

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Micropropagación de Tres Variedades de Nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller)

Por

FLOR CRISTINA PACHECO REYES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Micropropagación de Tres Variedades de Nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller)

Por:

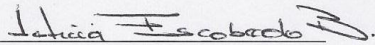
FLOR CRISTINA PACHECO REYES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



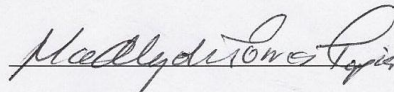
M.C. Leticia Escobedo Bocado

Asesor Principal



Dra. Francisca Ramírez Godina

Coasesor



M.P. María Alejandra Torres Tapia

Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Terra Mater, por el cobijo que me brindó durante estos cinco años, para poder realizar un sueño más en mi vida.

A la Dra. Hermila Trinidad García Osuna, por permitirme trabajar con ella en la realización de este proyecto, bajo sus conocimientos, su tutela, y por sus consejos en la parte laboral y sobre todo en la vida personal.

A la M.C Leticia Escobedo Bocardo, por el tiempo, apoyo y espacio brindado para la elaboración de este proyecto.

A la maestra Anita Ochoa, por la capacitación que me brindó en el laboratorio, por sus consejos y tips para uso y manejo del mismo.

A la Dra. Francisca Ramírez y a la M.P. Alejandra Torres, por su contribución en la revisión de este trabajo.

A todos los maestros que tuve a lo largo de la carrera, porque contribuyeron en mi formación profesional. Sobre todo a los maestros del Departamento de Botánica.

A David R. Atilano por ser siempre mi gran amigo, por todo el apoyo y cariño que me ha brindado, por alentarme a seguir adelante y no dejarme 'tirar la toalla', en esos momentos de tristeza y desesperación. Junto con mis babys Walter y Maya.

A mis grandes amigos Felipe, Gustavo y Román, por todas los momentos de diversión, de ilusión y de tristeza que vivimos dentro y fuera de la Narro. Gracias por su amistad verdadera y sincera. Siempre estarán en mi corazón.

A mis hermanos Rosa, Luis, Omar, Gladys, Marbella, Corazón, Diana y Claudia, por su cariño y su apoyo. Gracias por ser mis hermanos.

A mis sobrinos Giovanni, Cristofer, Karen, Jesús, Emiliano, Jean, Luis, Naomi, Britany, Luna y Violeta, por esperar siempre con ansias mi regreso a casa. Los amo a todos.

Dedicatoria

A mis padres la Sra. Flora Reyes y el Sr. Rufino Pacheco.

Nunca encontraré las palabras para poder agradecer a Dios y a la vida por haberme puesto en sus vidas, padres míos.

Gracias por todo el amor y el apoyo siempre incondicional que me han dado durante toda mi vida. Por inculcarme siempre las ganas de salir adelante y decirme siempre que la mejor herencia que podían darme es el estudio.

El camino no ha sido fácil, papi y mami, hemos sacrificado muchas cosas, muchos momentos, pero todo valió y valdrá siempre la enorme pena de haber salido de casa.

Gracias por no cortar mis alas y dejarme volar para encontrar mi propio camino.

Los amo con toda mi alma, con todo mi ser.

Infinitas Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	No. de Pág.
Agradecimientos.....	I
Dedicatoria.....	II
Índice de Contenido.....	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Cuadros.....	VII
Significado de abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
2.1. General.....	3
2.2. Específicos.....	3
III. Hipótesis.....	4
IV. Antecedentes.....	5
4.1 Taxonomía.....	5
4.2 Importancia del cultivo de nopal.....	6
4.3 Generalidades del nopal.....	6
4.4 Caracteres morfológicos y fisiología.....	7
4.5 Composición química del nopal.....	9
4.6 Compuestos fenólicos y flavonoides en nopal.....	11

4.7 Micropropagación de nopal.....	12
4.8 Composición del medio nutritivo.....	15
4.9 Reguladores de crecimiento.....	15
4.9.1 Prohexadiona de calcio.....	16
5 Materiales y Métodos.....	19
5.1. Fase 1-. Establecimiento del cultivo aséptico.....	19
5.2. Fase 2-. Formación de brotes	20
5.3. Fase 3.- Micropropagación de brotes.....	21
5.4. Diseño Experimental.....	24
6 Resultados	25
7 Discusión.....	42
8 Conclusiones.....	49
9 Literatura citada.....	50
10 Anexo.....	63

Índice de Figuras

Figura 1.	Anatomía de <i>Opuntia</i>	8
Figura 2.	Cladodios de las tres variedades de nopal.....	19
Figura 3.	Establecimiento aséptico de nopal en medio MS a mitad de concentración.....	25
Figura 4.	Efecto de BAP en: a) producción de raíces en explantes; b) producción de un brote por areóla.....	26
Figura 5.	Respuesta morfogénica del explante: a) a las 8 semanas de cultivo (3 brotes por explante); b) a las 12 semanas de cultivo (6 brotes por explante).....	26
Figura 6.	Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2=2 en la variedad Copena.....	31
Figura 7.	Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2=2 en la variedad Villanueva.....	31
Figura 8.	Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2 en la variedad Milpa Alta.....	32
Figura 9.	Medias para número de brotes de la variedad Villanueva en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.....	37
Figura 10.	Medias para número de brotes de la variedad Copena en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.....	38
Figura 11.	Medias para número de brotes de la variedad Milpa Alta en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.....	38
Figura 12.	Respuesta morfogénica de la variedad Villanueva en medio PCL2 en las nueve diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).....	39
Figura 13.	Medias para número de brotes de la Variedad Villanueva en las diferentes concentraciones y combinaciones de	

	reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.....	40
Figura 14.	Medias para número de brotes de la Variedad Copena en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.....	41
Figura 15.	Medias para número de brotes de la Variedad Milpa Alta en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.....	41
Figura 16.	Vía de biosíntesis de las principales giberelinas a partir de GGPP en tres etapas y diferentes sitios celulares.....	46

Índice de Cuadros

Cuadro 1.	Descripción taxonómica del nopal.....	5
Cuadro 2.	Componentes químicos del cladodio de nopal.....	10
Cuadro 3.	Tratamientos establecidos para la fase de formación de brotes.....	21
Cuadro 4.	Tratamientos para la etapa de micropropagación.....	22
Cuadro 5.	Análisis de Varianza para número de brotes generados en tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) desarrollándose en 2 medios nutritivos (MS y PCL2) con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).....	27
Cuadro 6.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes obtenidos en tres variedades de nopal Copena, Milpa Alta y Villanueva.....	28
Cuadro 7.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes obtenidos en dos medios nutritivos MS y PCL2.....	28
Cuadro 8.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes obtenidos con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).....	29
Cuadro 9.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) y medios nutritivos (MS y PCL2).....	30
Cuadro 10.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).....	33
Cuadro 11.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes en la interacción entre medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).....	34
Cuadro 12.	Prueba de medias de Tukey $p<0.01$ para número de brotes	

en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva), medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L)..... 35

Significado de abreviaturas

Abreviatura	Significado
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalacético
BAP	6- Bencil Amino Purina
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
KIN	Kinetina
MS	Murashige and Skoog
P-Ca	Prohexadiona de calcio
PCL2	Phillips & Collins
Spp	Subespecie
ZEA	Zeatina

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal optimizar la técnica de propagación *in vitro* de nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. Se utilizaron para la etapa de establecimiento cladodios juveniles de 7-10 cm de longitud. Los explantes primarios fueron obtenidos al seccionar los cladodios en cortes de 1 cm² los cuales contenían una aréola. El medio nutritivo para esta etapa fue MS a mitad de su concentración. Los explantes asépticos fueron subcultivados en medio MS con los siguientes tratamientos: 85 mg/L de Na₂HPO₄, 80 mg/L de adenina, 0.5 mg/ de ácido indol acético, 3 mg/L de BAP y/o 3 mg/L de kinetina. Con los explantes obtenidos en esta etapa se establecieron los tratamientos con cuatro repeticiones, cada repetición estuvo constituida de cuatro explantes de 0.5 cm de longitud. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2x9. El Factor A correspondió las variedades de nopal: Copena, Milpa Alta y Villanueva; el Factor B a medios nutritivos: Murashige and Skoog (MS) y PCL2; el Factor C a reguladores de crecimiento: BAP y Prohexadiona de calcio (P-Ca) a concentraciones de 0.0, 0.5 y 1 mg/L. El número de brotes conformados de cada tratamiento se registró a las 12 semanas de desarrollo. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre variedades, medios de cultivo y reguladores de crecimiento. La mejor respuesta se observó en la variedad de Villanueva y en el medio PCL2 con un número de 13.6 brotes por explante. La interacción de los reguladores BAP y P-Ca favoreció la expresión morfo genética con la producción de brotes en cada aréola presente en el explante.

Palabras clave

P-Ca, *Opuntia ficus-indica*, Villanueva, Copena, Milpa Alta.

Correo electrónico; Flor Cristina Pacheco Reyes, checo_unikoser@hotmail.com

I. INTRODUCCIÓN

El nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) es una planta que pertenece a la familia Cactaceae y se caracteriza por su notable adaptación a climas áridos y semiáridos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es una planta con diferentes aplicaciones, dentro de éstas, destaca el uso medicinal ya que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas, hipocolesteromiantes, antimicrobianas y neuroprotectoras. El tallo del nopal presenta una gran cantidad de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante entre los cuales se incluyen fenólicos, flavonoides, carotenos y vitamina C (Qui *et al.* 2002; Ginestra *et al.* 2009; Bensadón *et al.* 2010; Jeon *et al.* 2011; Santos-Zea *et al.* 2011). Estos compuestos químicos son una fuente importante de moléculas funcionales de importancia como medicamentos (Goossens *et al.* 2003), sin embargo, la producción de éstos en la planta es muy baja (menos de 1%) y depende de la especie, etapa de desarrollo, condiciones de crecimiento y aspectos fisiológicos (Guevara- Figueroa *et al.* 2010).

Por sus múltiples usos su importancia económica ha ido a la alza, en los últimos años las plantaciones se han intensificado en muchos países de África, América, Asia y Europa. En México en 2014 la producción fue de 824,602.36 toneladas. La perspectiva de abrirse a mercados internacionales, representa una posibilidad para incrementar la superficie plantada y la productividad del cultivo (SIAP, 2014). Se han establecido diferentes métodos de propagación, como la vegetativa, apomixis, injerto, microinjerto, pero a pesar de que estas metodologías son fáciles de realizar, sus tasas de propagación son bajas y requieren grandes espacios para

la propagación, por lo que la multiplicación por cultivo de tejidos ha sido señalada como la de mayor potencial, ya que proporciona altas tasas de propagación, menores necesidades de espacio y la producción de plantas sanas y libres de patógenos. Diversos estudios revelan que la micropropagación ha sido ampliamente estudiada y desarrollada con éxito en la clonación de muchas especies de cactus incluyendo nopal (Johnson y Emino, 1979; Smith *et al.* 1991; Estrada *et al.* 2008).

A pesar de la amplia variabilidad del género *Opuntia* existente en México la producción está basada en su mayoría en el cultivar Milpa Alta, por lo que se hace urgente la diversificación y la elección de variedades con diferentes finalidades.

II. OBJETIVOS

2.1. General

Multiplicar *in vitro* tres variedades de nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (Copena, Milpa Alta y Villanueva).

2.2. Específicos

- Evaluar los medios nutritivos MS Y PCL2 en la producción de brotes de tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva).
- Evaluar la concentración y combinación de los reguladores de crecimiento BAP y P-Ca en la producción de brotes de tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva).

III. HIPÓTESIS

Es posible aumentar el número de brotes de tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0, 0.5 y 1.0 mg/L) adicionados a dos medios nutritivos (MS y PCL2).

IV. ANTECEDENTES

4.1. Taxonomía

México es centro de origen del “nopal”, éste se encuentra distribuido en gran parte del país. El género *Opuntia* agrupa una serie de más de 300 especies, entre las cuales más de 100 han sido encontradas en hábitats silvestres en México, 60 de ellas endémicas (Anaya-Pérez, 2001; Feugang *et al.* 2006). El Cuadro 1 muestra la descripción taxonómica del nopal (Bravo, 1978).

Cuadro 1. Descripción taxonómica del nopal.

Reino	Plantae
Subreino	Embryophyta
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledonea
Subclase	Dialipetalas
Orden	Puntiales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Tribu	Opuntiae
Género	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>ficus indica</i> L., Miller.

4.2. Importancia del cultivo de nopal

El vocablo “nopal” proviene del náhuatl “nopalli”, su domesticación comenzó hace unos 8000 años (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991). Es una planta con una amplia gama de usos, dentro de éstos destaca el medicinal ya que contiene polifenoles, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos que pueden llegar a tener actividades biológicamente relevantes; antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas, antimicrobianas y neuroprotectoras (El-Mostafa *et al.* 2014). Por sus diferentes aplicaciones su importancia económica ha ido a la alza, en los últimos años las plantaciones se han intensificado en muchos países de África, América, Asia y Europa, en México en 2013 la producción fue de 824,602.36 toneladas (Lee *et al.* 2005; Mondragón y Pérez, 2013; SAGARPA, SIAP 2014). Siendo el estado de Morelos quien para el año 2014 alcanzó la máxima producción con 328,750.45 Ton, seguido por el Distrito Federal con una producción de 295,940.60 Ton (SIAP, 2014).

4.3. Generalidades del nopal

El nopal tiene una alta adaptabilidad ecológica y puede encontrarse en diversas condiciones climáticas en la República Mexicana, incluso se desarrolla en condiciones de humedad y temperaturas extremas debido a sus características morfológicas y fisiológicas (Stintzing y Carle, 2005).

Algunas especies están presentes por introducción en la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio, en el Sur de África, India, Tailandia y Australia. (Britton y Rose, 1919; Anderson, 2001).

4.4. Caracteres morfológicos y fisiología

Como se observa en la Figura 1, el nopal está formado por un tallo globoso, erecto y/o rastrero, cilíndrico y las ramas son aplanadas, conocidas comúnmente como pencas (Esparza *et al.* 2003). La forma y grosor es variable, así como su color, el mismo que varía del verde claro hasta el gris o ceniza, según la edad de la planta, carece de hojas. El tallo posee una epidermis provista de una cutícula gruesa y cerosa con aréolas espinosas. Tienen un parénquima abundante que posee clorofila para capturar la energía solar y es esponjoso y grueso para almacenar agua y nutrientes de reserva que le permitan soportar largos meses de sequía (Wallace y Gibson, 2002; Sáenz *et al.* 2004; Guzmán y Chávez, 2007). La epidermis tiene tres funciones principales: 1) regular el movimiento del bióxido de carbono hacia el interior y del oxígeno hacia el exterior del cladodio, 2) retener el agua dentro del cladodio, 3) proteger al cladodio del ataque de hongos, bacterias, insectos y plagas (Granados y Castañeda, 2003).

Las raíces del nopal son pivotantes gruesas y sus dimensiones aumentan en relación proporcional al crecimiento de la parte aérea de la planta, llegan a medir hasta 8 metros de largo, mediante éstas se absorbe los nutrientes y el agua del

suelo; las hojas se han transformado en espinas, con lo cual la planta pierde menos humedad (Flores, 2002).

Las flores del nopal brotan a partir de las aréolas que se localizan en el borde apical del cladodio y en los bordes de la parte superior de las pencas de cada aréola puede brotar una flor. (Feugang *et al.* 2006).

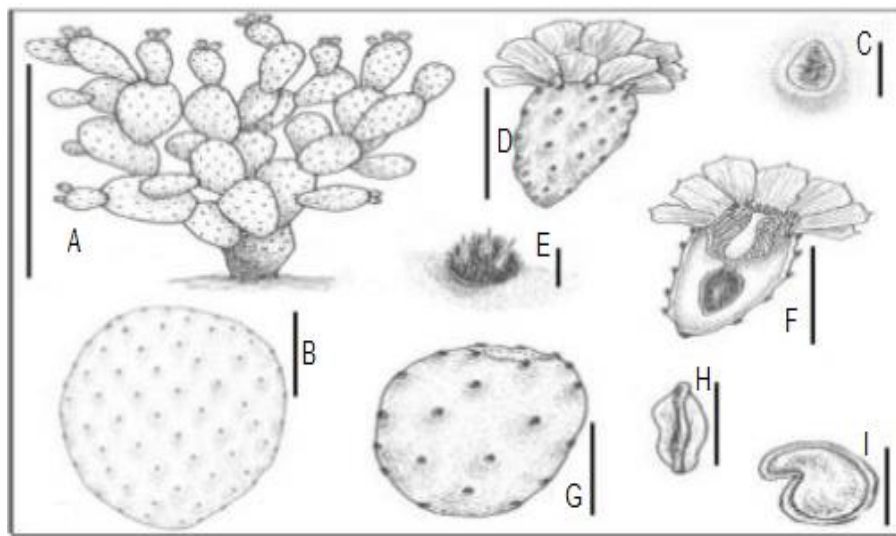


Figura 1. Anatomía de *Opuntia*. A: Hábito, B: Cladodio, C: Areóla de cladodio, D: Flor, E: Areóla de flor, F: Sección longitudinal de flor, G: Fruto, H: Vista dorsal de la semilla, I: Vista lateral de la semilla (Tomada de Flores *et al.* 2005).

Los nopales exhiben el metabolismo CAM, presentan cambios en el contenido de ácido málico durante el día, con valores altos en la mañana y más bajos en la tarde, debido a que este ácido se acumula de noche en las vacuolas y en presencia de luz difunde pasivamente de la vacuola al citoplasma, donde es

descarboxilado por la enzima málica dependiente de NADP⁺ y el CO₂, así ingresa al ciclo de Calvin para la síntesis de carbohidratos (Corrales y Flores, 2003; Taiz y Zeiger, 2006; Osorio *et al.* 2011). La absorción del bióxido de carbono (CO₂) se lleva a cabo durante la noche, aprovechando que sus estomas se encuentran abiertos, el CO₂ tomado se fija inicialmente por la PEP Carboxilasa en el citosol de las células del clorénquima, el malato resultante es transportado a una vacuola central grande. Las vacuolas son cavidades que ocupan, algunas veces, cuando menos el 90% del volumen celular y generalmente contienen agua y pequeñas cantidades de solutos. (Ting, 1985; Nobel, 1988; Nobel, 1994).

La ventaja de este proceso es que el intercambio gaseoso se hace en horas del día en que la temperatura es más baja y el aire tiene mayor humedad; se minimiza la pérdida de agua y las obliga a desarrollar grandes masas de tejido no fotosintético para la acumulación diurna de moléculas con energía y nocturna de ácidos orgánicos, producto de la fijación del bióxido y la acumulación de agua en células (Paredes *et al.* 2006).

4.5. Composición química del nopal

Muchos compuestos fitoquímicos se están estudiando con la finalidad de hacer frente a problemas de salud. Estos compuestos de origen vegetal pueden trabajar como sustratos para reacciones bioquímicas que proporcionan beneficios a la salud. En algunos casos actúan en la absorción y la estabilidad de los nutrientes

esenciales, ejercen efectos benéficos sobre la flora intestinal en humanos (factores de crecimiento, sustratos de fermentación o inhibidores de bacterias intestinales nocivas). Algunos de estos fitoquímicos comprenden terpenos, fenoles, alcaloides y fibra. Investigaciones recientes apoyan el rol benéfico de fitoquímicos contra el cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, presión arterial alta, inflamación, infecciones microbianas y úlceras virales y parasitarias (Dillard y German, 2000).

La composición aproximada en diferentes pencas de cultivares nopal ha sido evaluada por muchos autores y siempre es variable (Cuadro 2). Esto puede ser debido a diferentes condiciones ambientales en el lugar de cultivo, así como a las diferencias estructurales entre cultivares (Angulo y Paredes, 2011)

Cuadro 2. Componentes químicos del cladodio de nopal.

Componente	Peso seco (g/100)	Peso fresco (g/100)
Agua	—	88-95
Carbohidratos	64-71	3-7
Proteínas	4-10	0.5-1
Fibra	18	1-2
Lípidos	1-4	0.2
Potasio	50 mg	166 mg
Calcio	18-57 mg	93 mg
Sodio	—	2 mg
Hierro	50-66 µg/g	1.6 mg

Fuente: Feugan, *et al.* 2006

4.6. **Compuestos fenólicos y flavonoides en nopal**

Los compuestos fenólicos o polifenoles, se definen como aquellos compuestos orgánicos cuya estructura molecular contiene al menos un grupo fenol, el cual consiste en un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo (Del Rio *et al.* 2013). Éstos comprenden una amplia variedad de compuestos, dividida en varias clases tales como ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinnámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, estilbenos y lignanos, que se producen en un gran número de frutos (Feugan *et al.* 2006).

Dentro del género *Opuntia* se han descrito diferentes compuestos fenólicos en muestras de extracto de cladodio seco y molido fueron detectadas isorhamnetina 3-glucósido, isorhamnetina 3- galactósido, quercetina, 3-rhamnosida, miricetina, vitexina y orientina, kaemferol y por primera vez se identificó metil-3-quercetina. (Burret *et al.* 1982; Gupta *et al.* 2002; Stintzing y Carle, 2005).

En otras investigaciones se encontraron nuevas estructuras en orden decreciente: opuntioside, isoharmetina 3-rutinosida, opuntiol, manghaslina, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vaníllico, ácido málico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico (Qiu *et al.* 2002; Qiu *et al.* 2003).

4.7. **Micropropagación de nopal**

La propagación vegetativa de nopal es ampliamente utilizada, se puede realizar a través del enraizamiento de cladodios individuales o múltiples, pequeñas porciones de cladodios maduros que contienen dos o más aréolas o mediante el uso de propágulos como semilla (Estrada *et al.* 2008). Todas estas metodologías requieren grandes espacios para la propagación y presentan una tasa de propagación baja; por lo tanto, la micropropagación es una alternativa factible para la multiplicación rápida y el mantenimiento de germoplasma, ya que proporciona altas tasas de propagación, menor necesidad de espacio y una producción de plantas sanas y libres de patógenos (Johnson y Emino, 1979; Smith *et al.* 1991). Otra ventaja del cultivo *in vitro* es que proveen una fuente de células fisiológicamente uniformes y fácilmente manipulables en las que se puede estudiar el control básico del ciclo, proliferación, crecimiento celular y respuestas fisiológicas y metabólicas ante estímulos bióticos y abióticos (Lee *et al.* 2005). Esta técnica además se usa para la producción a gran escala de metabolitos secundarios, la mayoría de los resultados obtenidos muestran poco éxito debido al bajo rendimiento de los productos deseados, ocasionado por el poco conocimiento de las rutas biosintéticas (Zhong, 2001).

En general las especies de nopal pueden ser propagadas sexual y asexualmente (Boujghagh y Chajja, 2001). La propagación sexual presenta tres problemas principales: la segregación genética, una etapa juvenil larga y el lento crecimiento

de las plántulas en comparación con el material propagado asexualmente (Mohamed, 1995).

El primer estudio sobre micropropagación de *Opuntia* fue informado por Sachar y Lyer (1959), desde entonces se han descrito diferentes estrategias exitosas para diferentes especies, incluyendo: *O. dillenii* Haw, *O. polyacantha*, *O. basilaris*, *O. amyclaea* Tenore, *O. echios* var. *gigantea*, *O. ficus-indica* L. Mill. (Ghaffari *et al.* 2013); sin embargo, un protocolo completo no está disponible todavía, porque la mayoría de las respuestas de las plantas en cultivo de tejidos son altamente dependientes del genotipo y algunas modificaciones y ajustes importantes pueden ser realizados cuando una nueva especie o cultivar se considera para el cultivo de tejidos. Especialmente se pueden optimizar las condiciones ambientales, medios de cultivo, reguladores de crecimiento (tipo, concentración y combinación), etc., durante la etapa de proliferación de brotes (Hartmann *et al.* 1997).

Durante las últimas dos décadas se han descrito diferentes sistemas de propagación *in vitro* para el género *Opuntia* que incluyen: el desarrollo de yemas axilares en *O. amyloaceae* (Escobar *et al.* 1986), propagación a partir de aréolas en *O. ellisiana* Griff (Juárez y Passera, 2002), micropropagación de una variedad ornamental *O. lanigera* Salm-Dyck (Estrada *et al.* 2008). Se ha establecido para *O. ficus-indica* (L.) Mill) la técnica para la regeneración de meristemas apicales y la formación de callo a partir de cotiledones e hipocotilos, además se han transformado genéticamente tres variedades comerciales que se han micropropagado mediante regiones apicales (Llamoca *et al.* 1999; García *et al.* 2005).

En un sistema de propagación el número de brotes es la variable más importante a medir (Clayton *et al.* 1990). *Opuntia* spp. suele tener respuestas morfogénicas distintas en presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, estas respuestas incluyen: la producción de callos, formación de aréolas aisladas acompañadas de diferentes estructuras como: hojas, glóquidas y el desarrollo de nuevos brotes axilares y adventicios (Malda *et al.* 1999).

Diferentes autores demuestran el efecto positivo que tienen los reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Opuntia*.

Escobar *et al.* (1986) reportaron el efecto de BA en *O. amyloacea* en una concentración de 1 mg/L, por otro lado Llamoca-Zárate *et al.* (1999) propusieron .5 mg/L de BA, mientras que Mohamed-Yassen *et al.* (1995) reportaron 2 mg/L como óptimo para la micropropagación de *Opuntia ficus-indica*.

Ghaffari *et al.* (2013), observaron en su investigación que las tasas más altas (3.9) de multiplicación de *Opuntia ficus-indica* es dada en medios que contienen BAP (5 mg/L) y el AIA (0.5 mg/L). El Finti (2012), estudió los efectos de la BA (Bencil adenina), ANA y quinetina, en donde obtuvo 15.25 brotes por explante con BA (1 y 5 mg/L) o en combinación con ANA (0.5 mg/L). Gomes *et al.* (2006), indujeron embriogénesis somática en *O. ficus-indica* adicionando al medio nutritivo diferentes concentraciones de Picloram, la concentración de 4 mg/L indujo 1.33 ápices de brotes por explante.

4.8. **Composición del medio nutritivo**

La composición del medio es uno de los aspectos más importantes de la micropropagación de la planta. El medio de Murashige and Skoog (1962) es el más usado para disparar el crecimiento de yemas axilares. Se ha observado en un gran número de cactáceas que el desarrollo de brotes se obtiene directamente al adicionar al medio de cultivo combinaciones de diferentes nutrientes (George, 1993; Wakhlu y Bhau, 2000).

Clayton *et al.* (1990), mencionan que la principal diferencia entre el medio MS y PCL2 es el contenido de sales y de los siguientes elementos: nitrógeno, potasio, magnesio y calcio principalmente, dichos iones pueden tener un papel fundamental en la nutrición de cactáceas (Anexo).

4.9. **Reguladores de crecimiento**

Los biorreguladores en general actúan modificando el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de su acción sobre vías y procesos fisiológicos y bioquímicos específicos (Jankiewicz, 2003).

En algunos casos se obtienen en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del medio basal sin reguladores de crecimiento, sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio nutritivo

sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o citocininas.

En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas en un tejido, así por ejemplo, auxinas de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir a la formación de raíces y las citocininas a la formación de brotes (Jordán y Casarotto, 2006). Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son 2,4-D, ANA, AIA Y AIB; las citocininas que más se emplean son KIN, BAP y ZEA (Mroginski y Roca, 1991).

4.9.1. **Prohexadiona de calcio**

La Prohexadiona de calcio es un inhibidor del crecimiento de las giberelinas, su acción principal parece ser la 3 β hidroxilación, como consecuencia de ello, su aplicación reduce los niveles de GA1 (altamente activo) y provoca la acumulación de su precursor inmediato, GA20, además también evita el catabolismo de GA1 a GA8 inactivo mediante el bloqueo de la 2 β -hidroxilación. (Brown *et al.* 1997). P-Ca inhibe el crecimiento vegetativo excesivo y puede causar un retraso de la senescencia como resultado de la reducción de la producción de etileno (Rademacher *et al.* 1992). Se ha reportado que P-Ca tiende a aumentar los

niveles de citocininas en tejidos como meristemos apicales y semillas inmaduras (Evans *et al.* 1999).

La Prohexadiona de calcio además aumenta los niveles de flavonoides, favoreciendo la resistencia a patógenos, en *Pyrus communis*, *Rose x hybrida* (Costa *et al.* 2001; Schlangen *et al.* 2003), mientras que en *Physalis ixocarpa* aumenta la actividad enzimática de la catalasa, la cual se relaciona con una mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por factores ambientales (Ramírez *et al.* 2010). Ilias *et al.* (2007) mencionan que P-Ca fue eficaz en la reducción de la elongación del tallo de dos cultivares de okra.

Algunos autores han observado que el número de flores no es afectado por la aplicación de P-Ca en cultivos como el arroz y frambuesa. Esto es debido al hecho de que las giberelinas están asociados con la elongación celular y no a la división celular (Kim *et al.* 2007; Palonen *et al.* 2009).

El conocimiento sobre la influencia de P-Ca en la fisiología vegetal de varios cultivos hortícolas, permite considerar a este retardante de crecimiento como un biorregulador que puede contribuir a controlar el crecimiento vegetativo–reproductivo de varias especies hortícolas (Ramírez *et al.* 2005).

Otra ventaja de este regulador de crecimiento es que lleva bajo potencial de bioacumulación en el medio ambiente y tiene un efecto toxicológico insignificante sobre los mamíferos, por lo tanto, se ha sugerido como una alternativa sobre el daminozide (ácido aminosuccínico) por ser un producto químico fitotóxico.

P-Ca ha sido poco aplicado en cultivo de tejidos, entre los artículos que mencionan el uso de este retardante de crecimiento se encuentra el descrito por García *et al.* (2011) quienes evaluaron la disminución de hiperhidricidad en *Turbinicarpus valdezius*; por otro lado Žiauka y Kuusienė, (2010) evaluaron el crecimiento de *Populus tremula* en tubos de ensayo y cajas petri con diferentes dosis de P-Ca. Sansberro *et al.* (2001) confirmaron que P-Ca inhibe la biosíntesis de giberelinas, lo que se refleja en la disminución del crecimiento longitudinal de los brotes en *Ilex paraguariensis*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales que pertenece al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Material vegetativo

Cladodios juveniles (7-10 cm) de tres variedades de Nopal (Copena VI, Milpa Alta y Villanueva) (Figura 2).



Figura 2. Cladodios de las tres variedades de nopal

5.1. Fase 1-. Establecimiento del cultivo aséptico

Se utilizaron cladodios juveniles (7-10 cm de longitud) de cada variedad para establecer el cultivo aséptico. Los cladodios se desinfectaron con un lavado de jabón líquido comercial sobre la superficie del cladodio y enjuague con agua corriente, posteriormente afuera del cuarto de siembra se mantuvieron en un

recipiente con hipoclorito de sodio al 5% durante una hora, seguido a esto en la campana de flujo laminar se enjuagaron con agua destilada estéril por tres ocasiones, se continuó con inmersión en alcohol al 70% por 1 minuto, se volvió a enjuagar en agua destilada estéril por 1 minuto y nuevamente se colocaron en hipoclorito de sodio al 15% por 15 min, se enjuagaron por tres veces en agua destilada estéril, se cortaron piezas de 1 cm² conteniendo una aréola y se sembraron cuatro explantes en frascos que contenían 20 ml de medio nutritivo MS a mitad de su concentración. El medio se suplementó con 100 mg de myo-inositol, 0.001 mg / L de ácido nicotínico, 0.001 mg /L de piridoxina-HCl, 0.001 mg /L de tiamina-HCl, 0.002 mg /L de glicina más, 30 g /L de sacarosa y 4 g /L de phytigel a un pH de 5.7. El medio se esterilizó a 121°C por 20 minutos. Los frascos se transfirieron al cuarto de incubación a una temperatura de 25 ± 1 °C, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux.

5.2. Fase 2.- Formación de brotes

A manera de pre-tratamientos los explantes fueron trasvasados a las cuatro semanas a medio MS suplementado con 100 mg de myo-inositol, 0.001 mg / L de ácido nicotínico, 0.001 mg /L de piridoxina-HCl, 0.001 mg /L de tiamina-HCl, 0.002 mg /L de glicina, 30 g /L de sacarosa y 4 g /L de phytigel a un pH de 5.7. El medio se esterilizó a 121°C por 20 minutos. Se adicionaron diferentes reguladores de

crecimiento y concentraciones de los mismos para la formación de brotes, los que constituyeron los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos establecidos para la fase de formación de brotes.

Tratamiento	Medio basal	Fosfato dibásico de sodio	Adenina	Ácido indol acético	BAP	Kinetina
1	MS	85 mg/L	80 mg/L	0.5 mg/L	3 mg/L	-
2	MS	85 mg/L	80 mg/L	0.5 mg/L	-	3 mg/L

El cultivo se mantuvo en el cuarto de incubación con temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux. El medio se renovó cada cuatro semanas por cuatro ocasiones.

5.3. Fase 3.- Micropropagación de brotes

Los brotes obtenidos en la fase 2 se utilizaron como fuente de explantes secundarios, se realizaron cortes transversales en segmentos de 0.5 cm de largo, esto dentro de la campana de flujo laminar. Los explantes se cultivaron en medio MS y PCL2 (Phillips and Collins, 1979) con diferentes reguladores de crecimiento y concentraciones de los mismos para la micropropagación de brotes, los que constituyeron los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos para la etapa de micropropagación.

Tratamiento	Variedad	Medio	Reguladores	
			BAP mg/L	P-Ca mg/L
1	Copena	MS	0	0
2	Copena	MS	0.5	0
3	Copena	MS	1	0
4	Copena	MS	0	0.5
5	Copena	MS	0.5	0.5
6	Copena	MS	1	0.5
7	Copena	MS	0	1
8	Copena	MS	0.5	1
9	Copena	MS	1	1
10	Copena	PCL2	0	0
11	Copena	PCL2	0.5	0
12	Copena	PCL2	1	0
13	Copena	PCL2	0	0.5
14	Copena	PCL2	0.5	0.5
15	Copena	PCL2	1	0.5
16	Copena	PCL2	0	1
17	Copena	PCL2	0.5	1
18	Copena	PCL2	1	1
19	Milpa Alta	MS	0	0
20	Milpa Alta	MS	0.5	0
21	Milpa Alta	MS	1	0
22	Milpa Alta	MS	0	0.5
23	Milpa Alta	MS	0.5	0.5
24	Milpa Alta	MS	1	0.5
25	Milpa Alta	MS	0	1
26	Milpa Alta	MS	0.5	1
27	Milpa Alta	MS	1	1
28	Milpa Alta	PCL2	0	0
29	Milpa Alta	PCL2	0.5	0

30	Milpa Alta	PCL2	1	0
31	Milpa Alta	PCL2	0	0.5
32	Milpa Alta	PCL2	0.5	0.5
33	Milpa Alta	PCL2	1	0.5
34	Milpa Alta	PCL2	0	1
35	Milpa Alta	PCL2	0.5	1
36	Milpa Alta	PCL2	1	1
37	Villanueva	MS	0	0
38	Villanueva	MS	0.5	0
39	Villanueva	MS	1	0
40	Villanueva	MS	0	0.5
41	Villanueva	MS	0.5	0.5
42	Villanueva	MS	1	0.5
43	Villanueva	MS	0	1
44	Villanueva	MS	0.5	1
45	Villanueva	MS	1	1
46	Villanueva	PCL2	0	0
47	Villanueva	PCL2	0.5	0
48	Villanueva	PCL2	1	0
49	Villanueva	PCL2	0	0.5
50	Villanueva	PCL2	0.5	0.5
51	Villanueva	PCL2	1	0.5
52	Villanueva	PCL2	0	1
53	Villanueva	PCL2	0.5	1
54	Villanueva	PCL2	1	1

Se establecieron cuatro explantes de 0.5 cm de longitud en cada frasco con cinco repeticiones. Los datos se registraron a las 12 semanas de desarrollo.

5.4. **Diseño experimental**

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2x9. El Factor A correspondió a variedades de nopal: Copena, Milpa Alta y Villanueva; el Factor B a medios nutritivos: Murashige and Skoog (1) y PCL2 (2) y el Factor C a reguladores de crecimiento: BAP y Prohexadiona de calcio (P-Ca) a concentraciones de 0.0, 0.5 y 1 mg/L. Los datos se analizaron con el software Infostat versión 2008.

VI. RESULTADOS

Fase 1.- Establecimiento del cultivo aséptico

La evaluación del material se llevó a cabo a las dos semanas de siembra. Los explantes que no presentaron contaminación se mantuvieron por dos semanas más en el mismo medio y se llevaron a la siguiente etapa (Figura 3).

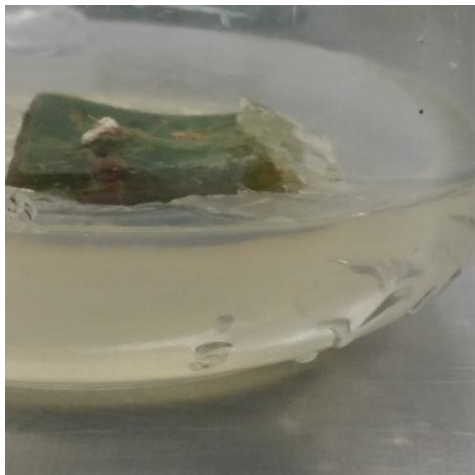


Figura 3. Establecimiento aséptico de nopal en medio MS a mitad de concentración.

Fase 2.- Formación de brotes

Una vez realizado el proceso de asepsia de los cladodios juveniles, el tiempo de cultivo requerido para inducir la formación de brotes en las tres variedades con los distintos pre-tratamientos fue variable. Las primeras respuestas se obtuvieron en la variedad Villanueva a partir de las tres semanas del establecimiento. Los resultados para esta etapa se tomaron de manera cualitativa, lo cual muestra la

comparación entre Kinetina y BAP, en éste último se observó una mejor respuesta de los explantes ya que indujo la aparición de brotes, pero al mismo tiempo se observó otra respuesta morfogénica, la formación de raíces (Figura 4). A las ocho semanas de cultivo se observaron 3 brotes por explante y a las doce semanas cada explante mostraba al menos 6 brotes (Figura 5). La respuesta de la variedad Villanueva se puede atribuir a las características fisiológicas del explante.

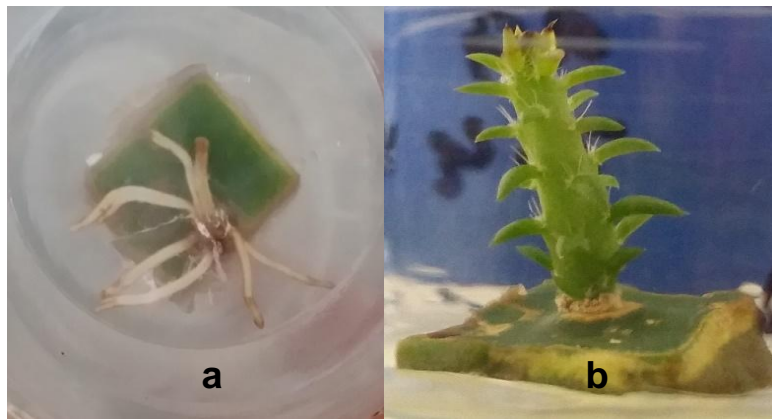


Figura 4. Efecto de BAP en: a) producción de raíces en explantes, b) producción de un brote por aréola.

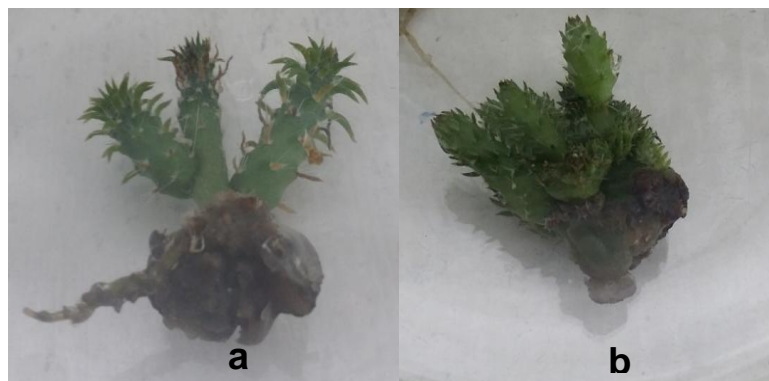


Figura 5. Respuesta morfogénica del explante: a) a las 8 semanas de cultivo (3 brotes por explante), b) a las 12 semanas de cultivo (6 brotes por explante).

Fase 3.- Micropropagación de brotes

El análisis de varianza indica diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$) en los factores evaluados; a) variedades, b) medios de cultivo y c) reguladores de crecimiento, así como también en las interacción entre éstos; Variedades*Medios, Variedades*Reguladores, Medios*reguladores y Variedades*Medios*Reguladores (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de Varianza para número de brotes generados en tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) desarrollándose en 2 medios nutritivos (MS y PCL2) con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3695.06	53	69.72	144.37	<0.0001
Variedad	67.31	2	33.65	69.69	<0.0001
Medio	58.09	1	58.09	120.29	<0.0001
Reguladores	3148.62	8	393.58	814.98	<0.0001
Variedad*Medio	28.68	2	14.34	29.69	<0.0001
Variedad*Reguladores	80.21	16	5.01	10.38	<0.0001
Medio*Reguladores	248.51	8	31.06	64.32	<0.0001
Variedad*Medio*Reguladores	63.65	16	3.98	8.24	<0.0001
Error	104.31	216	0.48		
Total	3799.37	269			

Coefficiente de variación 18.48%

La prueba de medias de Tukey $p < 0.001$ para número de brotes indicó que las variedades de nopal Villanueva y Copena fueron mejores, pero estadísticamente iguales ya que generaron 4.15 y 4.07 brotes por explante respectivamente, mientras que Milpa Alta solo formó 3.06. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes obtenidos en tres variedades de nopal Copena, Milpa Alta y Villanueva.

Variedad	Medias
Villanueva	4.15 A
Copena	4.07 A
Milpa Alta	3.06 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

La prueba de medias de Tukey $p < 0.001$ para evaluar el medio nutritivo, muestra que PCL2 fue mejor respecto a MS con 4.22 brotes y 3.30 respectivamente. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes obtenidos en dos medios nutritivos MS y PCL2.

Medio	Medias
PCL2	4.22 A
MS	3.30 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

Respecto a la comparación entre medias de reguladores, la prueba Tukey $p < 0.001$ muestra que la concentración y combinación de reguladores de crecimiento de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca estadísticamente fue mejor que el resto con una media de 10.3 brotes por explante, seguidas por las de 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de P-Ca con 7.24 brotes y 0.5 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca con 6.88 brotes. Se puede observar un claro efecto sinérgico, ya que los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de ambos reguladores (Cuadro 8).

Cuadro 8. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes obtenidos con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

	Reguladores		Medias	
	BAP	P-Ca		
6	1.0	0.5	10.03	A
9	1.0	1.0	7.24	B
5	0.5	0.5	6.88	B
8	0.5	1.0	4.31	C
3	1.0	0.0	3.21	D
2	0.5	0.0	1.72	E
4	0.0	0.5	0.23	F
7	0.01	1.0	0.13	F
1	0.0	0.0	0.09	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

La prueba de Tukey $p < 0.01$ muestra para la interacción entre variedades y medios que la variedad Copena y la variedad Villanueva en el medio PCL2 estadísticamente fueron mejores al obtener 4.91 y 4.66 brotes respectivamente, mientras que la variedad Milpa Alta presentó los valores más bajos en la producción de brotes (Cuadro 9).

Cuadro 9. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) y medios nutritivos (MS y PCL2).

Variedad	Medio	Medias	
Copena	PCL2	4.91	A
Villanueva	PCL2	4.66	A
Villanueva	MS	3.64	B
Copena	MS	3.23	BC
Milpa Alta	PCL2	3.10	C
Milpa Alta	MS	3.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

Se presentan enseguida los gráficos de las pruebas de medias para número de brotes de las tres variedades de nopal; variedad Copena (Figura 6), variedad Villarreal (Figura 7), y variedad Milpa Alta (Figura 8) en los medios de cultivo MS y PCL2.

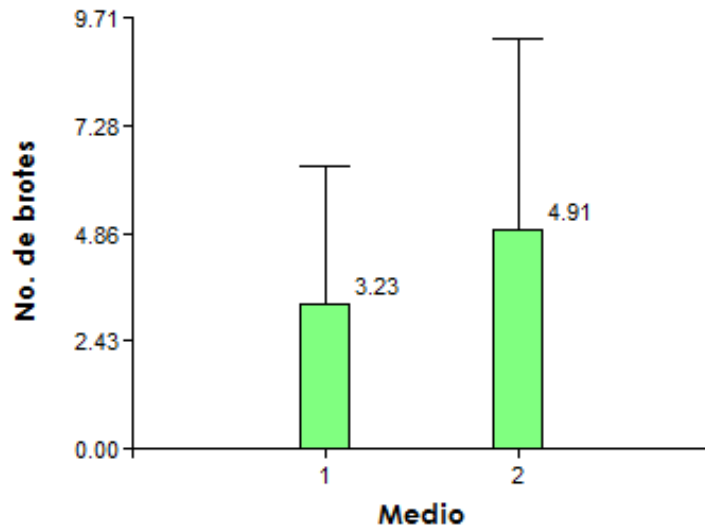


Figura 6. Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2=2 en la variedad Copena.

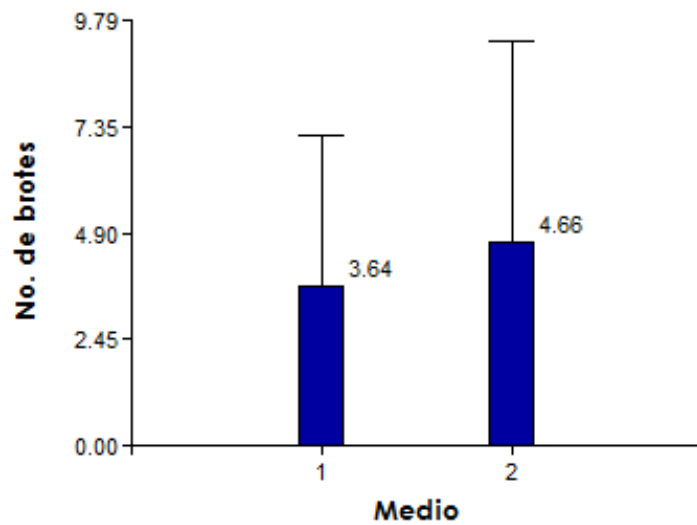


Figura 7. Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2 en la variedad Villanueva.

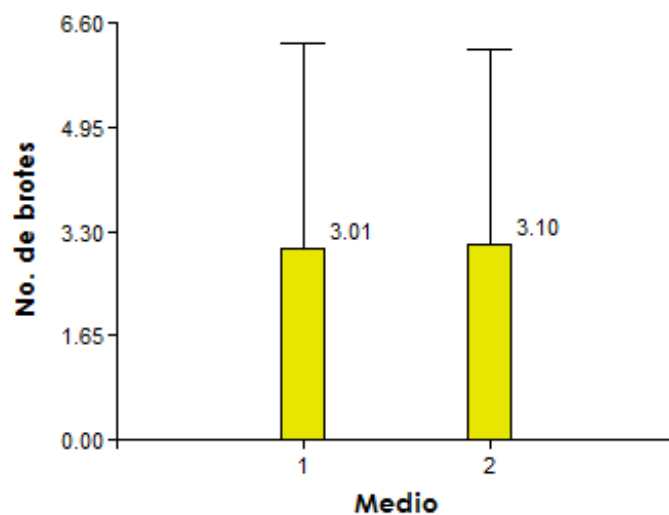


Figura 8. Medias para número de brotes en los medios de cultivo MS=1 y PCL2 en la variedad Milpa Alta.

La prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) muestra que estadísticamente la variedad Villanueva en presencia de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca fue el mejor tratamiento al obtener 11.23 brotes (Cuadro 10).

Cuadro 10. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

Variedad		Reguladores			Medias	
		BAP mg/L	P-Ca mg/L			
3	Villanueva	6	1.0	0.5	11.23	A
1	Copena	6			9.75	B
2	Milpa Alta	6			9.10	BC
3		9	1.0	1.0	8.00	CD
3		5	0.5	0.5	8.00	CD
1		9			7.70	D
1		5			7.30	DE
2		9			6.03	EF
1		8	0.5	1.0	5.78	FG
2		5			5.35	FG
3		8			4.63	GH
3		3	1.0	0	3.50	HI
1		3			3.33	I
2		3			2.80	IJ
2		8			2.53	IJK
1		2	0.5	0	2.28	IJK
2		2			1.60	JKL
3		2			1.28	KLM
3		4	0	0.5	0.45	LM
3		7	0	1.0	0.25	M
1		4			0.22	M
1		1	0	0	0.17	M
1		7			0.12	M
3		1			0.05	M
2		1			0.05	M
2		4			0.02	M
2		7			0.02	M

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) muestra la diferencia significativa del medio PCL2 en combinación con 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca, al obtener una media de 11.83 brotes por explante (Cuadro 11).

Cuadro 11. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

Medio		Reguladores			Medias	
		BAP mg/L	P-Ca mg/L			
2	PCL2	6	1	0.5	11.83	A
1	MS	6			8.22	B
1		9	1	1	7.88	BC
2		5	0.5	0.5	7.03	CD
2		8	0.5	1.0	6.85	D
1		5			6.73	D
2		9			6.60	D
2		3	1.0	0	3.40	E
1		3			3.02	E
1		2	0.5	0	1.78	F
1		8			1.77	F
2		2			1.65	F
2		4	0	0.5	0.33	G
2		7	0	1	0.17	G
2		1	0	0	0.15	G
1		4			0.13	G
1		7			0.10	G
1		1			0.03	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

La prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva), medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) indicó que estadísticamente la variedad Villanueva con 13.6 y Copena con 12 brotes, son mejores que Milpa Alta en donde se obtuvieron 9.9 brotes por explante, el medio PCL2 fue mejor que el MS y la mejor combinación de reguladores fue la de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca. Particularmente la mejor interacción se dio entre la variedad Villanueva en el medio PCL2 y con la combinación de reguladores de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca (Cuadro 12).

Cuadro 12. Prueba de medias de Tukey $p < 0.01$ para número de brotes en la interacción entre variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva), medios nutritivos (MS y PCL2) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

Variedad	Medio	Reguladores		Medias		
		BAP mg/L	P-Ca mg/L			
3 Villanueva	2 PCL2	6	1.0	0.5	13.60	A
1 Copena	2	6			12.00	A
2 Milpa Alta	2	6			9.90	B
1	2	8	0.5	1.0	9.80	BC
3	1 MS	6			8.85	BCD
3	2	5	0.5	0.5	8.70	BCDE
3	1	9	1.0	1.0	8.40	BCDE
2	1	6			8.30	BCDE
1	2	5			7.85	CDEF
1	2	9			7.70	DEF
1	1	9			7.70	DEF
3	2	9			7.60	DEF
2	1	9			7.55	DEF

1	1	6			7.50	DEF
3	1	5			7.30	DEF
3	2	8			7.10	DEF
1	1	5			6.75	EF
2	1	5			6.15	FG
2	2	5			4.55	GH
2	2	9			4.50	GH
2	2	8			3.65	HI
1	2	3	1.0	0	3.65	HI
3	1	3			3.65	HI
3	2	3			3.35	HIJ
2	2	3			3.20	HIJ
1	1	3			3.00	HIJ
1	2	2	0.5	0	2.50	IJKL
2	1	3			2.40	IJKL
3	1	8			2.15	IJKLM
1	1	2			2.05	IJKLMN
3	1	2			2.00	IJKLMNO
2	2	2			1.90	IJKLMNOP
1	1	8			1.75	IJKLMNOP
2	1	8			1.40	JKLMNOP
2	1	2			1.30	KLMNOP
3	2	4			0.70	LMNOP
3	2	2			0.55	LMNOP
1	2	1	0	0	0.30	MNOP
3	2	7	0	1.0	0.30	MNOP
1	2	4	0	0.5	0.25	MNOP
1	1	4			0.20	MNOP
3	1	7			0.20	MNOP
3	1	4			0.20	MNOP
1	2	7			0.15	NOP
1	1	7			0.10	NOP
2	2	1			0.10	NOP
1	1	1			0.05	OP
3	1	1			0.05	OP
2	2	4			0.05	OP
2	2	7			0.05	OP
3	2	1			0.05	OP
2	1	1			0.00	P
2	1	4			0.00	P
2	1	7			0.00	P

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

Los siguientes gráficos corresponden a las medias para número de brotes de las tres variedades de nopal; variedad Villanueva (Figura 9), variedad Copena (Figura 10), y variedad Milpa Alta (Figura 11) en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.

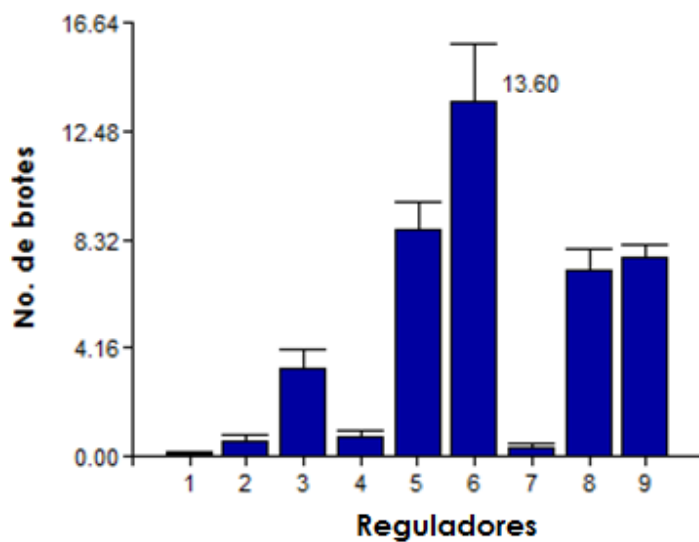


Figura 9. Medias para número de brotes de la variedad Villanueva en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.

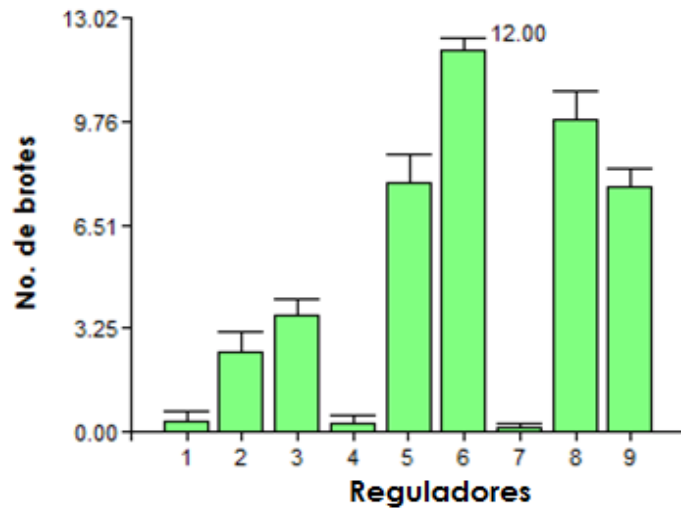


Figura 10. Medias para número de brotes de la variedad Copena en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.

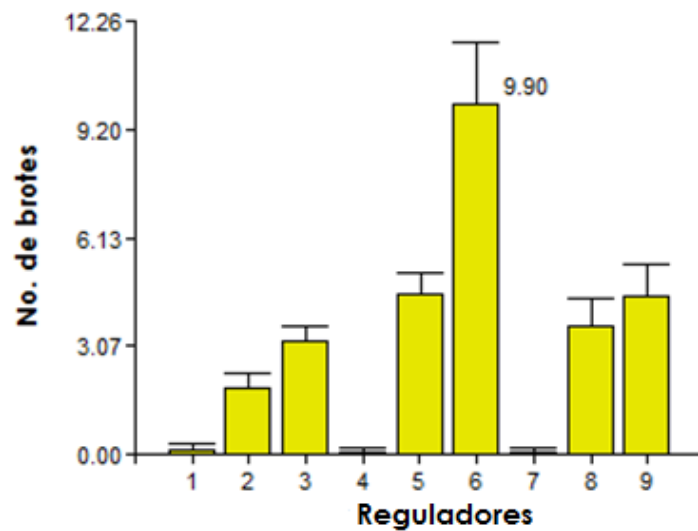


Figura 11. Medias para número de brotes de la variedad Milpa Alta en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio PCL2.

La Figura 12 muestra las diferencias morfológicas generadas en la variedad Villanueva cultivada en medio PCL2 con las nueve concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L). Resalta el T6 como mejor tratamiento.

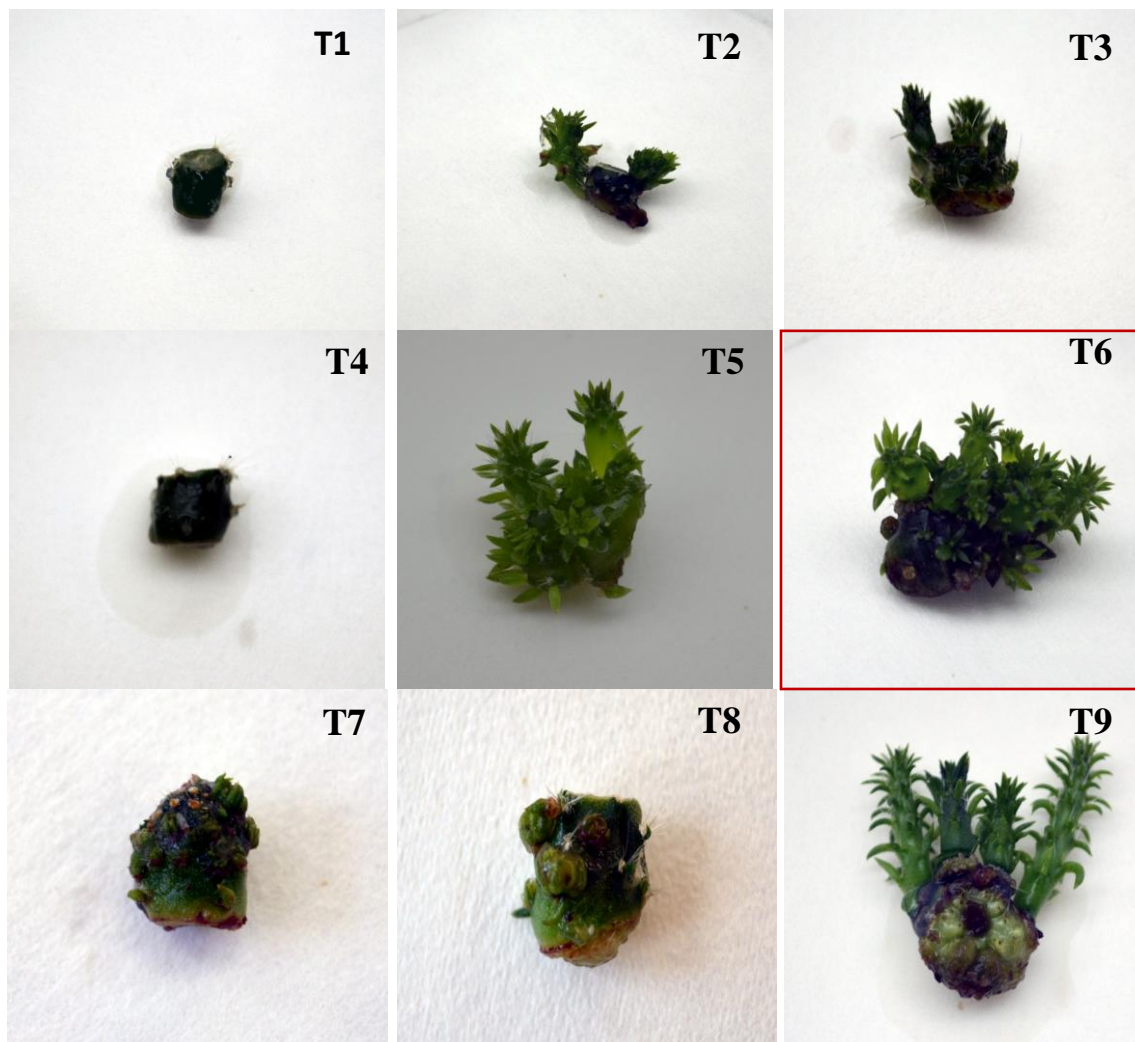


Figura 12. Respuesta morfológica de la variedad Villanueva en medio PCL2 en las nueve diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L).

Los siguientes gráficos corresponden a las medias para número de brotes de las tres variedades de nopal; variedad Villanueva (Figura 13), variedad Copena (Figura 14), y variedad Milpa Alta (Figura 15) en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.

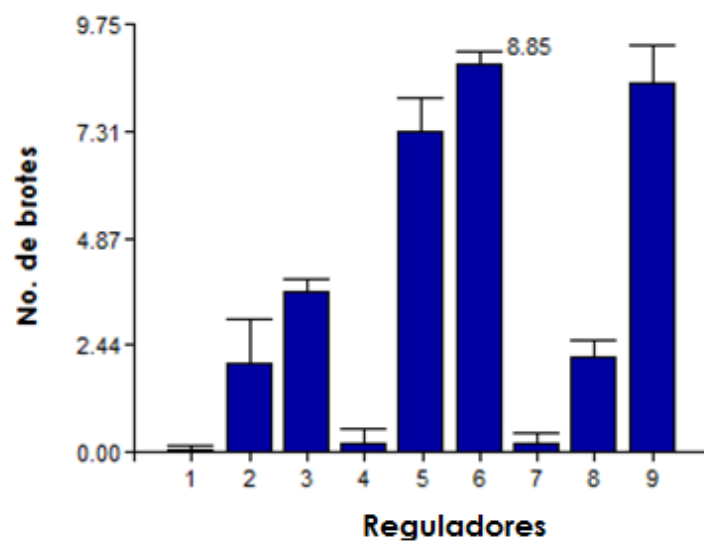


Figura 13. Medias para número de brotes de la Variedad Villanueva en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.

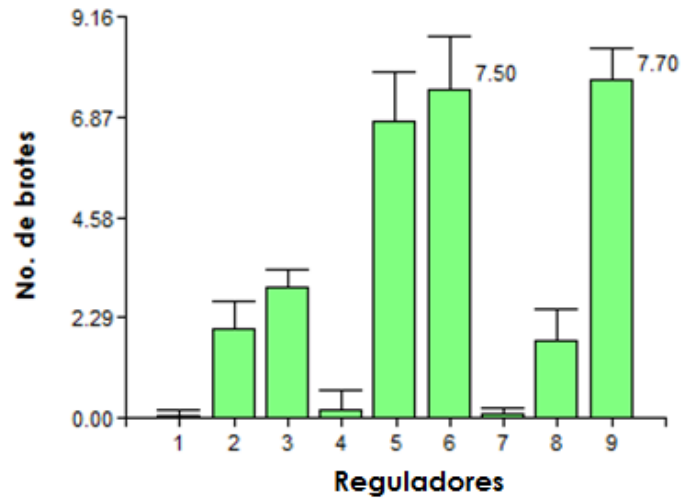


Figura 14. Medias para número de brotes de la Variedad Copena en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.

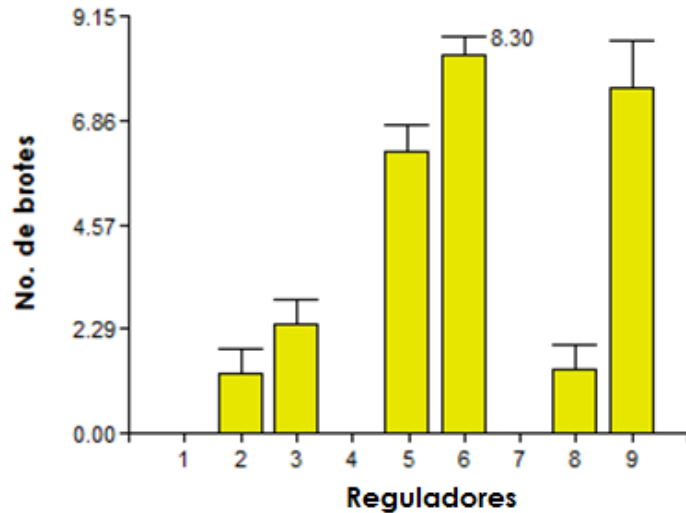


Figura 15. Medias para número de brotes de la Variedad Milpa Alta en las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca (0.0, 0.5 y 1 mg/L) en medio MS.

VII. Discusión

Producción de brotes

Para la etapa de producción de brotes se encontró que la combinación de citocininas, auxina y aminoácidos generó una respuesta morfogénica. Estos resultados pueden ser explicados por la edad fisiológica de los explantes (juvenil), donde la presencia de citocininas endógenas favorece la organogénesis. Al respecto, Alleweldt y Radler, (1962), mencionan que el potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica y características morfogénicas, además, el tipo, concentración y combinación de citocinina y auxina afecta la inducción y proliferación de brotes. Un alto nivel de citocinina contra un bajo nivel de auxina provoca la formación de brotes en tejidos (Skoog y Miller 1965).

Por otro lado, diferentes esfuerzos confirman la importancia de romper el letargo de las yemas axilares en especies de cactus incluyendo el género *Opuntia*, a través de uso de citoquininas solas o en combinación con otros reguladores de crecimiento (Escobar *et al.* 1986; Juárez y Passera, 2002; Yadav *et al.* 2001; Angulo y Paredes, 2011)

La inducción de brotes se atribuye a los múltiples mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento empleados. Por su parte las citoquininas se unen a receptores tipo histidina quinasa que activan a las histidina fosfotransferasas. Estas enzimas transmiten la señal de los receptores a los reguladores nucleares

de respuesta, que pueden activar o reprimir la transcripción de genes que median las acciones fisiológicas de las citoquininas (Müller y Sheen, 2007). Para que las auxinas induzcan el efecto fisiológico estas deben ser transportadas desde el medio de cultivo hasta las células blanco como mencionan Taiz y Zieger, (1998). De allí, deben unirse a receptores externos e internos, los que a la vez inducen la expresión de genes que codifican factores proteicos que aumentan la plasticidad y ablandan la pared celular. Esto tiene como efecto la dilatación de la célula, debido a la presión del agua dentro de su vacuola (presión de turgencia), de este modo continúa agrandándose hasta que la pared opone resistencia. (Bieto y Talón, 2008).

Otro factor importante son los iones de nitrógeno aportados por los aminoácidos ya que un incremento del N (NO_3 o NH_4) provoca un aumento del nivel de citocininas, lo que a su vez conlleva a una regulación positiva de genes que involucrados en respuesta a esta hormona (Urao *et al.* 1998; Jordán y Casaretto 2006).

Micropropagación de brotes

Con los datos obtenidos se demuestra que la composición del medio nutritivo es uno de los aspectos más importantes en la micropropagación de nopal. Generalmente el medio basal más utilizado es MS, como se ha mencionado antes, en este estudio el medio en donde hubo una mejor proliferación de brotes fue en PCL2. Clayton *et al.* (1990) realizaron un estudio en diferentes cactáceas en la cuales probó diferentes medios nutritivo, entre ellos MS y PCL2, en su estudio

demuestra que en cactáceas, por lo general, la mejor manera de estimular el desarrollo de yemas axilares es el uso de los medios nutritivos con un alto (o moderada) concentración de sales. También informa que el medio basal PCL2 fue más efectivo respecto a MS, la diferencia que existe entre estos medios es que PCL2 contiene concentraciones más altas de sales (Co, Cu, Mo, I, PO₄) y tiene una mayor concentración de iones de magnesio y de calcio, lo cual es importante en la nutrición de cactáceas.

El Ca está involucrado en el proceso de señalización para la resistencia a factores bióticos y abióticos (Trewayas y Malbó, 1999), mientras el Mg forma parte esencial en la clorofila y por lo tanto en la fotosíntesis.

Se han publicado diferentes protocolos para la micropropagación de nopal vía organogénesis directa. García *et al.* (2005) estudiaron la capacidad de tres variedades de *Opuntia ficus indica* para formar nuevas yemas axilares, las cuales fueron influenciadas por la concentración de BA; en su investigación las concentraciones más bajas dieron las mejores respuestas para la proliferación y elongación de los brotes, mientras Ghaffari *et al.* (2013), mencionan que las tasas más altas de multiplicación de *Opuntia ficus-indica* son dadas en medios que contienen BAP (5 mg/L) y AIA (0.5 mg/L).

El número de brotes obtenidos en la variedad Villanueva, coinciden con El Finti, (2012) quién obtuvo 13.5 brotes por explante con una combinación de 2.0 mg/L de BA y 0.5 mg/L de ANA. Ghaffari *et al.* (2013) con una concentración de 0.5 mg/L obtienen un máximo de 3.9 brotes por explante en *O. ficus-indica*. Los resultados

obtenidos difieren con Zuñiga (2012) quien reporta 24.5 brotes por explante con una concentración de 0.4 mg/L de BA y un máximo de 53.75 brotes por explante con una concentración de 2.2 mg/L de BA. Por otro lado, García *et al.* (2005), evaluaron 3 variedades de *Opuntia*, entre ellas var. Milpa Alta y var. Villanueva con una concentración de 0.1 mg/L de BA y obtuvieron 4.2 y 13.8 brotes por explante respectivamente, con lo cual se confirma que esta última variedad presenta una mayor capacidad de respuesta.

En relación a la formación de brotes, se observó el efecto sinérgico de la presencia de citocinina (BAP), el inhibidor de las giberelinas (P-Ca) y el rompimiento de la dominancia apical por eliminación de la parte apical del explante.

Por un lado, las citocininas desempeñan un papel importante en muchos de los procesos fisiológicos de las plantas, como la división celular, el desarrollo de cloroplastos, senescencia de hojas y control sobre el crecimiento de brotes. Su síntesis acontece principalmente en las raíces pero también ocurre en meristemos apicales (Heyl y Schmölling, 2003; Jordan y Casaretto, 2006).

Los efectos de la aplicación de P-Ca dio como resultado un incremento en la producción de brote por aréola, esto fue dado probablemente por la acción que ésta causa en la fisiología de los explantes dado que este retardante de crecimiento aumenta la producción de citocininas en meristemos apicales y en altas concentraciones aumenta la división celular y con ello la formación de brotes (Smith y Atkins, 2002; Ramírez *et al.* 2005; Ramírez *et al.* 2008).

La aplicación de Prohexadiona de calcio ha demostrado promover la formación de brotes en diferentes cultivares (Hisamatsu *et al.* 1998; Sansberro *et al.* 2001; Ramírez *et al.* 2005; García *et al.* 2011).

El efecto de P-Ca es la 3 β hidroxilación, y como consecuencia de ello, el reducir los niveles de AG1 (altamente activo), causa una acumulación inmediata del precursor AG20 la cual es inactiva (Rademacher, 1992). Figura 16.

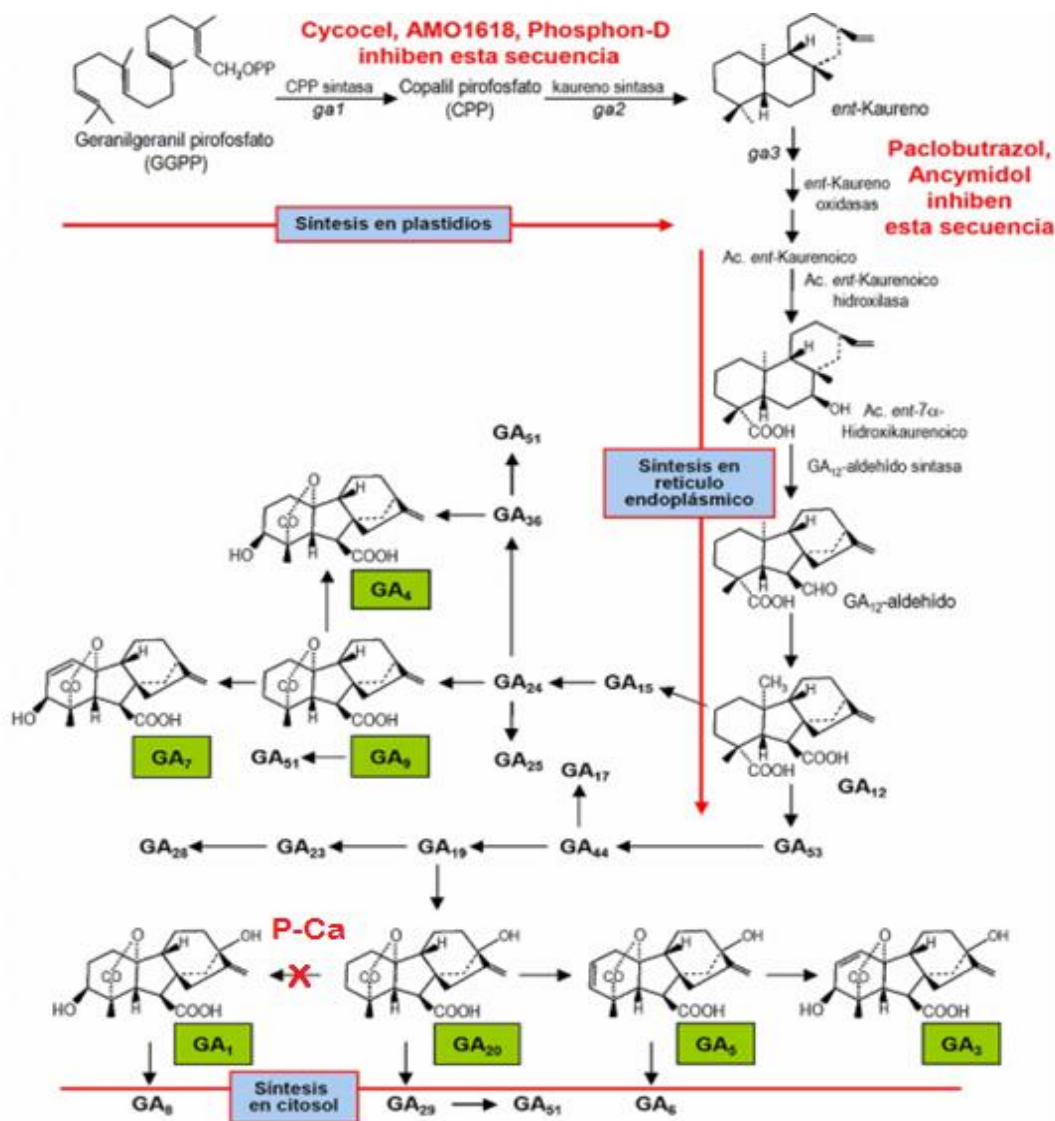


Figura 16. Vía de biosíntesis de las principales giberelinas a partir de GGPP en tres etapas y diferentes sitios celulares. (Jordán y Caseratto, 2003).

Al aplicar un retardante de crecimiento al medio de cultivo, en este caso, P- Ca se impidió el desarrollo del ciclo de síntesis de giberelinas en varios estadios causando reducción en el crecimiento principalmente por inhibición de la división celular a nivel de la región meristemática. Como resultado, las plantas son más cortas y más gruesas (Rademacher, 2000).

En un estudio *in vitro* realizado por Žiauka y Kuusienė, (2010) en *Populus tremula* L. confirman que el uso de P-Ca reduce la elongación de brotes en los tratamientos realizados en tubos de ensaye con explantes que contenían yemas apicales, por el contrario, P-Ca es un fuerte promotor en la elongación de brotes en explantes que no contenían yemas apicales.

Otro aspecto observado es que los brotes provenientes de los tratamientos con P-Ca mostraron un menor tamaño y grosor pero cuando fueron cultivados en un medio libre de reguladores tuvieron un crecimiento equiparable en comparación con los brotes que provenían de los tratamientos con BAP sin combinaciones. Otra característica del cultivo en medio sin reguladores es que se producen raíces sin necesidad de aplicar auxinas.

Un punto más del uso de P-Ca en la propagación es que no se presenta el proceso de vitrificación, lo cual es un proceso comúnmente desarrollado en cactáceas, tampoco se observa callogénesis, lo cual resulta en la obtención de explantes de mejor calidad.

Por último, otro factor influyente fue el rompimiento de la dominancia apical, al eliminarse la parte apical y realizar el corte transversal del explante.

La dominancia apical es el fenómeno fisiológico mediante el cual el ápice principal de crecimiento inhibe o suprime el desarrollo de los meristemas (George, 1993), por lo tanto, las aréolas también tienen ese control fisiológico.

Al respecto, Mohamed-Yassen (2002) confirma la importancia de eliminar la parte apical en cactáceas al realizar un estudio en *Hylocereus undatus*, donde eliminó las partes apicales y obtuvo 8.7 brotes por explante.

VIII. CONCLUSIONES

- Las variedades con mejor respuesta fueron Villanueva con 13.6 brotes generados y Copena con 12 brotes por explante en el medio PCL2 y en presencia de diferentes concentraciones y combinaciones de los reguladores BAP y P-Ca.
- El medio PCL2 fue más efectivo que el medio MS en la producción de brotes de las tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva).
- Los tratamientos con la combinación de ambos reguladores BAP y P-Ca generaron mayor número de brotes. 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca fue el mejor tratamiento, con una media de 10.3 brotes por explante, seguido por el de 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de P-Ca con 7.24 brotes y 0.5 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de P-Ca con 6.88 brotes.
- La presencia de P-Ca evitó la vitrificación e incrementó en la producción y calidad de brotes de las tres variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva).

IX. LITERATURA CITADA

1. Alleweldt, G. y Radler, F. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiology*, 37(3): 376.
2. Anaya-Pérez, M. A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*, 5–12 pp.
3. Anderson, E. F. 2001. The Catus Family. *Timber Press*, Portland, OR, 93–638 pp.
4. Angulo, P. I. y Paredes, O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae*, 128(3): 283-288.
5. Bensadón, S., Hervert, D., Sáyago, S. G. and Goñi I. 2010. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods Human Nutrition* 65: 210-216.
6. Bieto, J. A. and Talon, C. M. 2003. Fundamentos de fisiología vegetal. *McGraw-Hill Interamericana de España*.
7. Boujghagh, M. and Chajia, L. 2001. Le cactus: outil de gestion de la sécheresse dans le sud ouest marocain. *Terre et vie*. 52: 1-7.
8. Bravo, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. Vol. I. 743 pp.

9. Bravo, H. and Sánchez-Mejorada. H. 1991. *Las cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Vol. III. 643 pp.
10. Britton, N. L. and Rose, J. N. 1963. *The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family* (Vol. 3). Courier Corporation.
11. Brown, R. G., H. Kawaide., Yang, Y. Y., Rademacher, W. and Kamiya Y. 1997. Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellin metabolism. *Physiology Plantarum*. 101: 309–313
12. Burret, F., Lebreton, P. H. and Voirin, B. 1982. Les aglycones flavoniques de Cactées: distribution, signification. *Journal of Natural Products*, 45(6): 687-693.
13. Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F. and Phillips, G. C. 1990. Micropropagation of members of the cactaceae subtribe cactinae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 115 (2): 337–343.
14. Corrales–García, J., y Flores–Valdez, C. A. 2003. Nopalitos y tunas: producción, comercialización, poscosecha e industrialización *CIESTAAM-Programa Nopal, Universidad Autónoma de Chapingo. México*. 225 pp.
15. Costa, G., Andreotti, C., Bucchi, F., Sabatini, E., Bazzi, C., Malaguti, S. and Rademacher, W. 2001. Prohexadione-Ca (Apogee®): Growth

- regulation and reduced fire blight incidence in pear. *Horticultural Science*, 36(5): 931-933.
16. Del Rio, D., Rodriguez, M. A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14): 1818-1892.
17. Dillard, C. J. and German, J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12): 1744-1756.
18. Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. 2008. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
19. El-Finti, A., El-Boullani, R., El-Ayadi, F., Abd, N. A. and El-Mousadik, A. 2011. Micropropagation in vitro of *Opuntia ficus-indica* in south of Morocco. *International Journal of Chemical and Biochemical Science* 1: 6–10.
20. El-Mostafa, K., El-Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El-Kebbaj, M. and Cherkaoui-Malki, M. 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9): 14879-14901.

21. Escobar, H. A., Villalobos, V. M. and Villegas, A., 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 7: 269-277.
22. Esparza, F. G., Salas, L. M., Mena, C. J y Valdez, Z. R. 2003. Memorias del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. México.
23. Estrada-Luna, A. A., Martínez-Hernández J. J., Torres-Torres, M. E. and Chablé-Moreno F. 2008. In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to ex vitro conditions. *Scientia Horticulturae*, 117: 378–385.
24. Evans, J. R., Evans, R. R., Regusci, C. L. and Rademacher, W. 1999. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. *Horticultural Science*, 34(7): 1200-1201.
25. Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C. and Zou, C. 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 1(1): 2574-89.
26. Flores Valdez, C. A. 2002. El nopal y la lucha contra la desertificación. *Folleto Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAM*.
27. Flores-Reyes J. L., Reyes, A. J. and Aguirre, R. J. 2005. Variación morfológica de "*Opuntia*" ("Cactaceae") en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 30(8): 476-484.

28. 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 Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(2): 215-219.
29. García-Osuna. H. T., Benavides, M. A., Escobedo, B. L., Villarreal, Q. J. and Cornejo, O. E. 2011. Hyperhydricity control of in vitro shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Möller) G and F. *Phyton*. 175.
30. George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1 (Edition No. 2). The Technology. Exegetics, Limited. England.
31. Ghaffari, A., Hasanloo, T. and Nekouei, M. K. 2013. Micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and effect of medium composition on proliferation and rooting. *International Journal of Biosciences*, 3(11): 129-139.
32. Ginestra G., Parker M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., LoCurto, R. B., Bisignano, G., Faulds, C. and Waldron KW. 2007. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10323–10330.
33. Gomes, F. L., Heredia, F. F., Silva, P. B., Facó, O. and de Paiva F. D. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, 108(1): 15-21.
34. Goossens, A., Häkkinen, S. T., Laakso, I., Seppänen, T., Biondi, S., De Sutter, V. and Oksman, K. M. 2003. A functional genomics approach

- toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8595-8600.
35. Granados, S. D. and Castañeda P, A. 1991. El nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Mexico: *Editorial Trillas* 227 p. ISBN, 1092503908.
36. Guevara-Figueroa, T., Jiménez, I. H., Reyes, E. M., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., De León, A, Fomsgaard, I. S. and Barba de la Rosa, A. 2010. Proximate composition, phenolic acid, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6): 525-532.
37. Gupta, R. S., Sharma, R., Sharma, A., Chaudhury, R., Bhatnager, A. K., Dobhal, M. P. and Sharma, M. C. 2002. Antispermatic effect and chemical investigation of *Opuntia dillenii*. *Pharmaceutical, Biology*, 40(6): 411-415.
38. Guzmán, L. D. y Chávez, J. 2007. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1): 41-45.
39. Hartmann, H. T., Kester D.E., Davies, F. T. and Geneve, R. L. 1997. Instructors Manual for Plant Propagation-Principles and Practices (6th ed). *Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA*. 151 pp.
40. Heyl, A. and Schmölling, T. 2003. Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5): 480-488.

41. Hisamatsu, T., Koshioka, M., Kubota, S., King, R. W. 1998. Effect of gibberellin A₄ and GA biosynthesis inhibitors on growth and flowering of stock [*Matthiola incana* (L.) R. Br.]. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 67: 537–543
42. Ilias, I., Ouzounidou, G., Giannakoula, A. and Papadopoulou, P. 2007. Effects of gibberellic acid and prohexadione-calcium on growth, chlorophyll fluorescence and quality of okra plant. *Biologia Plantarum*, 51(3): 575-578.
43. Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Ediciones Mundi Prensa. 487 pp.
44. Jeon, Y. E., Yin, X. F., Choi, D. and Kang, I. J. 2011. Inhibitory activity of aromadendrin from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) root on aldose reductasa and the Formation of advanced glycation end products. *Food Science Biotechnology*, 20(5): 1283-1288.
45. Johnson, J. L. and Emimo, E. R. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*, 51: 275-277.
46. Jordán, M. and Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Ediciones Universidad de La Serena. Chile. Cap, 15.*
47. Juárez M. A. and Passera. C. B. 2002. In vitro propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. Andacclimatization to field conditions. *Biocell*. 26 (3): 319– 324.

48. Kim, H. Y., Lee, I. J., Hamayun, M., Kim, J. T., Won, J. G., Hwang, I. C. and Kim, K. U. 2007. Effect of prohexadione calcium on growth components and endogenous gibberellins contents of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(6): 445-451.
49. Lee, Y. C., Pyo, Y. H., Ahn, C. K. and Kim, S. H. 2005. Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island. *Journal of Food Science and Nutrition*, 10(1): 103-110.
50. Llamoca-Zárate, R. M., Aguiar, L. F., Landsmann, J. and Campos, F. A. 1999. Whole plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae). *Angewandte Botanik*, 73(34): 83-85.
51. Malda, G., Suzán, H. and Backhaus, R. 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, 81(1): 71-87.
52. Mohamed-Yasseen Y., Barringer S.A., Splittstoesser W.E. and Schnell J., 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42: 117–119.
53. Mohamed-Yasseen, Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38(5): 427-429.
54. Mondragon, J. C. and Perez, G. S. 2003. Estudio FAO. El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje (Vol. 169).

55. Mroginski, L. A. and Roca, W. M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. (Ediciones. Roca, WM and Mroginski, LA). CIAT. Colombia, 19. ISO 690,
56. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
57. Müller, B. and Sheen, J. 2007. Advances in cytokinin signaling. *Science*, 318(5847): 68-69.
58. Nobel, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. *Cambridge University Press: Cambridge*, 270: 37-42.
59. Nobel, P. S. 1994. Remarkable agaves and cacti. *Oxford University Press*. New York, USA
60. Osorio C, J., Pelayo. Z, C., Verde C, J., Ponce V, M., Díaz de León S, F., Bosquez, M. E. and Rodríguez H, M. 2011. Conservación de nopal verdure 'Milpa Alta' (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1): 93-104.
61. Palonen, P., Pehkonen, E. and Rantanen, M. 2008, October. Vegetative Growth, Cropping and Winter Hardiness of Selected Raspberry Cultivars as Affected by ProCa. *Acta Horticulturae*. 838: 99–102.
62. Paredes, O., Lara, F. G. and Pérez, L. A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas (Vol. 212). *Fondo de Cultura*

Económica.

63. Phillips, G. C. and Collins, G. B. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19(1): 59-64.
64. Qiu, Y., Chen, Y., Pei, Y., Matsuda, H. and Yoshikawa, M. 2002. Constituents with Radical Scavenging Effect from *Opuntia dillenii*: Structures of New α - Pyrones and Flavonol Glycoside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50(11): 1507-1510.
65. Qiu, Y. K., Chen, Y. J., Pei, Y. P., Hisashi, M. and Masayuki, Y. 2003. New constituents from the fresh stems of *Opuntia dillenii*. *Journal Of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 12(1): 1-5.
66. Rademacher, W., K.E. Temple. S. D. Griggs, and P. Hedden. 1992. The mode of action of acylcyclohexanediones. A new type of growth retardant, In *Progress in Plant Growth Regulation*. Springer Netherlands. 571-577 pp.
67. Rademacher W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Biology* 51(1): 501-531.
68. Ramírez, H., Peralta, M.R., Benavides, M.A., Sánchez, L.A., Robledo, T.V. y Hernández, D.J. 2005. Efecto de prohexadiona-ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 283-290.

69. Ramírez, H., Herrera, G. B., Méndez, Q. Y., Benavides M. A., Álvarez, M. V., Rancaño, A. J. y Villareal Q, J. 2010. Prohexadiona de calcio disminuye el contenido de giberelinas endógenas en ápices de tomate saladette y chile pimiento. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(2): 193-198.
70. Sachar, R. C. and Lyer, R. D. 1959. Effect of auxin, kinetin and gibberellin on the placental tissue of *Opuntia dillenii* Haw. cultured in vitro. *Phytomorphology*, 9 (1): 1-3.
71. Sáenz, C., Sepúlveda, E. and Matsuhira, B. 2004. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, 57(3): 275-290.
72. Santos-Zea, L., Gutiérrez, U. J. Serna, S. 2011. Comparative Analyses of Total Phenols, Antioxidant Activity, and Flavonol Glycoside Profile of Cladode Flours from Different Varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7054-7061.
73. Sansberro, P. A., Mroginski, L. A. and Bottini, R. 2001. In vitro morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and Prohexadione-Ca. *Plant Growth Regulation*, 34(2): 209-214.
74. Schlangen, K., Gosch, C., Roemmelt, S., Knott, J., Fischer, T. C., Treutter, D. and Halbwirth, H. 2003. Can Prohexadione-Ca induce antimicrobial flavonoids in rose?. *European Journal of Horticultural Science*, 137-143 pp.

75. SIAP. SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA, MÉXICO - © - 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>.
76. Skoog, F. and Miller, C.O. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118–131
77. Smith, P. M. and Atkins, C. A. 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128(3): 793-802.
78. Smith, R. H., Burdick, J. P., Anthony, J. and Reilley, A. A. 1991. In vitro propagation of *Coryphantha macromeris*. *Horticultural Science*. 26(3): 315.
79. Stintzing, F. C. and Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2): 175-194.
80. Taiz, L., and Zeiger, E. 1998. Mineral nutrition. *Plant physiology*, 2, 103-124 pp.
81. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, Massachuset. 623 pp.
82. Trewavas, A. J. and Malhó R. 1998. Ca²⁺ signaling in plant cells: the big network! *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 428-433.
83. Ting, I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1): 595-622.
84. Urao, T., Yakubov, B., Yamaguchi, K. and Shinozaki, K. 1998. Stress-

- responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies*, 427(2): 175-178.
85. Wakhlu, A. K. and Bhau, B. S. 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36(3): 211-214.
86. Wallace, R. S. and Gibson, A. C. 2002. Evolution and systematics. *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley, 1-21 pp.
87. Yadav, N. R., Yadav, R. C., Chowdhury, V. K. and Chowdhury, J. B. 2001. Explant and cultivar response to *in vitro* clonal propagation of female date palm (*Phoenix dactylifera*). *In Proc. 2nd International Conference on Date Palms. Abu Dhabi, Emirates Arab United*. 491-499 pp.
88. Zhong, J. J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures In *Plant Cells*. 1-26 pp. Springer Berlin Heidelberg.
89. Žiauka, J. and Kuusienė, S. 2010. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during *in vitro* culture of aspen (*Populus tremula* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2): 221-228.
90. Zúñiga, R. C. 2012. Micropropagación de varios cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (Cactaceae). *Biblioteca de la Universidad de Guadalajara*. 36 pp.

X. ANEXOS

MEDIO PCL2

Componentes químicos para el medio PCL2

MACRONUTRIENTES	SOLUCIÓN MADRE 10L (G)
NH ₄ NO ₃	10
KNO ₃	21
CaCl ₂ . H ₂ O	6.0
KH ₂ PO ₄	3.25
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	4.35
NaH ₂ PO ₄	0.7391
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.05
H ₃ BO ₃	0.05
KI	0.01
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.004
CoCl ₂	0.001
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.001
SOLUCIÓN DE FIERRO	
Na. EDTA	0.3731
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.25
VITAMINAS	
Myo-inositol	0.250
Ácido nicotínico	0.01
Piridoxina	0.01
Tiamina	0.01

MEDIO MS

Componentes químicos del medio MS

MACRONUTRIENTES	SOLUCIÓN MADRE 10L (g)
NH ₄ NO ₃	16.50
KNO ₃	19.00
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.3322
KH ₂ PO ₄	1.70
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3.70

MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.128
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.086
H ₃ BO ₃	0.0620
KI	0.0083
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.0025
CoCl ₂	0.00025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.00025

SOLUCIÓN DE FIERRO	
Na. EDTA	0.373
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.278

VITAMINAS	
Inositol	1.000
Ácido nicotínico	0.005
Piridoxina	0.005
Tiamina	0.005
Glicina	0.020