la Región de la Mixteca. Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 71 pp.
- Greenfield L. G. (2000). The microbial decomposition of seeds. In: McManus, M. T., Outred H. A. and Pollock K. M. (edt.). Seed research in New Zealand. Agronomy society of New Zealand, New Zealand. 47-51 pp.

- Guillén S., Benítez M., Martínez-Ramos A. and Casas A. (2009). Seed germination of wild, *in situ*-managed, and cultivated populations of columnar cacti in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Journal of Arid Environments* 73: 407-413.
- Gutterman Y. (1994). Strategies of seed dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *The Botanical Review* 60: 373-425.
- Gutterman Y. (1993). Seed germination in desert plant: adaptations of desert organisms. Springer-Verlag, Berlin.
- Harper J. L. (1977). Population biology of plants. Academia Press London. 892 pp.
- Hartmann T. H. y Kester E. D. (1989). Propagación de plantas. Principios y prácticas. 3ra edición. CONTINENTAL, México. 760 pp.
- Hawkes J. G. (1983). The Diversity of crop plants. Harvard University Press, London.
- Hayashi E., Aoyama N. and Still W. D. (2008) Quantitative trait loci associated with lettuce seed germination under temperature and light environments. *Genome* 51: 928-947.
- Hilhorst H. W. M. (1998). The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research* 8: 77-90.
- Hintze J. 2001. Number Cruncher Statistical System (NCSS). Release 2001.
- Hubstenberger J. F., Clayton P. W. and Phillips G. C. (1992). Micropropagation of cacti (Cactaceae). In: Bajaj Y. P. S. (edt.).

Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and micropropagation
IV. Berlin: Springer-Verlag. 49-68 pp.

- Johnson J. L. and Emino E. R. (1979). *In vitro* propagation of *Mammillaria elongate*. *Horticultural Science* 14: 605-606.
- Juárez M. C. and Passera C. B. (2002). *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff and acclimatization to field conditions. *Biocellular* 26: 319-324.
- Koller D. (1972). Environmental control of seed germination. In: Kozlowski T. T. (edt.). Germination control, metabolism, and pathology. Academic Press, New York, USA. 432 pp.
- Kosky G. R., Gerth A., Lourdes-García R., Freire S. M., Pérez B. y Herrera I. (1995). Obtención de callos y regeneración de plantas en diferentes clones de plátano y banano. *Agronomía Tropical* 45: 1-9.
- Kremer R. J. and Shulte L. (1989). Influence of chemical treatment and *Fusarium oxysporum* on velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Technology* 3: 369-374.
- Li-Chun H., Ya-Lin L., Bau-Lian H., Ching-I K. and Jei-Fu S. (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 38: 358-365.
- López-Gómez, R., Díaz-Pérez, J. C. and Flores-Martínez, G. (2000). Vegetative propagation of three species of cacti: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Agrociencia* 34: 363-367.

- Luna M. C., Aguirre R. J. y Rogelio J. (2001). Aspectos estructurales de comunidades vegetales con pitayos (*Stenocereus spp.*) en la Mixteca Baja y el Valle de Tehuacán, México. *Revista Geográfica. Instituto Panamericano de Geografía e Historia*.
- Llamota-Zárate M. R., Studart-Guimaraes C., Landsmann J. and Campos A. P. F. (1999). Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 58: 155-157.
- Machado M. D. F. P. S. and Prioli A. J. (1996). Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill, (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 32: 199-203.
- Mandujano C. M., Golubov, J. y Reyes J. (2002). Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. *Biodiversitas* 40: 4-7.
- Mandujano C. M., Montaña C. and Rojas-Aréchiga M. (2005). Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 62: 15-21.
- Martínez C. M. L., Carmona A. A. and Varela H. G. (1983). Germination studies on *Stenocereus griseus* and *Escontria chiotilla*. *Proc. I Son Sust. Use of Plant Biodiv* 39-41.
- Martínez G. J. C. (1993). Caracterización de tipos de pitaya *Stenocereus griseus* Haworth en la Mixteca. Tesis. UACH. México.

- Martínez H. E. (1983). Germinación de semillas de *Stenocereus griseus* (Haw) Buxbaum (Pitayo de Mayo). *Cactáceas Suculentas Mexicanas* 28: 51-56.
- Martínez-Vázquez O. and Rubluo A. (1989). *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal Horticultural Science* 64: 99-105.
- Mata R. M., Monroy de la Rosa A. M., Moebius G. K. and Chávez A. V. M. (2001). Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 37: 400-404.
- Mayor M. D., Bóo R. M., Peláez D. V., Elía O. R. and Tomás M. A. (2007). Influence of shrub cover on germination, dormancy and viability of buried and unburied seeds of *Piptochaetium napostaense* (Speg.) Hackel. *Journal of Arid Environments* 68: 509-521.
- Medeiros A. L., Salvador de Ribeiro C. R., Gallo L. A., Tiago de Oliveira E. y Soares P. D. M. E. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 84: 165-169.
- Méndez E. (2007). Germination of *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton and Rose (Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 68: 678-682.
- Mohamed-Yasseen Y. (2002). Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 38: 427-429.

- Moebius-Goldammer G. K., Mata-Rosas M. and Chávez-Avila V. M. (2003). Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (LEM.) K. SCHUM. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 39: 388-393.
- Montiel S. and Montaña C. (2003). Vertebrate frugivory and seed dispersal of a Chihuahua desert cactus. *Plant Ecology* 146: 221-229.
- Morpeth D. R. and Hall A. M. (2000). Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* Laxa. *Seed Science Research* 10: 489-494.
- Murashige T., Serpa M. and Jones J. B. (1974). Clonal multiplication of *Gerbera* through tissue culture. *HortScience* 9: 175-180.
- Nagy K. J., Sule S. and Sampaio. (2005). Apple tissue culture contamination by *Rhodotorula* ssp.: Identification and prevention. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 41: 520-524.
- Nikolaeva M. G. (1969). Physiology of Deep Dormancy in Seeds. IPST Press, Jerusalem. 220 pp.
- Nonogaki H., Fen F., Bradford K. (2007). Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. In: Bradford K. and Nonogaki H. (edt.). Seed development dormancy and germination. Blakwell Pub. UK.
- Ohto M., Stone S. L., Harada J. J. (2007). Genetic control of seed development and seed mass. In: Bradford K. and Nonogaki H. (edt.). Seed development dormancy and germination. Blakwell Pub. UK.

- Olvera-Carrillo Y., Márquez-Guzmán J., Sánchez-Coronado M. E., Barradas V. L., Rincón E. and Orozco-Segovia A. (2009a). Effect of burial on the germination of *Opuntia tomentosa*'s (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. *Journal of Arid Environments* 73: 421-427.
- Olvera-Carrillo Y., Méndez I., Sánchez-Coronado M. E., Guzmán-Márquez J., Barradas V. L., Huante P. and Orozco-Segovia A. (2009b). Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. *Journal of Arid Environments* 73: 414-420.
- Ortega-Baes P. and Rojas-Aréchiga M. (2007). Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and gibberellic acid effects. *Journal of Arid Environments* 69: 169-176.
- Otero-Arnaiz A., Casas A., Bartola C., Pérez-Negrón E. and Valiente-Banuet A. (2003). Evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central México: reproductive biology. *American Journal of Botany* 4: 593-602.
- Pablo L. R. (2003). Soil seed banks in the semi-arid Prepuna of Bolivia. *Plant Ecology* 168: 85-92.
- Pan M. J. and Staden V. J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture. *Review. Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pelah D., Kaushik R. A., Mizrahi Y. and Sitrit Y. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus*. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.

- Pence V. C. (1996). *In Vitro* collection (IVC). In: Normah M. N., Narimah M. K. and Clyde M. M. (edt.). International workshop on *in vitro* conservation of plant genetic resources. University Kebangsaan Malaysia. 181-190 pp.
- Pérez-Molphe E. and Dávila-Figueroa A. C. (2002). In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *Pelecyphora strobiliformis* Wendermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 38: 73-78.
- Pérez-Molphe. E., Pérez R. M. E., Villalobos A. E., Meza R. E., Morones R. L. R. and Lizarde V. H. J. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 34: 131-135.
- Pfeiffer N. E. (1934). Morphology of the seeds of *Symphoricarpos racemosus* and the relation of fungal invasion on the coat to germination capacity. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 6: 103-122.
- Pimienta-Barrios, E., and Nobel P. S. (1994). Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An ancient and modern fruit crop of México. *Economic Botany* 48: 76-83.
- Rajput A. and Tiwari K. P. (2001). Effect of alternate chilling/heating on germination of fresh teak (*Tectona grandis* L. F.) drupes without scarification of felty mesocarp. *Seed Science and Technology* 29: 57-64.
- Ramírez-Malagón R., Aguilar-Ramírez I., Borodanenko A., Pérez-Moreno L., Barrera-Guerra J. L., Núñez-Palenius H. G and Ochoa-Alejo N. (2007). *In*

- vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). In *Vitro Cellular Development Biology Plant* 43: 660-665.
- Ramírez-Padilla C. A. and Valverde T. (2005). Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity. *Journal of Arid Environments* 61: 333-343.
 - Robert M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Alamillo, M. A., Quijano-Ramayo, A. and Balám U. E. (2004). Manual for the *in vitro* culture of Agaves. Common Fund Commodities. Technical Paper No. 38, UNIDO, Vienna. 148 pp.
 - Robert M. L., Herrera J. L., Castillo E., Ojeda G. and Herrera A. M. Á. (2006). An efficient method for the Micropropagation of Agave species. In: Loyola-Vargas V. M. and Vazquez F. F. (edt.). *Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press. Inc., Totowa, NJ. 165-178 pp.
 - Rojas-Aréchiga M., Casas A. and Vázquez-Yanes C. (2001). Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, central México. *Journal of Arid Environments* 49: 279-287.
 - Rojas-Aréchiga M. and Vázquez-Yanes C. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
 - Rojas-Aréchiga M., Vázquez-Yanes C. and Orozco-Segovia. (1998). Seed response to temperature of Mexican cactus species from two forms: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecology* 135: 207-214.

- Rubluo A., Chávez V., Martínez A. P. and Martínez V. O. (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Rzedowski J. (1986). Vegetación de México. Limusa, México. 432 pp.
- Rzedowski J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México.
- Salaita L., Kar R. L., Majee M. and Downie A. B. (2005). Identification and characterization of mutants capable of rapid seed germination at 10°C from activation tagged lines of *Arabidopsis thaliana*. *Jour. of Exper. Bot.* 56: 2059-2069.
- Sánchez M. H. (1984). Origen, taxonomía y distribución de las pitayas en México. UAM-Xochimilco. Memorias del simposio de aprovechamiento de las pitayas. Oaxaca, Oax. México. 45-56 pp.
- Sánchez-Cuevas M. C. y Salaverría L. J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*. 4: 21-26.
- Sarasan A. V., Ryan C., Ramsay M. M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G. and Rowntree. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 42: 206-214.
- Schafer M. and Kotanen P. M. (2003). The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi. *Acta Oecológica* 24: 255-263.

- Simpson R. L., Leck M. A. and Parker T. (1989). Seed banks: general concepts y methodological issues. In: Leck M. A., Parker V. T. and Simpson R. L. (edt.). *Ecology of soil seed Banks*. Academic Press, New York. 3-8 pp.
- Sriskandarajah S. y Serek M. (2004). Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture* 78: 75-81.
- Thompson K. (1992). The functional ecology of seed banks. In: Fenner M. (edt.). *The ecology of regeneration in plant communities*. CAB International Oxon. UK. 231-258 pp.
- Thompson K. and Grime J. P. (1979). Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology* 67: 893-921.
- Thompson K. (1987). Seed and seed Banks. *New Phytologist* 106: 23-34.
- Tinoco A., Casas A., Luna R. and Oyama K. (2005). Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural manager populations in the Tehuacán Valley, central México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 525-538.
- Valiente-Banuet A., Casas A., Alcántara A., Dávila P., Flores N., Arizmendi M. C., Villaseñor J. L. y Ortega J. (2000). La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67: 25-74.
- Valverde T., Quijas S., López-Villavicencio M. and Castillo S. (2004). Population dynamics of *Mammillaria magnimamma* Haworth. (Cactaceae) in a lava-field in central México. *Plant Ecology* 170: 167-184.

- Vázquez-Yanes C. and Orozco-Segovia A. (1994). Signals for seeds to sense and respond to gaps. In: Caldwell M. and Pearcy R. (ed.). Exploitations of environmental heterogeneity by plants: ecophysiological processes above and below ground. Academic Press Inc., New York. 209-236 pp.
- Vegis A. (1964). Dormancy in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 15: 185-225 pp.
- Vleeshouwers L. M., Bouwmeester H. J and Karssen C. M. (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology* 83: 1031-1037.
- Vyskot B. and Jára Z. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal Horticultural Science* 59: 449-452.
- Wetherell D. F. (1982). Introduction to *in vitro* propagation. SERIES Averbys Plant Tissue Culture Wayne, New Jersey. 87 pp.
- Williams P. M. and Arias I. (1978). Physio-ecological studies of plant species from the arid and semi-arid regions of Venezuela. I. The role of endogenous of *Cereus griseus* (Haw) Britton y Rose (Cactaceae). *Acta Científica Venezolana* 29: 93-97.
- Wyka P. T., Hamerska M. and Wroblewska M. (2006). Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cellular Tissue Organ Culture* 87: 27-32.

- Yoshioka T., Endo T. and Satoh S. (1998). Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant and Cellular Physiology* 39: 307-312.