

**MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE
Turbinicarpus knuthianus (Boed.) John & Riha
CACTÁCEA ORNAMENTAL DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE**

Eulalia Edith VILLAVICENCIO GUTIÉRREZ, Miguel A. CARRANZA PÉREZ, Sofía COMPARAN SÁNCHEZ y Areli GONZÁLEZ CORTES



Centro de Investigación Regional del Noreste
Campo Experimental Saltillo
Saltillo, Coahuila. Noviembre de 2012
Folleto Técnico MX-0-310602-36-03-15-09-48
ISBN: 978-607-425-924-7



**GOBIERNO
FEDERAL**

SAGARPA

inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

SNICS[®]

SINAREFI
Sistema Nacional de Apoyo Regional
para la Modernización y la Agilización
Agropecuaria



Vivir Mejor

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

Lic. Francisco Javier Mayorga Castañeda
Secretario

M. Sc. Mariano Ruiz-Funes Macedo
Subsecretario de Agricultura

Ing. Ignacio Rivera Rodríguez
Subsecretario de Desarrollo Rural

Ing. Ernesto Fernández Arias
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

M. Sc. Jesús Antonio Berúmen Preciado
Oficial Mayor

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dr. Pedro Brajcich Gallegos
Director General

Dr. Salvador Fernández Rivera
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. Sc. Arturo Cruz Vázquez
Coordinador de Planeación y Desarrollo

Lic. Marcial A. García Morteo
Coordinador de Administración y Sistemas

Centro de Investigación Regional del Noreste

Dr. Sebastián Acosta Núñez
Director Regional

Dr. Jorge Elizondo Barrón
Director de Investigación, Innovación y Vinculación

Dr. Isidro Humberto Almeyda León
Director de Planeación y Desarrollo

Dr. José Luis Cornejo Enciso
Director de Administración

Dr. David Sánchez Aspeytia
Jefe de Operación del Campo Experimental Saltillo

**Micropropagación y producción de
Turbinicarpus knuthianus (Boed.) John &
Riha cactácea ornamental del Desierto
Chihuahuense**

**Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez¹
Miguel A. Carranza Pérez²
Sofía Comparan Sánchez²
Areli González Cortes³**

¹Investigador del Campo Experimental Saltillo

²Profesor-Investigador del Depto. Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

³Integrante de la Red Cactáceas del SINAREFI

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán, C. P. 04010 México D. F. Teléfono (55) 3871-8700

**“Micropropagación y producción de *Turbinicarpus knuthianus*
(Boed.) John & Riha cactácea ornamental del Desierto
Chihuahuense”**

ISBN: 978-607-425-924-7

Clave: INIFAP/CIRNE/F-100
Primera Edición 2012

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación,
ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico,
mecánico, fotocopiado, por registro u otros métodos, sin el permiso previo
y por escrito a la Institución.

INDICE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Planta de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha aclimatada en invernadero del INIFAP-CESAL-CIRNE	2
2	Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de la biznaguita o biznaga cono invertido de Knuth (<i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha	19
3	Germinación <i>in vitro</i> y obtención de plántulas de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha después de 9 semanas de incubación.	21
4	Velocidad de germinación de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha. en diferentes medios de cultivo MBG (T1= 0.6% agar y 87.64 mM de sacarosa; T2= MS 50X; T3= 0.6% agar + 87.64 mM de sacarosa + 8.65 μ M de AG ₃ ; T4= MS 50X+8.65 μ M de AG ₃)	22
5	Brotos obtenidos en la etapa de multiplicación de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha	26
6	Brotos subcultivados en la etapa de multiplicación de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha	28
7	Efecto de <i>Azospirillum</i> sp. en el proceso rizogénico de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha. Invernadero del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP	31
8	Esquema de la micropropagación de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha 1983	33

INDICE CUADROS

Cuadro		Pag.
1	Clasificación taxonómica de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha	5
2	Consideraciones del sistema de micropropagación	8
3	Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP	16
4	Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas <i>in vitro</i> de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha	17
5	Influencia de las citocininas en el número (NB) y altura (AB) de brotes de <i>T. knuthianus</i> en laboratorio	24
6	Tasa de multiplicación de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha.	25
7	Requerimientos de biofertilizante durante la aclimatación de plántulas de <i>T. knuthianus</i> (Boed.) John & Riha.	29
8	Comparación de medias de los tratamientos evaluados en el enraizamiento y aclimatación de <i>T. knuthianus</i> . (Boed.) John & Riha	30

CONTENIDO

Introducción	1
Características de las cactáceas	3
Características del género <i>Turbinicarpus</i>	4
Descripción morfológica de <i>Turbinicarpus knuthianus</i> (Boed.) John & Riha 1983	5
Nombre Común:	5
Antecedentes del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	6
Propagación clonal de plantas por CTV	6
Métodos usados en la micropropagación de las especies vegetales.....	7
Ventajas y desventajas de la micropropagación.....	7
Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales	9
Etapa 1. Establecimiento del inoculo en un cultivo aséptico	9
Semillas como fuente de inóculo	10
Etapa 2. Multiplicación.....	10
Etapa 3. Enraizamiento	11
Etapa 4. Aclimatación.....	11
Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) en cactáceas.....	12
Protocolo para la micropropagación de la “biznaguita” o “biznaga cono invertido de knuth”	15
Etapa 1. Establecimiento del inoculo en cultivo aséptico	15
Medio de Cultivo para la germinación(MBG) <i>in vitro</i> de <i>T.</i> <i>knuthianus</i>	16
Procedimiento para la elaboración del MBG.....	17
Preparación del MBG	18
Vida del medio.	20
Porcentaje de germinación (PG).....	20
Velocidad de emergencia (VG)	21
Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes (MIB)	23
Inducción de Brotes (IB)	24
Altura de brotes (A).....	25
Etapa 3 Elongación de brotes	28
Etapa 4 Enraizamiento <i>in vivo</i> y aclimatación	28
Preparación de la concentración	29
Número de raíces (NR)	29
Longitud de raíces (LR).....	30
Sobrevivencia.....	32
Conclusiones.....	34
Literatura citada	34

Micropropagación y producción de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactácea ornamental del Desierto Chihuahuense

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez¹
Miguel A. Carranza Pérez²
Sofía Comparan Sánchez²
Areli González Cortes³

Introducción

México es el centro de diversificación de cactáceas más importante del Continente Americano, con un elevado índice de endemismos. La parte sureste del Desierto Chihuahuense, conformada por los estados de Coahuila, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León México, es donde existe el mayor número de cactáceas con algún grado de amenaza de extinción (Guzmán *et al.*, 2007 Arredondo *et al.*, 2009; Guzmán *et al.*, 2007).

Una de las especies que se distribuyen en esta área semidesértica es el *Turbinicarpus knuthianus*, una cactácea que por su morfología y aspecto es apreciada por coleccionistas expertos y/o aficionados nacionales y extranjeros, quienes la utilizan como planta de ornato.

Las poblaciones naturales de esta especie presentan un alto grado de deterioro, originado por el crecimiento de las zonas urbanas, industriales, agrícolas y ganaderas. El crecimiento acelerado de estas actividades ha originado un efecto negativo en la supervivencia de la especie *T. knuthianus* considerada como endémica y sujeta a protección especial (Pr), por lo que se ha hecho necesario propiciar su recuperación y conservación *ex situ*. El estatus de riesgo en el que se encuentran las poblaciones naturales de esta especie se ha establecido acuerdo a la Norma Oficial Mexicana que determina el estatus de la flora y fauna nativas del territorio nacional (NOM-059-SEMARNAT, 2010), (SEMARNAT, 2010) (Figura 1).

¹M. C. Investigadora del Programa Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales. Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

²Biol. Profesor-Investigador del Depto. Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

³M.C. Integrante de la Red Cactáceas del SINAREFI.



Figura 1. Planta de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha aclimatada en invernadero del INIFAP-CESAL-CIRNE.

La conservación *ex situ* se basa en el mantenimiento de accesiones viables de especies amenazadas, asegurando a largo plazo la propagación de especies raras y en peligro de extinción. Entre las diferentes modalidades de conservación *ex situ* están los bancos de germoplasma (semillas ó *in vitro*) y colecciones de plantas en campo, viveros o jardines botánicos. Los bancos de germoplasma constituyen uno de los métodos más convenientes para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica. Para el caso de especies en estatus de riesgo como *T. knuthianus* que se caracterizan por presentar poblaciones naturales escasas, es necesario implementar métodos de conservación *ex situ*, en donde se apliquen las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) con el propósito de multiplicar este recurso fitogenético.

En esta publicación se describe el proceso de micropropagación desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, para la conservación de la "biznaguita" o "biznaga cono invertido de Knuth" como comúnmente se le llama a esta especie, el cual fue generado de acuerdo con las etapas señaladas por Murashige (1974), Fay y Gratton (1992) y posteriormente

revisadas por Debergh y Maene (1981) y Giusti *et al.*, (2002) abarcando, las cuatro etapas del proceso de cultivo de tejidos vegetales.

Características de las cactáceas

La palabra cactus proviene del griego káktos que se utilizaba para nombrar a una planta espinosa parecida al cardo del sur de Europa y norte de África (Nobel, 1998; Hunt, 2006). Las plantas de la familia Cactaceae son dicotiledóneas adaptadas para sobrevivir en climas áridos, debido a que tienen una cutícula rica en ceras que les sirve para prevenir la pérdida de agua y sus hojas han sido reducidas a espinas (Newland *et al.*, 1980; Montaña *et al.*, 1993; Hernández y Godínez, 1994).

La familia de los cactus ha evolucionado hacia una multitud de formas, alejándose de la imagen clásica del vegetal para convertirse en “piedras”, “bolas” o “cirios”. Estas curiosas plantas pueden ser definidas de manera sencilla. Un cactus es una planta que ha evolucionado con el fin de poder, de un modo u otro, resistir ciertas condiciones de sequía. Esto se ha traducido en la desaparición de sus hojas y en la transformación del tallo, el cual es un órgano de almacenamiento de agua y de asimilación de clorofila. De esta forma, las cactáceas pueden permanecer fuera del suelo durante un largo periodo sin morir. Estas especies presentan un tallo carnoso que puede crecer en forma de órgano, globular, cilíndrico, candelabro y arbustivo, el cual funciona como elaborador de carbohidratos primarios siguiendo la ruta fotosintética del metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) (Anderson, 2001; Villavicencio *et al.*, 2010). En él se distribuyen meristemas laterales frecuentemente latentes compuestos por dos yemas, que producen espinas y otros que producen brotes axilares o yemas florales (Seeni y Gnanam, 1980; Hubstenberger *et al.*, 1992; Montaña *et al.*, 1993). Estas yemas están contenidas en las areolas y/o mamilas, una estructura única en las cactáceas que se distribuyen en algunas especies como *Mammillaria* sp. (Ordoñez, 2003), a lo largo de las costillas en *Astrophytum* sp. (Trinidad, 2005), o en las yemas presentes en los tubérculos como en *Leuchtenbergia* sp. (Starling, 1985; Hunt, 2006).

Esta estructura proporciona micro-ambientes de sombra y humedad al tallo, sus tejidos internos sirven de almacenaje de agua, éstos se contraen y expanden en función de la disponibilidad de agua (Mauseth, 2000).

Todas estas características reflejan una especialización general al hábitat de las zonas áridas y semi-áridas, que las ha llevado a tener transformaciones en respuesta a los cambios ambientales como aumento de temperatura y disminución en la disponibilidad de agua. Es bastante difícil precisar la edad de las cactáceas, ya que, contrariamente a los árboles, estas plantas no forman anillos concéntricos anuales. En *Echinocactus grusonii* existen ejemplares con más de 250 años, en comparación por su tamaño existen ejemplares de *Echinocactus ingens* que podría pensarse que son milenarios; sin embargo, esto no es así, su crecimiento depende de las condiciones climáticas, una misma planta puede no crecer ni un centímetro en diez años y después ganar diez en unos meses (López *et al.*, 2008).

Características del género *Turbinicarpus*

Su nombre se origina del latín *turbinatus*, que significa trompo y del griego *Karpós*, haciendo referencia a la forma general que presentan estas plantas. Este género se ha relacionado estrechamente con los géneros *Neolloydia* y *Thelocactus*, e incluso se ha llegado a proponer que estas especies no son más que formas juveniles de *Neolloydia* con la capacidad de florecer y fructificar a una edad temprana. Esta idea no ha sido aceptada del todo por los estudiosos de las cactáceas y se ha decidió mantener este género independiente con 24 especies y un híbrido natural (Britton y Rose, 1963; Hunt, 2006).

Existen unas 24 especies de este género que se distribuyen desde el suroeste de Estados Unidos hasta el noroeste de México (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991; Hunt, 2006).

Descripción morfológica de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha 1983

Plantas pequeñas de 6 cm de diámetro, solitarias o en grupo. **Tallos** de forma esféricos, color verde oscuro. **Espinas** agrupadas en aréolas. Costillas divididas completamente en tubérculos de forma cónica con 9 mm de largo; presenta pubescencia blanca en la parte apical; de 18 a 20 espinas radiales blancas con 8 mm de longitud, lisas, rígidas, puntiagudas, extendidas horizontalmente; una sola espina central de 10 mm de largo. **Flores** muy numerosas de 25 mm de longitud y de ancho; pétalos oblongos, escasamente puntiagudos, de color carmín rosado brillante a carmín rojo. **Fruto** ovalado, de color verde brillante a café (Britton y Rose, 1963; Hunt, 2006).

Su hábitat natural son las zonas áridas. Es una especie rara poco usual en colecciones y en viveros productores de plantas de ornato (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal
CLASE	Magnoliopsida Brongn.
SUBCLASE	Caryophyllidae Takht.
ORDEN	Caryophyllales Benth. & Hook. f.
FAMILIA	CACTACEAE Juss.
GENERO	<i>Turbinicarpus</i> Back.
ESPECIE	<i>knuthianus</i> (Boed.) John & Riha

Sinónimos

Turbinicarpus saueri subsp. *knuthianus* (Boed.) Luthy, 2001.

Echinocactus knuthianus Boed., 1930

Neolloydia knuthiana (Boed.) F.M. Knuth in Backed., 1935.

Thelocactus knuthianus (Boed.) Borg, 1937.

Gymnocactus knuthianus (Boed.) Backeb., 1961.

Pediocactus knuthianus (Boed.) Halda, 1998.

Nombre Común: “Biznaguita” y “biznaga de cono invertido de knuth”.

Antecedentes del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El término de CTV se usa para describir diferentes técnicas de cultivo de células, tejidos u órganos en un medio nutritivo en condiciones asépticas y con la capacidad de generar individuos completos, los cuales se pueden desarrollar hasta la madurez. Las diferentes técnicas de CTV se han empleado para el estudio y propagación de una gran variedad de especies y en las últimas dos décadas el CTV ha demostrado su gran utilidad para propagar especies en peligro de extinción como la especie *T. knuthianus*, ya que ofrece la posibilidad de producir plantas a tasas más altas que las que se obtienen mediante procedimientos tradicionales de cultivo (Mata *et al.*, 2006). Las técnicas de micropropagación ofrecen una alternativa para la conservación de los recursos genéticos y rescate de especies como este tipo de cactus con valor agregado que puede aplicarse bajo el esquema de laboratorio-invernadero (Mata *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2003).

El CTV *in vitro* o micropropagación se basa en el concepto de totipotencialidad de las células vegetales, es decir, a partir de diferentes explantes es posible desarrollar plantas normales y completas (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). Al respecto, Johnson y Emino (1979), Hubstenberger *et al.*, (1992) y Giusti *et al.*, (2002) propusieron la propagación clonal a través de la micropropagación, como una vía factible para las cactáceas, con la cual es posible contribuir al rescate y conservación de este recurso fitogenético. Este es un sistema en el que se utilizan como explantes tejidos u órganos que se toman de una o más plantas donadoras, las cuales tienen meristemos preexistentes y a partir de estos se pueden generar uno o más brotes (Murashige, 1974; Villalobos y Thorpe, 1985; Pierik, 1987).

Propagación clonal de plantas por CTV

El principio de la propagación clonal en plantas se basa en que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo si se le proporcionan las condiciones medio ambientales adecuadas, utilizando principalmente medios nutritivos de composición

definida en recipientes de vidrio o envases de polipropileno en condiciones asépticas en todas las etapas de propagación.

Estas condiciones han sido agrupadas de la forma siguiente:

- a) Condiciones químicas o del medio de cultivo: compuestos inorgánicos como macro-nutrientes y micronutrientes; compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos reguladores del crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico (agar).
- b) Condiciones físicas: temperatura, iluminación, humedad relativa y gases atmosféricos.

Métodos usados en la micropropagación de las especies vegetales

- a) Obtención de embriones somáticos a partir de callos o células en suspensión.
- b) Obtención de brotes adventicios a partir de callos o células en suspensión, para su posterior enraizamiento.
- c) Formación de brotes adventicios directamente de tejido somático, sin pasar por la etapa de callo. Los brotes son posteriormente enraizados.
- d) Inducción de brotes a partir de ápices o yemas axilares, para su posterior enraizamiento.

Generalmente, un medio que contenga altos niveles de auxinas inducirá la formación de callos. También la combinación de auxinas y citocininas puede promover la formación de callos, pero si se reduce la concentración de auxinas y se incrementa la concentración de citocininas se induce la formación de brotes (Dixon, 1985; Villavicencio *et al.*, 2006).

Ventajas y desventajas de la micropropagación

La aplicación de la micropropagación tiene ventajas sobre los sistemas convencionales de propagación; sin embargo, es importante mencionar que estas ventajas dependen fuertemente de la infraestructura con que se cuente, del valor agregado que tenga en el mercado la especie que desea propagar, el nivel de producción que pretenda generarse y de

factores inherentes al método, como la condición fitosanitaria de las plantas donadoras de inóculos o explantes (presencia de alguna enfermedad), la edad fisiológica (juvenil, maduro), deficiencias nutricionales, tamaño y tipo de tejido seleccionado como explante, los constituyentes del medio de cultivo, las condiciones de incubación, la interacción entre factores fisicoquímicos y eficiencia en el número de brotes generados/explante (Escobar, 1985; Villalobos y Thorpe, 1985).

De este modo la micropropagación (cultivo de órganos o tejidos) se ha convertido en una opción para multiplicar rápidamente variedades o especies que cuentan con pocos individuos o que tienen dificultades para propagarse por métodos convencionales.

Con la aplicación de esta técnica se puede obtener un mayor control fitosanitario, generar plantas libres de virus (cultivo de meristemos) y acelerar el mejoramiento genético proliferando en corto tiempo genotipos sobresalientes.

Villalobos y Thorpe (1985) y Sagawa y Kunisaki (1990), señalan algunas ventajas del cultivo de tejidos con respecto a otros sistemas de propagación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Consideraciones del sistema de micropropagación.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Con una pequeña cantidad de tejido, que constituye un explante inóculo, potencialmente se pueden regenerar millones de plantas. El explante es un fragmento de la planta que es establecido <i>in vitro</i> .	La micropropagación requiere técnicas avanzadas e instalaciones y equipo especializados.
Esta técnica permite multiplicar especies con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales.	Se requiere desarrollar métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie.
El número de plantas del genotipo de interés puede incrementarse rápidamente y en un tiempo más corto que la propagación convencional.	Las plántulas inicialmente son muy pequeñas.

(cont...)

Cuadro 2. Consideraciones del sistema de micropropagación.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Los niveles de nutrientes, luz, temperatura y otros factores pueden ser fácilmente controlados para acelerar la multiplicación vegetativa y regeneración.	Para que sea factible su aplicación se requiere que la propagación <i>in vitro</i> del genotipo de interés sea rápida, más eficiente y menos costosa que la propagación convencional o comercial que se tenga registrada, destacando sus diferencias en cuanto a su volumen de producción, calidad y uniformidad.
Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajo costo y en tiempos económicamente costeados.	
Se puede controlar la sanidad del material propagado.	
Los materiales se pueden transportar bajo las condiciones <i>in vitro</i> a otros países con menos restricciones.	

Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales

Etapa 1. Establecimiento del inóculo en un cultivo aséptico

El propósito de esta etapa es establecer *in vitro* un explante estéril en un medio de cultivo aséptico. Es la etapa más crítica y de gran importancia en el proceso de regeneración, porque interactúan diferentes factores que determinan su éxito, como la contaminación endógena o exógena causada por bacterias y hongos (Hubstenberger *et al.*, 1992; Papafotiou *et al.*, 2001). Este efecto puede evitarse si se realiza una buena desinfección en la que se involucran diferentes tipos y concentraciones de agentes desinfectantes, los cuales no deben ser tóxicos, ya que estos pueden inhibir la germinación o, la brotación de yemas. El protocolo de desinfección es muy importante, ya que de él depende el establecimiento *in vitro* del explante.

El tiempo de inmersión utilizado, así como la concentración de hipoclorito de sodio, etanol y el uso de agua destilada estéril favorecen el proceso de desinfección de estas semillas, por lo que ambos factores tienen que considerarse en este proceso, como también han sido referidos por Mauseth (1979), Hernández y Godínez (1994) y Villegas (1996).

Semillas como fuente de inóculo.- Preferentemente se utilizan semillas de cosecha reciente. Estructuralmente las semillas de la familia cactáceae están formadas por un embrión, material de reserva y tejidos de protección. Estos tegumentos forman una cubierta cerosa protectora llamada testa que es impermeable al paso del agua. Como ocurre con todas las especies de propagación sexual, la germinación de cactáceas consiste en la reanudación del crecimiento del embrión, el cual ha permanecido en estado latente (Araya *et al.*, 2000; De La Rosa *et al.*, 1994; Hernández y Godínez, 1994 y Ordoñez, 2003).

Etapa 2. Multiplicación

En esta etapa se promueve la inducción de brotes, misma que puede presentarse por tres diferentes vías: a partir de yemas axilares, organogénesis, que consiste en la formación de órganos como raíces, areolas, tallos y por embriogénesis somática a partir de células somáticas, que forman estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical aislado por un tejido epidérmico que no tiene conexión vascular con el tejido materno (Jiménez, 1998). Para la organogénesis directa en cactáceas se pueden utilizar como explantes yemas axilares que están contenidas en las areolas o mamilas que se encuentran distribuidas en los tubérculos o costillas de la planta madre (Vyskot y Jara, 1984; Escobar, 1985; Puente y Bashan, 1993; Yassen *et al.*, 1995, Clayton *et al.*, 1990 y Villavicencio *et al.*, 2009).

Esta ruta morfogénicas puede utilizarse en la especie de *T. knuthianus* porque presenta yemas axilares, que pueden activarse y generar brotes.

La organogénesis y embriogénesis somática se puede dar de forma directa, cuando las estructuras se generan sobre el explante inicial o de forma indirecta cuando la formación de los órganos se da por la desorganización del explante en un tejido denominado callo. El callo, este se caracteriza porque presenta una división celular continua y forma un agregado irregular de células, que posteriormente es capaz de reorganizarse y formar los órganos.

Todos los eventos que se suscitan durante la etapa de callo, formación de diferentes órganos y/o embriones se denominan respuestas morfológicas, las cuales se expresan por la presencia de las hormonas endógenas del explante y de fitoreguladores adicionados al medio de cultivo. Las que más se emplean dentro del CTV son las citocininas, solas o en combinación con las auxinas en diferentes concentraciones (López *et al.*, 2008).

Etapa 3. Enraizamiento

Los brotes obtenidos se individualizan y subcultivan en un medio de cultivo fresco para promover su elongación y posteriormente el desarrollo de raíces (enraizamiento), el cual puede llevarse a cabo en ausencia o en presencia de fitohormonas como las auxinas (George y Sherrington, 1984). Para el enraizamiento *in vitro* se puede emplear el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) completo o al 50% de sus componentes, para que las nuevas vitroplantas generen su sistema radicular y posteriormente pueden aclimatarse en invernadero.

Esta etapa es importante y es parte del proceso denominado aclimatación que consiste en "obligar a las vitroplantas ", a pasar de su condición heterótrofa a una condición autótrofa. Esto se logra modificando el contenido de sacarosa o reduciendo las sales en el medio de cultivo para que las vitroplantas activen su aparato fotosintético y puedan adaptarse a las condiciones *ex vitro* cuando se saquen del sus envases. En el caso de los embriones somáticos, estos pueden germinar y continuar su crecimiento; por su naturaleza bipolar no se requiere promover su enraizamiento, sino su maduración para que puedan establecerse como plántulas.

Etapa 4. Aclimatación

Es la transferencia de las plántulas enraizadas a un sustrato previamente esterilizado para que continúen con el proceso de aclimatación en condiciones *ex vitro* en un invernadero. Esta etapa es la más crítica, pues define el éxito del método en cuanto a productividad.

En invernaderos donde se producen plantas ornamentales se utiliza una gran variedad de materiales de tipo orgánico e inorgánico, como

sustratos solos o mezclados que proveen un medio para el crecimiento de la planta como: tezontle fino, "tepojal" (roca volcánica extrusiva de textura vesicular, burbujeada y porosa que guarda el calor), polvillo de coco, perlita, arena, tierra de hoja molida, "peat moss", vermiculita, bagazo de caña de azúcar molido, cascarilla de arroz, arena y aserrín entre otros.

En esta etapa (aclimatación) se puede dar un valor agregado al utilizar un biofertilizante que contenga como ingrediente activo *Azospirillum* sp. que ayude al crecimiento radicular. Este microorganismo (*Azospirillum* sp.) se considera como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola y ornamental (Bashan et al., 2004). Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum* sp., se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon and Labandera, 1994), como el ácido indole-3-acético (Cheryl and Glick, 1996).

Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) en cactáceas

Las especies pertenecientes a la familia Cactaceae que se propagan a nivel comercial generalmente tienen germinación baja y lento crecimiento, lo que origina una producción de plantas con tamaños diferentes dentro de un mismo lote, existiendo una reducida cantidad de brotes laterales. Con el propósito de hacer más eficiente el proceso de producción durante los últimos años el CTV se ha utilizado como una alternativa para la propagación de cactáceas (Ault y Blackmon, 1987; Hubstenberger et al., 1992; Montaña et al., 1993; Papafotiou et al., 2001; Ojeda et al., 2008).

La micropropagación representa una alternativa viable para la conservación *ex situ* de esta familia botánica, principalmente para las especies que se encuentran en estatus de riesgo. El CTV en cactáceas, se ha realizado en diversos países de Europa, Estados Unidos, Japón y México (Johnson y Emino, 1979, Mauseth, 1979; Vyskot y Jara, 1984;

Starling, 1985; Ault y Blackmon, 1987; Machado *et al.*, 1993; Papafotiou *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002).

La propagación asexual o clonal tiene ventajas en cuanto a la segregación genética, al obtener individuos idénticos al de la planta donadora, por lo que Hubstenberger *et al.*, (1992), Yassen *et al.*, 1995 y Ordoñez (2003) coinciden en que la micropropagación es una ruta factible en cactáceas que puede satisfacer las necesidades de conservación en especies amenazadas, raras o vulnerables.

Para el caso de la regeneración *in vitro* de la “biznagueta” o “biznaga cono invertido de knuth”, el proceso de micropropagación depende de las variables siguientes:

- ✓ Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.
- ✓ Condiciones de crecimiento de la planta donadora.
- ✓ Edad de la planta donadora.
- ✓ Inóculo seleccionado.
- ✓ Porción y edad del tejido donador.

Los primeros estudios de cultivo *in vitro* en cactáceas fueron realizados por Minocha y Mehra (1974), para generar brotes adventicios de *Mammillaria woodsii* mediante la formación de callo a partir de yemas, plántulas y partes florales, sin obtener resultados positivos. Por otro lado, Mauseth y Halperin (1975) y Mauseth (1976), realizaron evaluaciones en *Opuntia polyacantha*, basadas en el control hormonal durante la diferenciación, demostrando que los brotes adventicios podían desarrollarse y crecer hasta formar una plántula. Villegas *et al.*, (1989), evaluaron la formación de callo al colocar explantes de cladodio de nopal en medio MS adicionado con una combinación de picloram $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y BAP $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Así mismo, Ault y Blackmon (1985), utilizaron explantes de brotes de plantas germinadas *in vitro* de *Echinocactus uncinatus*, *Echinocereus pectinatus*, variedad *neomexicanus*, *Mammillaria gummifera* variedad *meicantha*, *Ferocactus covillei* y *F. WislizenH* y los colocaron en el medio de cultivo de MS adicionado con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de

sacarosa, $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de inositol, $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de adenina, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de piridoxina.HCl, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina-HCl, la proliferación de callo se presentó en todas las especies con los reguladores de crecimiento aplicados.

Bustamante y Tovar (1990), cultivaron *in vitro* varias especies de cactáceas con citocininas y auxinas. Los explantes que se obtuvieron fueron brotes y algunos segmentos de callos. Los explantes iniciales fueron tomados de cultivos procedentes de semillas germinadas *in vitro* de *Pelecyphora pseudopectinata*, *Neolloydia lophophoroides*, entre otras. Los explantes se pusieron en el medio MS con cinetina (K) o benciladenina (BA) en concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.8 y $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; y $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolacético (IAA). *Coryphantha macromeris* es otra especie de cactácea que fue cultivada en un medio MS, adicionando $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina-HCl, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de inositol, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, 44 mM de N-(fénilmetil)-1H-purína-6-amino(BA), 0.5 mM de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con un pH de 5.7, lográndose satisfactoriamente la formación de callo. (Smith *et al.*, 1991)

Silos y Meléndez (1995), utilizaron *Mammillaria bocasana*, empleando las areolas espiníferas como explantes en un medio MS adicionado con hormonas 2,4-D y K en diferentes concentraciones. En todos los tratamientos se formó callo y solamente en uno de ellos hubo generación de brotes. El promedio general de brotación fue de 7.5%.

En la etapa de multiplicación, existen diferentes factores que intervienen en la activación de areolas de los cuales depende el número de brotes que se genere por explante, por lo que Vyskot y Jara (1984), De La Rosa-Ibarra *et al.*, (1994), Giusti *et al.*, (2002) y Moebius-Goldammer *et al.*, (2003), han encontrado diferencias en la eficiencia del método de micropropagación.

El cultivo de tejidos no sólo se ha utilizado para micropropagar y estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento durante la morfogénesis, sino también para eliminar enfermedades causadas por hongos y bacterias (Gratton y Fay, 1990), investigar la variación

somaclonal (Corneau *et al.*, 1990) y la producción de fitoalexinas (Paré *et al.*, 1991).

Considerando la importancia de preservar y aprovechar de una manera sustentable el patrimonio florístico que representan las cactáceas como recurso fitogenético para las zonas semiáridas del Desierto Chihuahuense y para el sector ornamental, esta nueva tecnología de producción puede ser aplicada por los productores que conforman el Comité Nacional del Sistema Producto Ornamental (CNSPO, A.C).

Protocolo para la micropropagación de la “biznaguita” o “biznaga como invertido de knuth”

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, se establecieron varios ensayos mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial para determinar el protocolo de micropropagación de *T. knuthianus*.

Como material genético, se utilizaron semillas de una colecta masal de poblaciones naturales de la especie *T. knuthianus* provenientes de los municipios de Guadalucazar, Cerritos y Villa Hidalgo en el estado de San Luis Potosí, con 60 días de colecta.

Etapa I. Establecimiento del inóculo en cultivo aséptico

En esta etapa se desarrolló una técnica para la desinfección de semillas de *T. knuthianus*, siguiendo el protocolo descrito por Villavicencio *et al.*, (2009), en el cual se establece el tiempo de inmersión y la concentración de los agentes desinfectantes (Cuadro 3). Esta etapa es de suma importancia pues de esta depende el establecimiento *in vitro* del explante.

Cuadro 3. Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
-Lavar con agua destilada estéril y detergente líquido por 5 min.
-Sumergir en alcohol 70 % por 6 min.
-Sumergir en Hipoclorito de sodio al 100 % (6% concentración comercial) más unas gotas de tween 20. por 5 min.
-Enjuagar cinco veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar.
-Colocar las semillas en una caja petrí y dejar secar.

Con la aplicación de la técnica de desinfección de las semillas se puede obtener una eficiencia en el establecimiento *in vitro* del 99% que equivale a obtener 1 tubo contaminado por bacterias u hongos por cada 100 tubos establecidos.

Este porcentaje de desinfección es satisfactorio porque elimina partículas de polvo y microorganismos, sin provocar un daño en la consistencia de la testa y necrosis del micrópilo, lo que puede llegar a impedir la emergencia de la radícula y en caso extremo matar al embrión.

Medio de Cultivo para la germinación (MBG) *in vitro* de *T. knuthianus*

Después de desinfectar las semillas de *T. knuthianus* y establecerlas en condiciones asépticas se promueve su germinación *in vitro*, utilizando un medio base para la germinación (MBG) adicionado con el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% o elaborado solo con 6% agar + 3% de sacarosa. Ambos tipos de medio se combinan con o sin aplicación de ácido giberélico adicionando 8.65 μM de AG_3 por litro de medio de cultivo, como promotor de la germinación. De este modo se evaluaron en la germinación *in vitro* cuatro tipos de medio; T1= MBG elaborado con 6% agar + 3% de sacarosa; T2= MBG utilizando los componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%; T3= MBG elaborado con 6% de agar+ 3% de sacarosa + 8.65 μM de AG_3 ; T4= MBG utilizando los

componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% + 8.65 μM de AG_3 .

Posteriormente, las semillas se establecen en tubos de ensaye con 5 ml del medio MBG respectivo. Cada semana durante un periodo de 64 días se registra el porcentaje de germinación (PG) y la velocidad de emergencia (VG), con el fin de evaluar la influencia que tienen los nutrientes y las fitohormonas (AG_3) en el proceso de germinación de *T. knuthianus*.

Procedimiento para la elaboración del MBG

Los explantes requieren de un medio que suministre un balance nutricional adecuado para que a corto plazo se obtenga un crecimiento óptimo.

El medio base que se ha utilizado para la producción de plántulas *in vitro* de *T. knuthianus* es el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se complementa con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Macroelementos		
NH_4NO_3	80.40	1650
KNO_3	101.11	1900
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.48	370
KH_2PO_4	136.09	170
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	236.15	332
Microelementos		
IK	166.01	0.83
H_3BO_3	61.83	6.2
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	228.00	16.9
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.54	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95	0.25

(cont...)

Cuadro 4. Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio (mg·L ⁻¹)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	239.93	0.025
Quelatos		
Na ₂ EDTA	372.24	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.28	27.8
Vitaminas		
Acido Nicotínico	123.10	1
Piridoxina	205.60	1
Tiamina	337.30	4
Myoinositol	180.20	100
Vitaminas		
Acido Nicotínico	123.10	1
Piridoxina	205.60	1
Tiamina	337.30	4
Myoinositol	180.20	100
Aminoácidos		
Glicina	75.07	2.5
Acido nicotíco	238.30	12.5
Medio de Cultivo		
Sacarosa	342.30	30 g·L ⁻¹
Agar		6.0 g·L ⁻¹

Preparación del MBG

- 1) En un vaso de precipitado añadir la cuarta parte de agua destilada de la cantidad que se desea preparar de medio.
- 2) Disolver la cantidad de sacarosa 30 g·L⁻¹
- 3) Añadir el volumen correcto de cada una de las soluciones de microelementos y macroelementos (Cuadro 5, Figuras 2b).
- 4) Añadir el volumen determinado de quelatos, vitaminas, y aminoácidos (Cuadro 4).

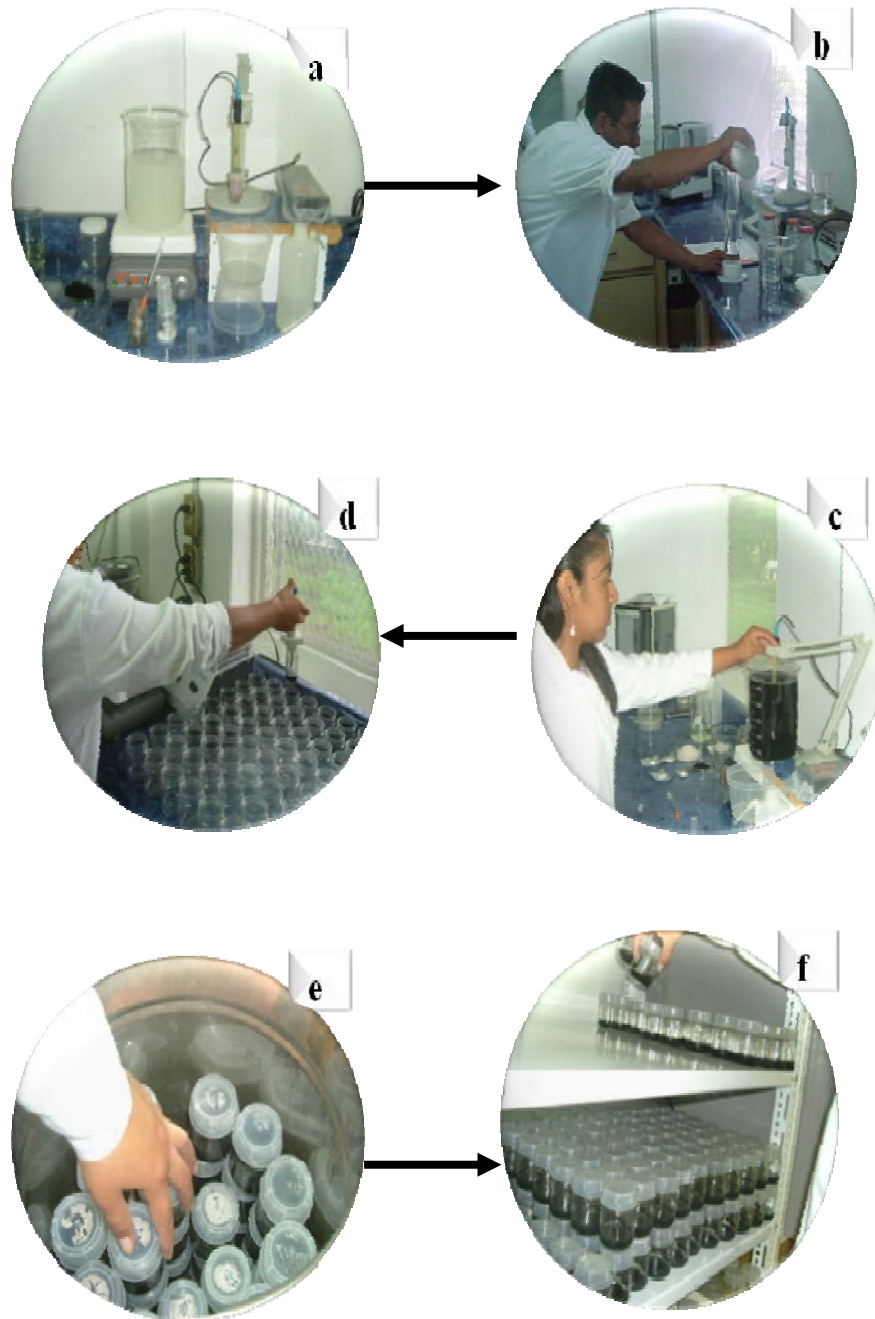


Figura 2. Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de la biznaguita o biznaga como invertido de Knuth (*T. knuthianus* (Boed.) John & Riha).

- 5) Añadir las fitohormonas al medio nutritivo si se requiere acelerar o retardar el crecimiento de la planta.
- 6) Mezclar estos componentes y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio.
- 7) Introducir el electrodo del potenciómetro en la muestra, esperar que el aparato tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajarlo agregar algunas gotas de HCl 1N y para subirlo aplicar algunas gotas de NaOH (Figura 2c).
- 8) Colocar el medio en una parrilla para calentar y agregar el agar, mezclar hasta diluirlo, antes de ebullición.
- 9) Vaciar el medio en los recipientes, ya sean frascos, tubos o envases de polipropileno, tapar los recipientes y esterilizar por 20 minutos en autoclave, considerando una temperatura de 120 °C y 4 libras de presión (Figura 2d y e).
- 10) Ya esterilizados, los recipientes se colocan en un lugar limpio (Figura 2f).

Vida del medio.-Después de que el medio de cultivo se ha preparado se puede almacenar a temperatura ambiente por una semana. Si se requiere aumentar el tiempo de almacenamiento el medio de cultivo tendrá que refrigerarse. De preferencia debe usarse el medio fresco, siempre que sea posible.

Porcentaje de germinación (PG).- La interacción del medio base para la germinación (MBG) con ácido giberélico (AG_3), tiene un efecto positivo en proporciones diferentes. El medio MBG compuesto con las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% adicionado con $8.65 \mu M$ de AG_3 duplica la emergencia de las vitroplántulas, con respecto al medio sin AG_3 , obteniendo un porcentaje de germinación máximo de 75%, porcentaje superior al que puede obtenerse en condiciones naturales.

De acuerdo con Maiti *et al.*, (1994) especies con semillas de este tipo tienen una testa delgada y sólo requieren de condiciones ambientales favorables para que su germinación, ya que existe una fuerte relación entre la ultraestructura de la semilla y el proceso germinativo, en donde los componentes del medio de cultivo son importantes, para que la

cubierta de la semilla se rompa y emerja una nueva vitroplántula (Malda *et al.*, 1999; Kauth *et al.*, 2006 y Dutra *et al.*, 2008).

Estos resultados muestran que la combinación de ambientes controlados (temperatura de 26 °C y un fotoperíodo de 16 h/luz) junto con un MBG adicionado con AG₃ favorecen la germinación *in vitro* de esta especie, activando el metabolismo celular de la semilla, el crecimiento del embrión y la actividad enzimática de los tegumentos (Figura 3).

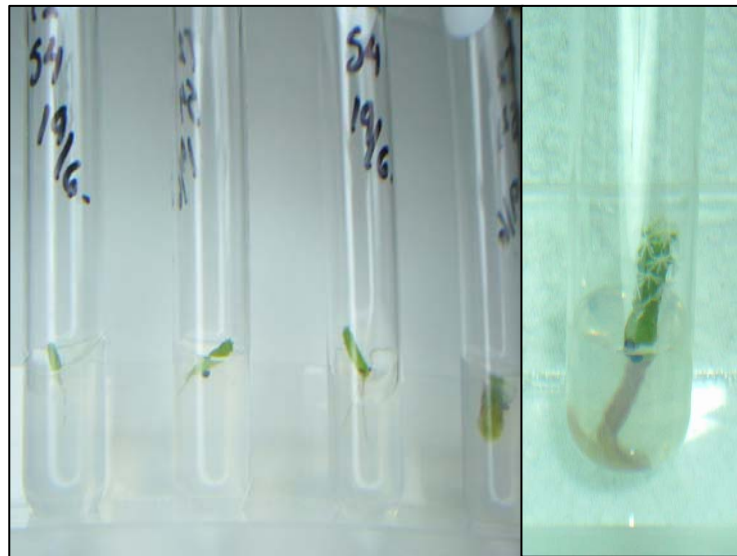


Figura 3. Germinación *in vitro* y obtención de plántulas de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha después de 9 semanas de incubación.

La reducción de la fuerza iónica del medio de cultivo al bajar la concentración de las sales al 50% se ha realizado en otras cactáceas (*Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton y Rose, para favorecer el metabolismo celular de la semilla, activar el crecimiento del embrión y el proceso enzimático de los tegumentos (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002).

Velocidad de emergencia (VG).- De los cuatro medios de cultivo evaluados en la germinación se determinó que la velocidad de emergencia de las vitroplantas de *T. knuthianus* esta mediada por los componentes del medio de cultivo y la presencia ácido giberélico (AG₃), ya que los niveles

endógenos de esta fitohormona no fueron suficientes para activar los procesos enzimáticos y eliminar los inhibidores de la germinación como se mostró con los MBG sin la adición de fitohormonas (T1 y T2) (Figura 4).

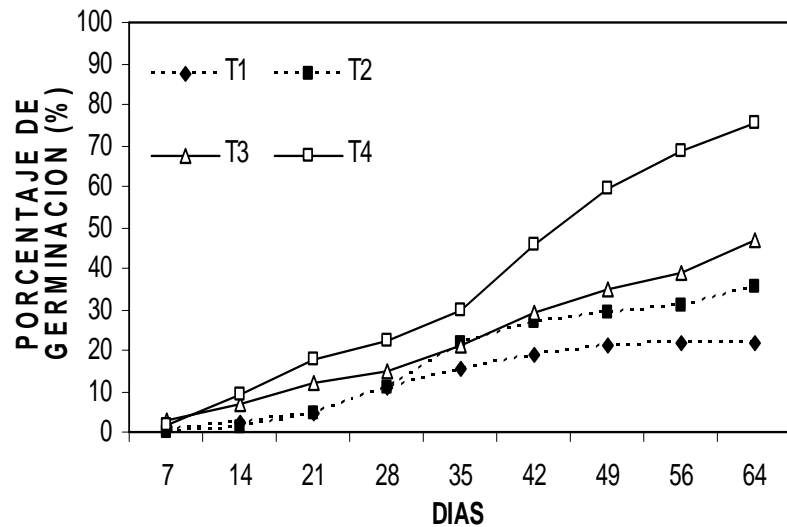


Figura 4. Velocidad de germinación de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha. en diferentes medios de cultivo MBG (T1= 0.6% agar y 87.64 mM de sacarosa; T2= MS 50X; T3= 0.6% agar + 87.64 mM de sacarosa + 8.65 μM de AG_3 ; T4= MS 50X+8.65 μM de AG_3).

En esta evaluación se observó que durante los primeros 14 días de incubación no existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación en los diferentes medios de cultivo (MBG); sin embargo, a partir de los 21 días la velocidad de emergencia de las vitroplantas se incrementa con el MBG T4 (MS al 50% + 8.65 μM AG_3), tendencia que se mantiene hasta los 64 días cuando el proceso de germinación termina.

El mismo efecto también se ha reportado en *Astrophytum capricorne*, otra cactácea del Desierto Chihuahuense, en donde el PG fue de 70%. En salvia (*Salvia splendens* Sellow ex Roem. et Shult.) se estimó un PG=87%, con 100 y 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG_3 y un PG=13%, cuando no se adicionó el promotor al medio (De la Rosa-Ibarra y García, 1994; De la Vega y Alizaga, 1987). Para *Melocastus caesius*, *Stenocereus stellatus* y otras especies de *Mammillaria* se ha observado que las giberelinas no

promueven la germinación, si el proceso se realiza en la oscuridad (Araya *et al.*, 2000; Rojas, 2008).

Estos resultados muestran que en condiciones *in vitro* las semillas de *T. knuthianus* requieren de un MBG compuesto por nutrimentos y AG_3 para promover la imbibición, absorción de oxígeno, activación de enzimas, procesos que se requieren durante la germinación para activar la división celular y emergencia de las vitroplántulas.

Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes (MIB)

En esta etapa se utiliza un medio para la inducción de brotes (MIB) elaborado con los componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con una relación citocinina-auxina 10:1 en diferentes niveles de concentración. Para el MIB se pueden utilizar dos tipos de citocininas: cinetina (Kin) y 6-bencil aminopurina (BA). Estas se pueden adicionar al medio en seis niveles de concentración; T1=0.46, T2=0.69, T3=1.16, T4=2.32, T5=3.48 y T6=4.64 mM de Kin y T7=0.44, T8=0.66, T9=1.10, T10=2.21, T11=3.30 y T12=4.40 mM de BA, combinadas con su proporción correspondiente de auxinas, en este caso ácido indolbutírico (AIB); (T1 y T7=0.41, T2 y T8= 0.61, T3 y T9 =0.103, T4 y T10=0.207, T5 y T11=0.310, T6 y T12=0.413, $\times 10^{-1}$ μ M de AIB). De este modo se evaluaron doce tratamientos en el MIB incluyendo un tratamiento sin fitohormonas (T0).

En el medio base para la inducción de brotes (MIB) adicionado con el tratamiento de fitohormonas respectivo se establecieron segmentos de epicotilo como explante obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*. Estos explantes se colocan en frascos Gerber® de 70 mL de capacidad, con un volumen de 20 mL de medio de cultivo e incuban a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, considerando un fotoperíodo de 16 h luz.

El periodo de incubación es de ocho semanas, tiempo en el que se obtienen brotes de las yemas axilares, mismos que se extraen y cuantifican previo al siguiente subcultivo, determinando el número de brotes por explante (NB) y altura (A) de los mismos en milímetros (mm). Los brotes obtenidos se subcultivan en medio sin fitohormonas.

Inducción de Brotes (IB).-De los diferentes tratamientos establecidos se determinó que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre el tipo de fitohormonas que se utilice. Cuando se usa el MIB adicionado con cinetina (Kin) se obtiene mejor respuesta en la inducción de brotes, generando en promedio 6.0 brotes/explante con una altura (A) de 6.0 mm, a diferencia del MIB adicionado con BA, en donde se generaron alrededor de 4 brotes/explante con una altura de 5.0 mm en promedio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Influencia de las citocininas en el número (NB) y altura (AB) de brotes de *T. knuthianus* en laboratorio.

Citocininas	Número de Brotes	Altura (mm)
Kin	5.87 a	5.91 b
BA	3.87 b	5.18 b
Testigo	2.33 c	8.22 a
DMS	1.23	1.42
r^2	0.71	0.65
CV	23.61	21.12
Media	4.43	5.40

Kin = Cinetina; BA = Bencilaminopurina

DMS= Diferencia mínima significativa; CV= Coeficiente de variación.

Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey $P < 0.05$).

Al comparar este efecto con el tratamiento sin citocininas se comprobó *T. knuthianus* es capaz de producir brotes; sin embargo, su regeneración es baja (2.33 brotes por explante) (Cuadro 5).

Al evaluar el MIB con la relación 10:1 de citocininas-auxinas como efectos independientes se determinó, que el tratamiento T12 tiene un efecto positivo en la inducción de brotes, generando hasta 10 brotes por explante, cuando al medio MIB se le adiciona con 4.40 mM de BA + 0.413 μ M de AIB (Cuadro 6).

Lo anterior contrasta con el tratamiento T2, del cual se obtuvieron 9 brotes por explante en el MIB adicionado con una baja concentración de cinetina (0.69 mM KIN + 0.061 μ M de AIB). Estos resultados muestran que la concentración de citocinina-auxina en una relación 10:1 es positiva para la inducción de brotes; aunque su efecto depende del tipo de

fitohormona que se utilice. A diferencia de lo sucedido con el tratamiento sin fitohormona, en el que se tuvo el menor número de brotes (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tasa de multiplicación de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha.

TRAT	Concentración			NB	A
	mM		(μ M)		
	KIN	BA	AIB		
0	0	0	0	2.33 h	8.22 a
1	0.46		0.041	6.77 c	5.70 ab
2	0.69		0.061	8.66 b	4.64 b
3	1.16		0.103	6.24 cd	4.74 b
4	2.32		0.207	5.77 cde	6.54 ab
5	3.48		0.310	5.04 def	6.97 ab
6	4.64		0.413	5.37 cdef	6.49 ab
7		0.44	0.041	3.86 hg	6.82 ab
8		0.66	0.061	3.36 hg	4.55 b
9		1.10	0.103	3.4 hg	4.92 b
10		2.21	0.207	4.29 fge	5.34 ab
11		3.30	0.310	3.9 fg	6.09 ab
12		4.40	0.413	10.87 a	3.35 c
			DMS	1.23	1.10
			r ²	0.53	0.29
			CV	23.61	21.12
			media	4.43	5.40

Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey $P < 0.05$).

NB= Número de brotes; A=Altura

La interacción citocinina-auxina ha sido efectiva en la organogénesis directa de 21 especies de cactáceas mexicanas, como lo refieren Pérez *et al.*, (1998) y Mata *et al.*, (2001), entre ellas las del género *Turbinicarpus*, cuando se utiliza el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) como MIB y se adiciona con un rango de 8.8 a 13.31 mM de BA combinado con 0 a 2.6 μ M de ANA.

Altura de brotes (A).-Al analizar la altura de los brotes generados se determinó que está se reduce al aumentar el número de brotes que se producen en la etapa de multiplicación, como sucedió con los tratamientos T2 y T12, en donde se registro una altura (A) de brotes de 4 y 3 mm, respectivamente (Cuadro 6 y Figura 5).



Figura 5. Brotes obtenidos en la etapa de multiplicación de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha.

Al analizar el efecto de las citosina-auxina se encontró que al combinar el MIB con las fitohormonas BA-AIB el número de los brotes se incrementa conforme se aumenta la concentración de ambas fitohormonas en un rango de 0.66 a 3.3 mM de BA con 0.061 a 0.310 μM de AIB, generándose hasta 4 brotes por explante con una altura superior a 5.0 mm. Esta cantidad de brotes se duplica cuando el MIB se adiciona con una mayor concentración de estas fitohormonas (4.40 mM de BA + 0.414 μM de AIB), pero la altura de los brotes disminuye registrando 11 brotes/explante con un tamaño de 3.0 mm en promedio (Cuadro 6). Este efecto es diferente cuando el MIB se combina con la interacción de fitohormonas KIN-AIB. El MIB adicionado con menores niveles de concentración (0.69 mM de Kin + 0.061 μM de AIB) se obtiene un mayor número de brotes (9 brotes/explante) con una altura promedio de 5 mm.

Esto indica que el control hormonal influye en la diferenciación del explante de *T. knuthianus* tal como lo refiere Mauseth (1976; 1979), y demuestra que la regeneración de brotes *in vitro* de esta biznaguita es posible a partir de yemas axilares como también ha sido reportado para

otras especies de cactáceas por Dabekausen *et al.*, (1991), Pérez *et al.*, (1998) y Mata *et al.*, (2001).

El efecto encontrado con la interacción citocinina-auxina en la inducción de brotes es similar al obtenido en otras cactáceas como *Mammillaria san-angelensis* en donde se utilizó una concentración alta de fitohormonas (4.4 mM de BAP + 0.53 μ M de ANA), para generar hasta 21 brotes por explante, con una altura menor a 3.0 mm (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), lo mismo ocurrió cuando se aplicó 3.3 mM de BAP + 8.8 μ M de 6DMAP en *Turbincarpus valdezianus* y *T. pseudopectinatus* generando de 7.8 a 19.7 brotes (Dávila *et al.*, 2005).

La multiplicación *in vitro* de *T. knuthianus* es posible si al MIB se le agrega una relación 10:1 de citocininas-auxinas, esta interacción promueve la activación de las yemas axilares en letargo, las cuales presentan meristemas con potencial mitótico, determinando una tasa de multiplicación exponencial de 1:8:8:8 hasta 1:10:10:10 cuando el medio de cultivo (MIB) es adicionado con 0.69 mM de Kin + 0.061 μ M de AIB o con 4.4 mM de BA+ 0.413 μ M de AIB.

Esta tasa de multiplicación es semejante a la registrada en especies de los géneros: *Coryphantha*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Clayton *et al.*, 1990) y en *Astrophytum myriostigma* Lem. (Villavicencio *et al.*, 2009), pero supera a la registrada en otras especies de cactáceas mexicanas como *Mammillaria voburnensis* Scheer y *Mammillaria elongata* DC. (Ordoñez, 2003; Papafotiou *et al.*, 2001) y a la reportada por Clayton *et al.*, (1990) y Dávila *et al.*, (2005) en *Escobaria missouriensis* (Sweet) D. R. Hunt, *Pediocactus paradinei* B. W. Benson y *Toumeyia papyracantha* (Engelm) Britton *et Rose*, quienes registraron una tasa de multiplicación máxima de 6.0 brotes por explante.

Los brotes obtenidos posteriormente se subcultivan en medio fresco en envases de polipropileno de 500 mL con un volumen de 50 mL en el mismo MIB pero sin fitohormonas (Figura 6).



Figura 6. Brotes subcultivados en la etapa de multiplicación de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha.

Etapa 3 Elongación de brotes

Los brotes de *T. knuthianus* obtenidos en la etapa de multiplicación se subcultivan en medio de cultivo MS al 100%, por cuatro semanas para promover su elongación, posteriormente pasan a la etapa de enraizamiento *in vivo*.

Etapa 4 Enraizamiento *in vivo* y aclimatación

En esta etapa se seleccionan vitroplantas con 10 mm de altura, las cuales se sacan del envase y lavan con agua corriente para eliminar los restos de agar. Estas vitroplantas se pueden establecer en diferentes tipos de sustratos (S1=arena, S2= peat moss, S3= negra y S4= mezcla homogénea de las tres anteriores) previamente esterilizados.

Para promover el enraizamiento *in vivo* se utiliza un biofertilizante que contiene como ingrediente activo *Azospirillum* sp. el cual ayuda al crecimiento radicular de las vitroplantas.

Este producto orgánico se aplica en forma líquida en el riego, dos veces por semana durante las primeras 12 semanas de establecimiento en invernadero.

Este biofertilizante se puede aplicar en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o su equivalente en gramos/litro. Para el enraizamiento de *T. knuthianus* se utilizaron dos tipos de concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) C1= 1.5×10^6 UFC/ml⁻¹ y C2= 3×10^6 UFC/ml⁻¹ que equivalen aplicar 2.9 g/L y 5.8 g/L de producto respectivamente.

De este modo se evaluaron cuatro sustratos combinados con dos concentraciones de biofertilizante y sus homólogos sin la inoculación de la cepa, en los siguientes tratamientos T1=Arena + 1.5×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T2=Peat moss + 1.5×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T3=Tierra de monte + 1.5×10^6 UFC/ml⁻¹ cepa, T4=Mezcla de sustratos + 1.5×10^6 UFC/ml⁻¹ cepa, T5=Arena + 3×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T6=Peat moss + 3×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T7=Tierra de monte + 3×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T8=Mezcla de sustratos + 3×10^6 UFC/ ml⁻¹ cepa, T9=Arena (Testigo), T10=Peat moss (Testigo), T11=Tierra de monte (Testigo), T12=Mezcla de sustratos (Testigo).

Preparación de la concentración

Se necesita pesar el biofertilizante de acuerdo al siguiente cuadro y diluirlo en el agua de riego. Aplicando el producto por las mañanas y suspender después del periodo de aclimatación (Cuadro 7).

Cuadro 7. Requerimientos de biofertilizante durante la aclimatación de plántulas de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha.

TRAT	UFC	Aplicaciones/Semana (g·L ⁻¹)	
		1	2
1	1.5×10^6 UFC/ mL ⁻¹	2.9	5.8
2	3×10^6 UFC/ mL ⁻¹	5.8	11.6

*Concentración calculada utilizando un biofertilizante que contenga 500 millones de bacterias de *Azospirillum*/gr

Número de raíces (NR).- La producción de raíces/planta es diferente entre sustratos, con el tratamiento T2=Peat moss + 1.5×10^6 UFC/ ml⁻¹ de cepa se generó el mayor número de raíces que el resto de los tratamientos evaluados (6 raíces/planta) (Cuadro 8).

Al utilizar los sustratos de arena y tierra de monte con ambas concentraciones de la cepa el NR fue estadísticamente igual generándose en promedio 5 raíces/planta. En los tratamientos T1, T3, T5 y T7 el NR fue superior al registrado en los sustratos sin la aplicación de la cepa (testigo), registrando un NR menor a 2 raíces/planta (Cuadro 8).

Esto muestra que las plantas *T. knuthianus* tienen niveles endógenos de auxinas que le permiten inducir el proceso rizogénico; sin embargo, el número de raíces puede incrementarse si al sustrato se le aplica una baja concentración de la cepa (1.5×10^6 UFC/ ml⁻¹) para promover este efecto.

Cuadro 8. Comparación de medias de los tratamientos evaluados en el enraizamiento y aclimatación de *T. knuthianus*. (Boed.) John & Riha

Tratamientos	LR	NR	AFP	Sobre vivencia (%)
	(cm)		(cm)	
T1 Arena + 1.5×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.67 a	5.20 b	4.28 ab	90 b
T2 Peat moss + 1.5×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.50 ab	5.90 a	7.6 a	100 a
T3 Tierra de monte + 1.5×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.25 cd	5.20 b	5.35 ab	100 a
T4 Mezcla de sustratos + 1.5×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	1.42 f	3.40 e	2.71 c	90 b
T5 Arena + 3×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.45 bc	5.26 b	6.46 a	90 b
T6 Peat moss + 3×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	1.94 e	4.60 c	2.97 c	90 b
T7 Tierra de monte + 3×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.53 ab	5.33 b	4.69 ab	80 c
T8 Mezcla de sustratos + 3×10^6 UFC/ ml ⁻¹ cepa	2.06 de	4.00 d	2.4 cd	90 b
T9 Arena (Testigo)	1.76 cd	2.50 f	2.35 cd	80 c
T10 Peat moss (Testigo)	1.42 f	1.86 g	1.8 d	60 c
T11 Tierra de monte (Testigo)	1.36 g	2.20 fg	1.5 d	70 c
T12 Mezcla de sustratos (Testigo)	1.34 g	2.10 fg	1.25 e	80 c
DMS	0.15	0.34	4.28	
Media	1.97	3.96	3.61	85
CV	10.34	13.18	5.35	

Medias con letras iguales entre columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey, ≤ 0.05). IAT = incremento en altura de tallo; NR = número de raíces; LR = longitud de raíz; AFP = Altura final planta.

Longitud de raíces (LR).- Entre sustratos no se encontró un patrón definido en la longitud de raíces/planta. Con los sustratos arena y peat moss con baja concentración de la cepa (T1 y T2) se obtiene una LR de 2.50 cm, este efecto es estadísticamente igual con el sustrato tierra de

monte con una concentración alta de la cepa (T7), mientras que el resto de los sustratos con la cepa registraron una LR menor a 2.0 cm.

Los sustratos sin la inoculación de la cepa generaron una LR menor a 1.7 cm (Cuadro 8), Figura 7).

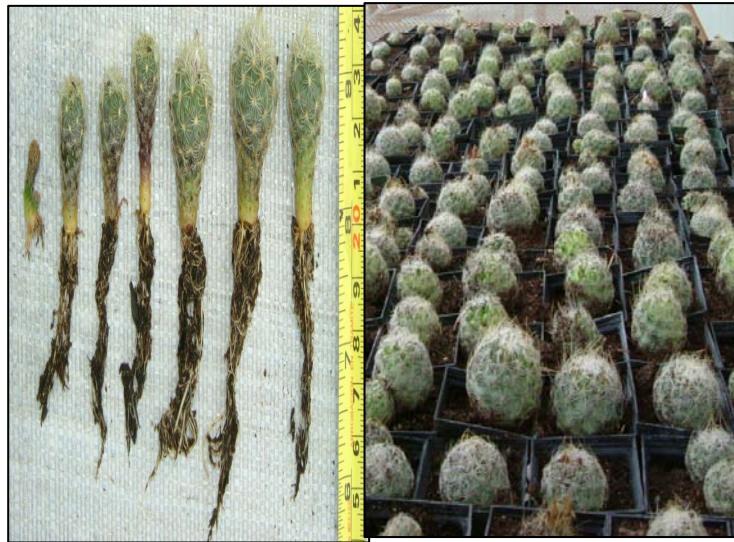


Figura 7. Efecto de *Azospirillum* sp. en el proceso rizogénico de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha. Invernadero del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

Esto muestra que el enraizamiento y aclimatación de *T. knuthianus*, puede realizarse en arena o peat moss como sustrato con una concentración baja del biofertilizante (1.5×10^6 UFC/ ml^{-1}), ya que la interacción entre planta y bacteria favorecen la producción de hormonas de crecimiento, generando cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas, mismas que a su vez promueven, en menor tiempo, el desarrollo de raíces con mayor crecimiento, lo que influye en la toma de agua y sales minerales como lo refieren Okon *et al.*, (1994) y Burdman *et al.*, (2000).

De acuerdo a Kapulnik *et al.*, (1985), la aplicación de 10^7 UFC mL^{-1} incide en el número y longitud total de raíz, en tanto que la inoculación de 10^8 UFC mL^{-1} causa la inhibición de desarrollo. El efecto rizogénico de la cepa inoculada a este tipo de suelo en concentración de 1.5×10^6 UFC L^{-1} de *Azospirillum* spp, es similar al reportado para otras especies (*Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton *et Rose*). Con *P. pringlei* la

inoculación de la cepa en un suelo pobre de áreas desérticas, incrementó la materia vegetativa hasta un 60% y el largo de las raíces en un 100%. Para el caso de *T. knuthianus* se determinó que la bacteria invadió el sistema radical del cactus, durante los primeras 12 semanas de aclimatación considerando este tiempo como un período de adaptación

Sobrevivencia.- El crecimiento *ex vitro* es autotrófico, y no heterotrófico como en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario reconstruir y desarrollar procesos y estructuras adaptativas como: lignificación, cubiertas cuticulares, estomas y órganos fotosintéticos para que las plantas tengan un desarrollo autónomo, mismo que ocurre durante la aclimatación (Pacovsky, 1985; Puente y Bashan, 1993). Al respecto, se obtuvieron diferencias significativas entre sustratos con y sin inoculación de la cepa; las plantas que fueron aclimatadas con la interacción de la cepa registraron un porcentaje de supervivencia superior al 91 %, independientemente del tipo de sustrato, mientras que sus homólogos sin la cepa presentaron un valor promedio de 72 %. Con el sustrato con alta capacidad de retención de humedad como el peat moss, (T10) se incrementó la pudrición de las plantas, efecto similar al reportado por Trinidad (2005) para la misma especie registrando en ambos casos un bajo porcentaje de supervivencia (60%) (Cuadro 8).

A pesar que este tipo de sustrato es estéril y comúnmente se usa en plantas ornamentales de tallo suculento, es poco recomendable para enraizar y aclimatar plantas de *T. knuthianus* ya que sus requerimientos de humedad son bajos por ser una planta propia de condiciones semiáridas, por lo que se propone utilizar un sustrato poroso como lo refieren Johnson y Emimo (1979). Un sustrato poroso como el T1 tiene un efecto positivo en la aclimatación, si se inocula con una cepa rizogénica, registrando una sobrevivencia de 90%.

El protocolo de micropropagación y aclimatación de *T. knuthianus* muestra que pueden producirse vitroplantas de esta especie y que estas se pueden adaptar a las condiciones hetero-mixotróficas a las que están expuestas durante este proceso como lo refieren Santamaría *et al.*, 1993 y 1995) (Figura 8).

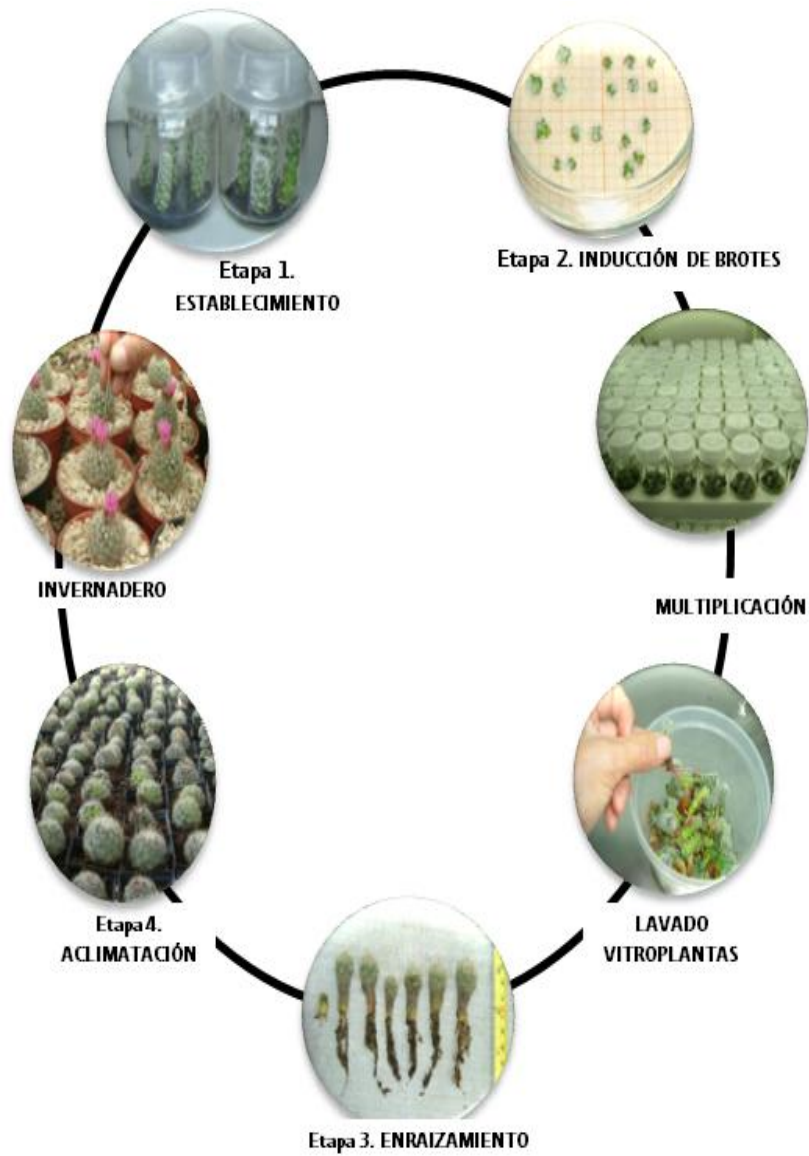


Figura 8. Esquema de la micropropagación de *T. knuthianus* (Boed.) John & Riha 1983.

Conclusiones

La selección del medio de cultivo es esencial en la etapa de establecimiento de *T. knuthianus in vitro*, porque del medio base de germinación (MBG) dependen las siguientes etapas de la micropropagación.

En la etapa de multiplicación es necesario establecer la interacción de fitohormonas que promueve la inducción de brotes para asegurar una tasa de multiplicación. Estas nuevas vitroplantas pueden enraizarse *in vivo* si se aplica al sustrato una concentración de biofertilizante para promover el enraizamiento y aclimatación.

El protocolo de micropropagación para esta especie abarca cuatro etapas (Establecimiento, Multiplicación, Enraizamiento y Aclimatación), mismas que en conjunto implican un período de ocho meses para obtención de vitroplantas y plantas aclimatadas en invernadero.

La micropropagación es un método factible para regenerar esta especie ornamental, de la cual se pueden obtener plantas con tamaño uniforme y con buena calidad fitosanitaria, lo que representa una opción viable para incrementar la producción de esta cactácea bajo el esquema de laboratorio-invernadero. Este método puede ser usado por productores con infraestructura que se dediquen a la producción masiva de plantas ornamentales y a la comercialización legal de este tipo de especies.

Literatura citada

- Anderson, E. T. 2001. The cactus family. Timber press. Portland, Oregon, USA. 776 p.
- Araya, E., L. Gómez, N. Hidalgo y R. Valverde. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminatay*) Agronomía Costarricense, 24 (1): 75-80.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, XLIV: 109-115.
- Arredondo, G. A. 2009. Estándares de calidad requeridos en la producción de cactáceas ornamentales. Folleto para Productores No 47. Campo Experimental San Luis Potosí. CIRNE-INIFAP. Soledad de Graciano, San Luis Potosí, México. 24p.
- Ault, J. R. and W.J. Blackmon. 1985. *In vitro* Propagation of Selected Native Cacti Species. Horticultural Science. 20(3): 541.

- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). Horticultural Science, 22(1): 126-127.
- Bashan, Y., Holguin, G., and De-Bashan, L. E., 2004, *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), Critical Reviews in Microbiology, 50: 521-577.
- Bravo, H. H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., Vol. II:85-101.
- Britton, N. L. and J. N. Rose. 1963. The cactaceae. Description and illustrations of plants of the cactus family. Vols. I y II: 3-8, Vols. III y IV: 181-185.
- Burdman, S., Y. Okon and E. Jurkevitch. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Critical Reviews in Microbiology, Vol 26: 91-110.
- Bustamante, M. A. and L.G. Tovar.1990. *In vitro* Shoot Formation of Cacti Species in Response Cytokinins and Auxin. Departament of Agriculture. UAAAN. Buena Vista Saltillo Coah. Méx. 14 p.
- Cheryl, P. and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Critical Reviews in Microbiology, 42: 207-220.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. Phillips C. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. Journals American Society Horticultural Science, 115(2): 337-343.
- Corneau, M. G., C. Corneau and S. N. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. In: Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-66: 99pp.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba*. Rausch. Journals American Society Horticultural Science, 46: 283-294.
- Dávila, F. C. A., De La Rosa, C. M. L., Pérez, M. B. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 540-545.

- De La Rosa I. M., García H. 1994. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. *Phyton, J. Int. Bot. Exp.*, 56: 147-150.
- De la Vega, B., Alizaga, R. 1987. Efecto del ácido giberélico y del preenfriamiento sobre la ruptura del reposo en semillas de salvia. *Agronomía Costarricense*. 11(1): 89-95.
- Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Journals American Society Horticultural Science*. 14: 335-345.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant cell culture: a practical approach*. IRL Pres. Oxford. 236p.
- Dutra, D., R. Timothy J., P. J. Kauth, L. Scott S., M. E. Kane and L. Richardson. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94: 11-21.
- Escobar, H., A., 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 80p.
- Espinosa, A., González, H. Mejía, J. 2003. Plantas nativas de México con potencial ornamental. La comercialización de plantas en peligro de extinción. Universidad Autónoma Chapingo. AMEHOAC (Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental, A.C.) 2160. 297p.
- Fay, M. F. and J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya*, (10): 33-48.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Horticultural Science*, 95(4): 319-332.
- George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics*. Eversley, Basingstoke, England. 109 p.
- Gratton, J., and M. F. Fay. (1990). Vegetative propagation of cacti and other succulent *in vitro*. *In: Methods in Molecular Biology, Vol. 6 Plant Cell and Tissue Culture*. Humana Press. 219-225pp.
- Guzmán, U., A. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM., CONABIO. ISBN 970-9000-20-9. México, D. F. 315 p.
- Hernández, H. M. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Herbario Nacional.

- Instituto de Biología, UNAM. [http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta.26\(33-52\).pdf](http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta.26(33-52).pdf). (2 Mayo 2009).
- Hubstenberger, J. F. P., W. Clayton and G. Phillips C. 1992. IV Micropropagation of Cacti (Cactaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 20: 49-68.
- Hunt, D. 2006. *The New Cactus Lexicon. Descriptions & Illustrations of the cactus family.* Compiles and edited by members of the International Cactaceae Systematic Group. England. Editorial. 899p.
- Jiménez, G. E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. En: Pérez-Ponce J. (ed.) Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24 pp.
- Johnson, J. L. and E. Emino R. 1979. Tissue culture propagation of cacti. *Cactus and Succulent Journal*, 51: 275-277.
- Kapulnik, Y., Y. Okon and Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Critical Reviews in Microbiology*, 31: 881-887.
- Kauth, J. P., A. Wagner V. and E. Michael Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 85(1): 91-102.
- López, E. A.L., L. P. Olguin, J. Márquez, M. López. 2008. Establecimiento y propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas. En Cátedra Nacional de Biología (2008) "Juan Luis Cifuentes Lemus" Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 55-63pp.
- Machado, M., H. S.; A. J. Prioli and C. A. Mangolin. 1993. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) Isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvians* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*, 31 (3-4): 167-172.
- Maiti, R. K., P. Hernández J. L. y M. Valdez M. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton*, 55: 97-105.
- Malda, G., H. Suzan, R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Horticultural Science*, 81: 71-87.
- Martínez, V. O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis*. *American Horticultural Science*, 61(1): 99-105.

- Mata, R. M., Monroy-De La Rosa, M., Goldammer, K.M., Chávez-Ávila, V.M. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37: 400-404.
- Mata, R. M., A. Jiménez-Rodríguez y V.M. Chávez-Ávila. 2006. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an endangered, endemic Mexican species. *J. American Horticultural Science*, 41: 1325-1329.
- Mauseth, D. J. and W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polycantha* Cactaceae. *American Journal of Botany*, 62(8): 869-877.
- Mauseth, D. J. 1976. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems *In: Opuntia polycantha* (cactaceae). *American Journal of Botany*, 63 (10): 1295-1301.
- Mauseth, D. J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal*, 51: 186-187.
- Mauseth, D. J. 2000. Theoretical aspects of surface-to-volume ratios and water-storage capacities of succulent shoots. *American Journal of Botany*, 88: 1107 – 1115.
- Minocha, C. S. and P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria proflera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 61(2): 168-173.
- Moebius, G. K., M. Goldammer, R. Mata M., V. Chávez M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39(4): 388-393.
- Montaño, M., C.; F. Vega V. y H. Nolasco S. 1993. Aspectos ecológicos y económicos de las cactáceas mexicanas. *Cactáceas y Suculentas, Mex. XXXVIII. No. 4: 89-92.*
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- Newland, C., K. S. Ives; G. E. Joseph; M. Mittleman, R. E. Foster; C. Scannell; W. R. Feldman; F. S. Crosswhite and C. Hansen. 1980.

- Propagation techniques for desert plants. *Desert Plants*, 2 (4): 205-217.
- Nobel, P. S. 1998. *Los Incomparables Agaves y Cactus*. Ed. Trillas. México. 211 p.
- Ojeda, Z. M. del C., H. Rodríguez F., L. Iracheta D. y D. Gutiérrez A. 2008. Micropropagación de Cactáceas. VII Simposium-Taller "Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México", 24-25 de Octubre. Mina, Nuevo León, México. 143-147pp.
- Okon, Y. and C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1591-1601.
- Ordoñez, M. M. A. 2003. Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae) Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 70p.
- Pacovsky, R. S., E. A. Paul and G. J. Bethlenfalvay. 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil*, 85:145-148.
- Papafotiou, M., G. Balotis N., T. Panayiota L. and J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.
- Paré, P. W.; N. Dimitrievna and T. J. Mabry. 1991. Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture, *Phytochemistry*, 30: 1133-1135.
- Pelah, D., R. Kaushik A., Y. Mizrahi and Y. Sitrit. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 81-84.
- Pérez, M. B., E. Villalobos, E., Meza, E., Morone L.R., Lizalde, J. 1998. Propagation of 21 species of Mexican cactus by axillary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34: 131-135.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. 54-82pp.
- Puente, M. E. and Bashan, Y. 1993. "Effect of inoculation with *A. brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*)". *Symbiosis*, 15: 49-60

- Rojas, A. M., 2008. Efecto del ácido giberélico en la germinación de cuatro especies del género *Mammillaria* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, 5(1): 21-23.
- Sagawa, Y. and J. T. Kunisaki. 1990. Micropropagation of floriculture crops. Handbook of plant cell culture. Ornamental species. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Shar and Y. P. S. Baja (eds) McGraw-Hill New York. Vol. 5: 32-39
- Santamaría, J. M., Davies, W. J., and Atkinson, C. J. 1993. Stomata of Micropropagated *Delphinium* Plants Respond to ABA, CO₂, Light and Water Potential, but Fail to Close Fully. Journal of Experimental Botany, Vol. 44. No. 258: 99-107.
- Santamaría, J. M., Herrera, José L., and Robert, Manuel L. 1995. Stomatal Physiology of Micropropagated CAM Plant; Agave tequilana (Weber). Plant Growth Regulation, 16: 211-214.
- Seeni, S. and A. Gnanam. 1980. Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant *Chamaecereus sylvestrii* (Cactaceae). Physiol. Plant, 49: 465-472.
- SEMARNAT. NOM-059-ECOL-2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Normativo II. http://www.ine.gob.mx/ueajeic/publicaciones/normas/rec_nat/no_059_a2g.html. (20/Agosto/2010).
- Silos, E. H., A. Nava C. y J. Meléndez S. 1995. Obtención de brotes *in vitro* de *Mammillaria bocasana*, con 2,4-D y Kinetina. En Memorias del II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. ANABAF. Aguascalientes, Ags. México. 56p.
- Smith, R, P. Burdick, J. Anthony and A. Reilley . 1991. *in vitro* Propagation of *Coryphantha macromeris*. Hort. Science, 26(3): 315.
- Starling, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cact. and Succ. J., 57:114-115.
- Trinidad, G. R. 2005. Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. y *Turbincarpus knuthianus* Boed. y aclimatación de éstas especies y *T. lophophoroides* Werd. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coah., México. 85 p.
- Villalobos, A. V. y M. Thorpe. 1985. La micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados, En: Fundamentos y Aplicaciones del cultivo de tejidos en la Agricultura. W. Roca CIAT. Colombia. 67-85pp.

- Villavicencio, G. E. E., A. Cano P., I. H. Almeyda L. y M. A. Arellano G. 2006. Nueva técnica para la producción comercial del bonete o birrete de obispo (*Astrophytum myriostigma* Lem.) Cactácea ornamental del desierto Chihuahuense. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto para productores Num. 12. ISBN 970-43-0118-9 Coahuila, México. 10p.
- Villavicencio, G. E. E., A. Cano P. y A. Juárez S. 2009. Micropropagación y producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del Desierto Chihuahuense. Campo Experimental Saltillo. INIFAP-CIRNE. Folleto Técnico Núm. 39. ISBN 978-607-425-130-2 Saltillo, Coahuila, México. 42p.
- Villavicencio, G. E. E., A. Arredondo G., M. A. Carranza P., O. Mares A., S. Comparan S., A. González C. 2010. Cactáceas ornamentales del desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. Libro técnico No. 2 ISBN: 978-607-425-473-0 Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, Saltillo Coahuila, México, 345p.
- Villegas, G., A. Jiménez, O. Dávila, M.A. del Villar y N. Rhode. 1989. Establecimiento de las condiciones de propagación de *Opuntia microdasys* (Cactaceae) a través de cultivo de tejidos. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Fac. de Ciencias Biológicas U.A.N.L. Monterrey., N.L México. 111-14pp.
- Villegas, M. A. 1996. Desinfección y establecimiento *in vitro* del explante. Laboratorio de Biotecnología Especialidad Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México 5p.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro* J. Amer. Horticultural Science, 59(3): 449-452.
- Yassen, M. Y., S. Barringer A., W. Splittstoesser E., and R. J. Schnell. 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus indica*) and plant establishment in soil. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 42: 117-119.



Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria, Centros de Investigación Regional y Campos Experimentales



- Sede de Centro de Investigación Regional
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
- Campo Experimental

Comité Editorial del CIRNE

Presidente

Jorge Elizondo Barrón

Secretario

Hipólito Castillo Tovar

Vocales

Luis Mario Torres Espinosa

Jesús Loera Gallardo

Raúl Rodríguez Guerra

Antonio Palemón Terán Vargas

Isidro Humberto Almeyda León

Rubén Darío Garza Cedillo

REVISIÓN TÉCNICA

María del Socorro Carmen Santos Díaz
Profesor Investigador FCO-CIEP-UASLP

FOTOGRAFÍAS

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez

DISEÑO Y FORMACIÓN

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez
Areli González Cortes

CÓDIGO INIFAP

MX-0-310602-36-03-15-09-48

La presente publicación se terminó de imprimir el mes de Noviembre de 2012
en Impresos Garcer, Calle Abasolo No 1012 Zona Centro C.P. 25000, Saltillo, Coah.
Tel./fax (844) 4102380

Su tiraje consta de 500 ejemplares

Campo Experimental Saltillo

Dr. David Sánchez Aspeytia

Jefe de Operación del Campo Experimental en Saltillo

C.P. Rocío del Carmen Núñez García

Jefe Administrativo

<u>Investigador</u>	<u>Programa de Investigación</u>
M.C. Oscar U. Martínez Burciaga	Agrometeorología y Modelaje
M.C. Pedro Hernández Rojas	Carne de Rumiantes
M.C. Carlos Ríos Quiroz	Carne de Rumiantes
Dr. Juan M. Covarrubias Ramírez	Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal
M.C. Emigdio Morales Olais	Frutales
Dr. José Antonio Vázquez Ramos	Frutales
Dr. Víctor Manuel Parga Torres	Hortalizas
Dr. David Sánchez Aspeytia	Hortalizas
M.C. Marco R. Carrasco Arandia	Incendios Forestales
M.C. Antonio Cano Pineda	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. David Castillo Quiroz	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. Mariano Narcia Velasco	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
Ing. Eutimio de J. Cuéllar Villarreal	Pastizales y cultivos forrajeros
Dr. Francisco Castillo Reyes	Ornamentales
M.C. Juan David Sánchez Chaparro	Ornamentales
M.C. Luis Mario Torres Espinosa	Sanidad Forestal y Agrícola
M.C. Audberto Reyes Rosas	Trigo y avena

Gobierno del Estado de Coahuila

Lic. Rubén Moreira Valdés
Gobernador Constitucional del Estado

Ing. Noe F. Garza Flores
Secretario de Desarrollo Rural

Ing. Arnoldo Martínez Cano
Subsecretario de Agropecuario

Ing. Luis D. Rodríguez Alanís
Secretario de Agricultura

M. V. Z. Cuauhtémoc Gutiérrez Villarreal
Director de Ganadería

M.C. Eglantina Canales Gutiérrez
Secretario de Medio Ambiente

Delegación Estatal de SAGARPA

C.P. Luís Gurza Jaidar
Delegado en Coahuila

Ing. Jorge Alberto Flores Berrueto
Subdelegado Agropecuario

Lic. Reynold Maltos Romo
Subdelegado de Planeación

C.P. Juan Antonio Gómez Baho
Subdelegado de Administración

Comité del SINAREFI

Dr. José Arnulfo del Toro Morales
Director General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico SAGARPA

Ing. Enriqueta Molina Macías
Directora General del SNICS

M. C. Rosalinda González Santos
Directora de Recursos Fitogenéticos



Vivir Mejor

www.gobiernofederal.gob.mx

www.sagarpa.gob.mx

www.inifap.gob.mx



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias