
CULTIVO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CACTÁCEAS AMENAZADAS DEL GÉNERO *Turbinicarpus*

MA. DE LOURDES DE LA ROSA-CARRILLO,
MANUEL S. DOMÍNGUEZ-ROSALES, MARTHA E. PÉREZ-REYES
y EUGENIO PÉREZ-MOLPHE-BALCH

RESUMEN

Se exploró la capacidad de regeneración y propagación *in vitro* de 14 especies y subespecies de *Turbinicarpus* (Cactaceae), todas ellas amenazadas debido a la intensa colecta ilegal y a la destrucción de su hábitat. En todos los casos se logró la formación de brotes múltiples por activación de areolas. Se utilizó medio de Murashige y Skoog (MS) pH 5,7 con 30g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ agar y varios tratamientos con las citocininas 6-bencilaminopurina (BAP) o 6-(γ,γ -dimetilalilamino) purina (2iP). Las eficiencias por especie en un solo ciclo de proliferación (60 \pm 5 días) estuvieron entre 4,0 brotes por explante en *T. hoferi*, en un tratamiento con 4,44 μ M BAP, hasta 26,3 brotes por explante en *T. pseudomacrolepis* subsp. *lausseri*

con 3,33 μ M BAP. Siete de las especies estudiadas respondieron mejor cuando se usó BAP, mientras que la 2iP arrojó mejores resultados en cuatro de ellas. Las tres especies restantes no mostraron diferencias en su respuesta a estas citocininas. El enraizamiento de los brotes se logró en medio MS con 2g·l⁻¹ carbón activado (CA), 2,46 μ M ácido indolbutírico (AIB) o 2,85 μ M ácido indolacético (AIA), con frecuencias de 54 a 97%. La supervivencia de las plantas transferidas a suelo fue de entre 40 a 92%, dependiendo de la especie. Con estos resultados fue posible llevar a cabo la propagación masiva *in vitro* de las especies trabajadas, lo que puede constituir una herramienta importante para su conservación y uso racional.

La familia Cactaceae es nativa de América y se distribuye desde el sur de Canadá hasta Argentina, siendo México el país que posee la mayor diversidad de especies dentro de este grupo, además de un alto índice (78%) de endemismo (Hernández y Godínez, 1994). Desafortunadamente, 255 taxones de cactáceas mexicanas están amenazados, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana-059-ECOL-2001. En regulaciones internacionales, 65 taxones se encuentran en el Libro Rojo de la IUCN y 41 en el

Apéndice I de la CITES (Guzmán *et al.*, 2007). Entre las muchas cactáceas mexicanas amenazadas, resultan de especial interés las del género *Turbinicarpus*, el cual es endémico de las partes centro y sur del Desierto Chihuahuense, el que se extiende desde la Meseta Central de México hasta los EEUU. Este género incluye varias especies y subespecies de cactus pequeños que son muy apreciadas por los coleccionistas debido a su belleza, a la facilidad con la que producen flores y a su talla reducida, que permite el mantenimiento de grandes colecciones

en espacios mínimos. Lo anterior ha traído como resultado una intensa colecta ilegal que ha afectado a las poblaciones silvestres. Este fenómeno se agrava debido a que muchas de las especies de este género tienen áreas de distribución muy restringidas y su hábitat está siendo constantemente degradado (Anderson, 2001). Algunas actividades humanas que se desarrollan en estas áreas de distribución, tal como la extracción de materiales pétreos, han afectado de manera importante a algunas especies del género (Hernández-Oria *et al.*, 2007). La conser-

PALABRAS CLAVE / Activación de Areolas / Cactáceas / Citocininas / Cultivo *In Vitro* / Especies Amenazadas / Micropropagación /

Recibido: 02/08/2010. Modificado: 17/02/2012. Aceptado: 20/02/2012.

Ma. de Lourdes de la Rosa-Carrillo. Ingeniera Bioquímica y Maestra en Ciencias en Biotecnología Vegetal, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), México. Profesora Investigadora, UAA, México.

Manuel S. Domínguez-Rosales. Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal y Doctor en Ciencias Biológicas, UAA, México. Profesor Investigador, Universidad Autónoma de Guerrero, México.

Martha E. Pérez-Reyes. Ingeniera Química, Instituto Tecnológico de Aguascalientes, México. Técnica Académica Titular y Auxiliar de Investigación, UAA, México.

Eugenio Pérez-Molphe-Balch. Biólogo, UAA, México. Maestro en Ciencias en Biología Vegetal y Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, México. Profesor UAA, México. Dirección: Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas. Ciudad Universitaria. Av. Universidad 940. 20131 Aguascalientes, Ags. México. e-mail: eperezmb@correo.uaa.mx

vacación de las cactáceas del género *Turbinicarpus* se ve también obstaculizada por su lento crecimiento y la pobre capacidad de recuperación de las poblaciones naturales. Esta situación se debe en gran medida a una muy baja producción de semillas aunada a su baja tasa de germinación, que sólo alcanza el 8% en algunas de las especies del género. Esto último se debe tanto a la pérdida de viabilidad como a la existencia de diversos mecanismos de latencia (Flores *et al.*, 2005, Flores *et al.*, 2008).

Por otro lado, el género *Turbinicarpus* es uno de los de mayor interés desde el punto de vista fitoquímico, pues producen diversos alcaloides que podrían tener aplicaciones en farmacología (Štarha *et al.*, 1999). Estos compuestos no han sido estudiados a fondo, y mucho menos aprovechados, debido a la gran dificultad que representa el obtener tejidos de estas plantas en las cantidades requeridas para su extracción a causa de su talla muy reducida, su baja tasa de crecimiento, y su estatus de especies amenazadas.

Una de las alternativas más prometedoras para la conservación y uso racional de este tipo de plantas la constituyen los sistemas de cultivo *in vitro*. La propagación masiva a través de esta técnica ya se ha logrado con buenos resultados en algunas cactáceas mexicanas amenazadas de los géneros *Pelecyphora* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *Ariocarpus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y *Mammillaria* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007). En lo que se refiere a especies del género *Turbinicarpus*, hay reportes en este mismo sentido para *T. laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinckermanus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, *T. subterraneus* y *T. valdezianus* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), mas no los hay para las especies y subespecies incluidas en el presente estudio. Esto adquiere relevancia, ya que en repetidas ocasiones se ha observado que cada especie, o incluso subespecie, de cactácea responde de manera diferente ante las condiciones de cultivo, lo que hace necesario conocer las respuestas de cada una de ellas y desarrollar sistemas de cultivo y propagación masiva *in vitro* particulares para cada taxón (Hubstenberger *et al.*, 1992; Giusti *et al.*, 2002). Asimismo, no obstante los reportes anteriores, el número de especies de cactáceas que han sido trabajadas bajo sistemas de cultivo *in vitro* es mínimo con respecto al número total de taxones amenazados y al gran potencial que esta técnica ha demostrado.

La propagación masiva *in vitro* de cactáceas se ha logrado usando tres vías de regeneración diferentes. Hay reportes de embriogénesis somática en *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), así como de regeneración por organogénesis en *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002) y *Notocactus magnificus* (de Medeiros *et al.*, 2006). Estos sistemas de regeneración pueden ser muy eficientes en cuanto al número de plantas que se producen en un corto tiempo. Sin embargo, cuando se pasa por una etapa de tejido calloso (embriogénesis somática u organogénesis indirectas), estas vías de regeneración no garantizan la integridad genética de los materiales generados, ya que pueden inducir variación somaclonal. La tercera vía de regeneración *in vitro* empleada en cactáceas, incluyendo el presente estudio, es la activación de areolas. Ésta consiste en estimular la brotación de las yemas axilares contenidas en esas estructuras, para luego enraizar y obtener plantas completas a partir de los brotes generados. En este proceso, la probabilidad de producir alteraciones genéticas en las plantas producidas es mucho menor con respecto a las primeras vías mencionadas, debido a que no se pasa por una fase de tejido calloso y sólo se estimula el desarrollo de meristemas preexistentes (Vyscot y Jára, 1984). Esto es lo más deseable cuando se pretende conservar y propagar germoplasma de especies silvestres sin alterarlas genéticamente. La activación de areolas requiere la adición de citocininas al medio de cultivo, siendo las más usadas la bencilaminopurina (BAP), también llamada benciladenina (BA), y la 6-(γ,γ -dimetilalilamino)purina (2iP), en dosis que deben ser determinadas para cada especie.

En este marco, el presente trabajo tuvo por objetivo conocer la capacidad regenerativa *in vitro* a través de la activación de areolas de 14 especies y subespecies del género *Turbinicarpus*. También se buscó inducir el enraizamiento de los brotes generados y establecer en suelo plantas propagadas *in vitro*, para tener así sistemas completos de propagación masiva. Estos sistemas permitirán, en una primera instancia, la producción de grandes cantidades de plantas, lo que disminuirá la presión que la colecta ilegal ejerce sobre las ya muy mermadas poblaciones naturales. En el futuro, y una vez hechos los estudios ecológicos y genéticos pertinentes, las plantas producidas *in vitro* podrían ser reintroducidas al ambiente natural con el fin de regenerar las poblaciones silvestres.

Materiales y Métodos

Los materiales vegetales usados en este trabajo fueron plántulas germinadas *in vitro* de las especies y subespecies *Turbinicarpus bonatzii* Gerhart Frank, *T. hoferi* Lüthy & A.B. Lau, *T. jauernigii* Gerhart Frank, *T. pseudomacrochele* subsp. *lausseri* (L. Diers & Gerhart Frank) Glass, *T. pseudomacrochele* subsp. *pseudomacrochele* (Backeb.) Buxb. & Backeb., *T. rioverdensis* Gerhart Frank, *T. roseiflorus* Backeb., *T. schmiedickeanus* subsp. *dickisoniae* Glass & R.A. Foster, *T. schmiedickeanus* subsp. *gracilis* (Glass & R.A. Foster) Glass, *T. schmiedickeanus* subsp. *macrochele* (Werderm.) N.P. Taylor, *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii* (Shurly) N.P. Taylor, *T. swoboda* L. Diers, *T. valdezianus* subsp. *albiflorus* Pazout in Pazout, Valnicek & Subik y *T. ysabelae* (Schlange) Vác. John & Riha. Estas plántulas fueron obtenidas a partir de la germinación en condiciones axénicas de semillas procedentes tanto de colecciones particulares como de viveros especializados. Las semillas fueron lavadas cinco veces con agua corriente con 0,1% Extran (Merck), luego se colocaron por 1min en etanol 70%, y finalmente se desinfectaron por 25min en blanqueador comercial a base de hipoclorito de sodio 15%. Después de la desinfección, las semillas fueron enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril y se inocularon en condiciones asépticas en frascos de vidrio de 125ml de capacidad con 30ml de medio basal. El medio usado contenía las sales mayores y menores, así como compuestos orgánicos de Murashige y Skoog (1962; MS), todo al 50%. El pH se ajustó a 5,7 y se adicionaron 30g·l⁻¹ de sacarosa y 10g·l⁻¹ de agar (PhytoTechnology®). Los frascos con medio se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15min. Una vez inoculados con la semilla desinfectada, los recipientes de cultivo se sellaron con película autoadherible de PVC (Vitafilm) y se mantuvieron bajo luz continua (lámparas fluorescentes F2T5/4100 K; 54 μ mol·m⁻²·s⁻¹) a 25 \pm 2°C.

Las plántulas obtenidas sirvieron como fuente de explantes para la proliferación *in vitro* a través de la activación de areolas. Sin embargo, debido al número muy reducido de semillas, y por lo tanto de plántulas disponibles en todas las especies, fue necesario realizar varios ciclos preliminares de proliferación *in vitro* del material vegetal. Con este fin, se eliminó la porción basal y raíces de las plántulas generadas a partir de semillas, y la porción apical fue inoculada en medio MS pH 5,7 adicionado con 30g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ agar y 4,44 μ M bencilaminopurina (BAP), con el fin de inducir

la generación de brotes a partir de las areolas. Estos brotes fueron colectados y transferidos a medio MS pH 5,7 adicionado con 30g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ agar y 2g·l⁻¹ carbón activado (CA; PhytoTechnology), para permitir su crecimiento hasta los 12-20mm. En algunos casos fue necesario llevar a cabo 2 o 3 ciclos de proliferación como el descrito para reunir el material necesario para los experimentos de regeneración. Para esto, se eliminó tanto la porción basal como la apical de los brotes. El tejido restante se cortó transversalmente para obtener rebanadas de ~4mm de grosor conteniendo una o dos filas de areolas, dependiendo de la especie. Estos segmentos transversales fueron inoculados con la parte cortada en contacto con el medio, y manteniendo su polaridad original, en medio de cultivo MS pH 5,7 adicionado con 30g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ agar y cinco diferentes concentraciones de BAP (2,22; 3,33; 4,44; 5,55; 6,66μM) y de 6-(γ,γ-dimetilalilamino)purina (2iP) (4,92; 7,38; 9,84; 14,76 y 19,68μM), ambas citocininas de la marca PhytoTechnology. Lo anterior se hizo con el fin de seleccionar el tratamiento más eficiente para la generación de brotes a partir de areolas para cada una de las especies trabajadas. Para estos experimentos se utilizaron 20-30 explantes por tratamiento, dependiendo de la disponibilidad de material de cada especie, inoculándose dos explantes por recipiente de cultivo. Los experimentos completos se realizaron al menos dos veces de manera independiente para cada especie. Para las réplicas, se utilizó material vegetal generado en los experimentos previos. La incubación de los cultivos se realizó en las mismas condiciones antes descritas y a los 60 ±5 días de incubación se determinó el número de brotes generados en cada explante. Este es el tiempo en que fue evidente la presencia de brotes diferenciados surgiendo a partir de las areolas de los explantes inoculados en todas las especies. Con el fin de determinar el efecto de los tratamientos probados dentro de cada una de las especies, los datos se analizaron mediante ANDEVA, y la comparación entre las medias se hizo mediante la prueba de Tukey (p≤0,05).

Para el enraizamiento, los brotes generados en los experimentos antes descritos se colectaron y transfirieron a recipientes de cultivo de polipropileno de 500ml de capacidad (Phytotechnology) con 100ml de medio MS pH 5,7 adicionado con 30g·l⁻¹ sacarosa y 10g·l⁻¹ agar. Se probaron tres tratamientos: a) 2g·l⁻¹ de CA, b) 2,46μM de ácido indolbutírico (AIB) y c) 2,85μM de ácido indolacético (AIA). En este medio se mantuvieron por 45 días, transcurridos los cua-

les se determinó el porcentaje de brotes que habían generado raíces ≥1cm de longitud. Para estos experimentos se probaron al menos 100 brotes por tratamiento (10 por recipiente de cultivo). Con el fin de seleccionar el tratamiento más eficiente para cada especie, los datos se analizaron mediante ANDEVA, y la comparación entre las medias se hizo mediante la prueba de Tukey (p≤0,05).

Una vez que los brotes desarrollaron raíces, se realizó el proceso de adaptación a suelo. Para ello, primero se retiró el sello y se aflojó un poco la tapa del recipiente, y así se dejó por 7 días. Luego, las plantas fueron retiradas del medio de cultivo y éste se eliminó completamente con la ayuda de agua corriente. Finalmente, se sembraron en macetas de plástico con una mezcla de tierra comercial para macetas y arena (1:1) previamente humedecida. Las macetas se colocaron en bolsas de plástico cerradas y se mantuvieron en una cámara bioclimática a 26 ±2°C con un fotoperíodo de 16h de luz (lámparas fluorescentes F21T5/4100 K; 54μmol·m⁻²·s⁻¹) por 8h de oscuridad. A los 2-3 días se comenzó a abrir la bolsa, la cual se quitó por completo a los 15 días. Las macetas se mantuvieron por 30 días más en la cámara bioclimática y luego se llevaron al invernadero, regándose cada 72h. La supervivencia en suelo de las plantas generadas *in vitro* se determinó a los 30-45 días. Se consideró que la adaptación fue exitosa cuando la planta dio señales de reiniciar su crecimiento ya en condiciones *ex vitro*.

Resultados y Discusión

La germinación *in vitro* fue muy variable entre las especies trabajadas. Esta variabilidad se observó tanto en los porcentajes finales de germinación (35-85%), como en el tiempo en que ésta ocurrió (12-60 días). Cabe mencionar que se contó con un número reducido de semillas, y en la mayoría de las especies no se dispuso de información acerca del tiempo y condiciones de almacenamiento de las mismas. Por estos motivos, la información obtenida en este punto del trabajo no permite generar conclusiones acerca de la tasa de germinación de las especies estudiadas. En trabajos similares se ha reportado tasas de germinación *in vitro* de 41,7% para *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), y de 46-90% para otras ocho especies y subespecies de *Turbinicarpus* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). Una tasa considerablemente menor (13%) se reportó para el género *Notocactus* (de Medeiros *et al.*, 2006).

Se requirieron de 3 a 6 meses a partir de la germinación para ob-

tener las plántulas de 4-5mm de altura, necesarias para los experimentos siguientes. En todos los casos, el número de plántulas que se generaron fue bajo (15-50), por lo que se tuvo que recurrir a uno o varios ciclos preliminares de proliferación a fin de generar el material vegetal suficiente para los experimentos de regeneración *in vitro*. Esos ciclos preliminares se hicieron en medio de cultivo con 4,44μM de BAP, ya que se tenía información previa de que esta citocinina, en la concentración usada, era capaz de inducir la producción de brotes en las especies de ese género (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005); esto aun cuando no siempre es éste el tratamiento más eficiente para lograr ese objetivo, y en ocasiones produce efectos no deseados como la proliferación excesiva de tejido calloso. En los ciclos preliminares de proliferación se obtuvieron promedios de 4-12 brotes por explante, dependiendo de la especie. De esta forma se generó el material vegetal necesario para los experimentos cuyos resultados se describen a continuación.

Al probar los dos tipos y las cinco diferentes concentraciones de citocininas, se obtuvieron brotes a partir de la activación de areolas en todas las especies y en todos los tratamientos. Sin embargo, la eficiencia del proceso fue muy variable (Tabla I, Figuras 1a-j). Cabe mencionar que la toma de resultados se hizo a los 60 ±5 días de incubación con citocininas, debido a que en ese momento ya se observaron brotes bien diferenciados en todas las especies. Sin embargo, la producción de brotes fue un proceso continuo en tanto no se agotara el medio de cultivo ni la actividad de la citocinina añadida al mismo. Por ese motivo, a tiempos de incubación más prolongados, el número promedio de brotes por explante fue proporcionalmente mayor (Figuras 1e, j). Lo anterior se debe a la proliferación secundaria, esto es, a la producción de nuevos brotes a partir de las areolas de los brotes generados en primer término. Este fenómeno ha sido reportado ya en otras cactáceas. En el género *Pelecyphora*, por ejemplo, es posible producir en promedio 136 brotes por explante en tiempos de incubación prolongados (180 días; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002). En cuanto a la producción de brotes en las especies estudiadas, a los 60 ±5 días de incubación, *T. hoferi* fue la especie que mostró la eficiencia menor, ya que en el mejor tratamiento de acuerdo al análisis estadístico (4,44μM BAP), se obtuvo un promedio de 4,0 brotes por cada explante. Sin embargo, es posible llevar a cabo varios ciclos sucesivos de proliferación inoculando los brotes generados nuevamente en el medio con citocinina, mul-

TABLA I
EFECTO DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE CITOCININA EN LA GENERACIÓN DE BROTES A TRAVÉS
DE LA ACTIVACIÓN DE AREOLAS EN 14 ESPECIES O SUBESPECIES DE *Turbincarpus*

Especie	Citocinina	Brotes por explante (promedio)*									
		BAP (μM)					2iP (μM)				
		2,22	3,33	4,44	5,55	6,66	4,92	7,38	9,84	14,76	19,68
<i>T. bonatzii</i>		3,5 c	3,9 bc	4,1 bc	3,7 bc	3,2 c	3,9 bc	9,50 a	11,3 a	4,8 b	4,4 bc
<i>T. hoferi</i>		3,7 a	2,1 b	4,0 a	3,7 a	2,9 ab	2,0 b	1,7 bc	1,5 c	1,8 bc	2,1 b
<i>T. jauernigii</i>		1,6 c	2,4 bc	2,9 b	4,4 a	4,0 a	2,7 b	3,0 b	3,1 b	2,4 bc	2,6 b
<i>T. pseudomacroechele</i> subsp. <i>lausseri</i>		11,4 b	26,3 a	23,9 a	10,5 bc	12,8 b	6,4 d	8,2 c	9,3 c	10,7 bc	7,1 cd
<i>T. pseudomacroechele</i> subsp. <i>pseudomacroechele</i>		4,3 c	6,8 bc	9,1 b	12,2 a	9,5 ab	5,8 c	5,6 c	7,6 b	7,3 b	4,3 c
<i>T. rioverdensis</i>		3,8 a	4,0 a	4,3 a	3,2 ab	2,4 b	3,5 ab	3,0 b	3,0 b	3,2 ab	3,7 a
<i>T. roseiflorus</i>		5,9 ab	5,2 b	4,6 b	5,1 b	5,3 b	5,7 ab	4,1 b	2,2 c	4,1 b	7,5 a
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>dickisoniae</i>		7,3 b	6,4 bc	6,8 bc	5,2 c	4,8 c	11,0 a	5,3 c	5,7 bc	7,6 b	6,0 bc
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>gracilis</i>		4,6 c	6,3 b	8,0 a	8,5 a	9,4 a	6,4 b	6,2 b	6,4 b	4,2 c	4,5 c
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>macrochele</i>		10,1 a	9,3 a	7,2 bc	7,9 b	8,5 ab	9,2 a	8,8 ab	10,0 a	7,9 b	6,3 c
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>schwarzii</i>		4,5 c	4,2 c	4,0 cd	4,3 c	3,2 d	6,5 b	6,5 b	11,9 a	10,7 a	4,5 c
<i>T. swobodae</i>		5,5 a	4,9 a	4,3 ab	3,6 b	3,1 bc	3,2 bc	3,4 b	2,8 c	2,6 c	1,9 c
<i>T. valdezius</i> subsp. <i>albiflorus</i>		7,0 b	6,4 b	6,8 b	5,1 bc	4,8 c	11,1a	6,2 bc	6,7 b	10,3 a	10,7 a
<i>T. ysabelae</i>		10,1 a	6,9 b	5,3 bc	6,2 b	4,8 c	5,8 b	5,4 bc	4,5 c	4,7 c	3,1 d

*Medias con letras iguales dentro de la misma especie no son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0,05$). Resultados tomados a los 60 \pm 5 días de incubación.

tiplicando el material de forma exponencial. Así, con esta eficiencia de cuatro brotes por explante, sería en teoría posible obtener 4096 brotes a partir de un solo explante en un año (6 ciclos de pro-

pagación). En el otro extremo, entre las especies estudiadas está *T. pseudomacroechele* subsp. *lausseri*, en la que se obtuvo un promedio de 26,3 brotes por explante en el mismo período, usando en este caso

3,33 μM BAP. De acuerdo al razonamiento antes descrito, con esta eficiencia sería en teoría posible generar más de 300 \times 10⁶ brotes en igual tiempo. De acuerdo al análisis de los resultados, en siete de las

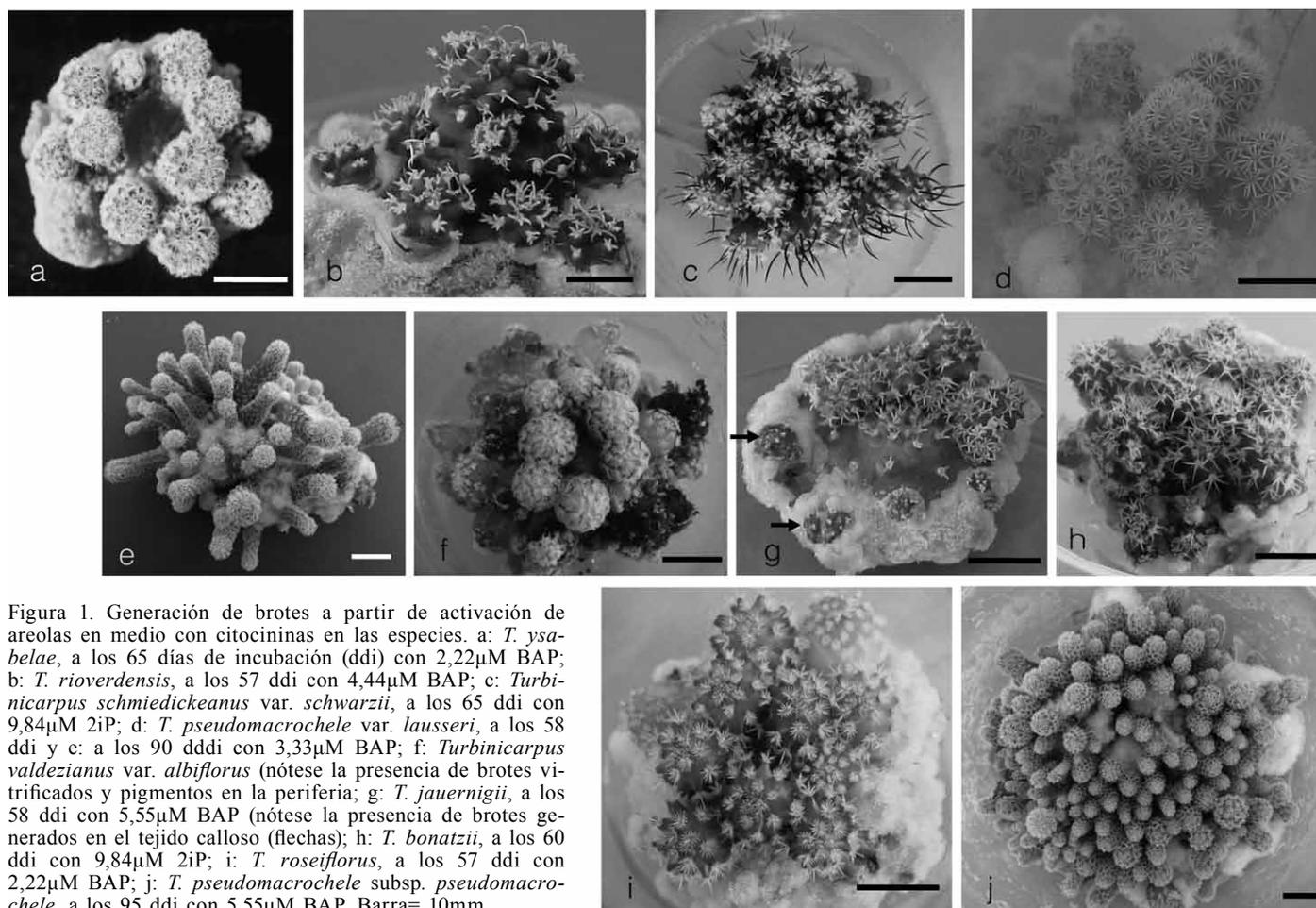


Figura 1. Generación de brotes a partir de activación de areolas en medio con citocininas en las especies. a: *T. ysabelae*, a los 65 días de incubación (ddi) con 2,22 μM BAP; b: *T. rioverdensis*, a los 57 ddi con 4,44 μM BAP; c: *Turbincarpus schmiedickeanus* var. *schwarzii*, a los 65 ddi con 9,84 μM 2iP; d: *T. pseudomacroechele* var. *lausseri*, a los 58 ddi y e: a los 90 ddi con 3,33 μM BAP; f: *Turbincarpus valdezius* var. *albiflorus* (nótese la presencia de brotes vitrificados y pigmentos en la periferia); g: *T. jauernigii*, a los 58 ddi con 5,55 μM BAP (nótese la presencia de brotes generados en el tejido calloso (flechas)); h: *T. bonatzii*, a los 60 ddi con 9,84 μM 2iP; i: *T. roseiflorus*, a los 57 ddi con 2,22 μM BAP; j: *T. pseudomacroechele* subsp. *pseudomacroechele*, a los 95 ddi con 5,55 μM BAP. Barra= 10mm

TABLA II
EVALUACIÓN DEL ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES OBTENIDOS
DE CADA ESPECIE O SUBESPECIE DE *Turbincarpus* Y SOBREVIVENCIA
DE LAS PLÁNTULAS *EX VITRO*

Especie	Tratamiento	Enraizamiento (%) [¶]			Supervivencia <i>ex vitro</i> (%) [§]
		2 g·l ⁻¹ CA	2,46μM AIB	2,85μM AIA	
<i>T. bonatzii</i>		71 a	52 b	56 b	55
<i>T. hoferi</i>		59 a	24 c	36 b	40
<i>T. jauernigii</i>		86 a	67 b	43 c	45
<i>T. pseudomacrochele</i> subsp. <i>lausseri</i>		97 a	73 b	58 c	76
<i>T. pseudomacrochele</i> subsp. <i>pseudomacrochele</i>		76 a	59 b	51 b	83
<i>T. rioverdensis</i>		42 b	54 a	22 c	76
<i>T. roseiflorus</i>		64 a	44 b	40 b	58
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>dickisoniae</i>		56 a	26 b	32 b	65
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>gracilis</i>		58 b	77 a	86 a	90
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>macrochele</i>		96 a	90 a	90 a	92
<i>T. schmiedickeanus</i> subsp. <i>schwarzii</i>		81 a	62 b	54 b	56
<i>T. swobodae</i>		85 a	66 b	54 b	55
<i>T. valdezianus</i> subsp. <i>albiflorus</i>		61 a	43 b	36 b	60
<i>T. ysabelae</i>		50 b	96 a	40 b	60

[¶] Datos tomados a los 45 d de incubación. Valores con letras iguales dentro de la misma especie no son estadísticamente diferentes (Tukey p≤0,05).

[§] Datos tomados a los 30-45 días después de la transferencia a suelo.

especies estudiadas, *T. hoferi*, *T. jauernigii*, *T. pseudomacrochele* subsp. *lausseri*, *T. pseudomacrochele* subsp. *pseudomacrochele*, *T. schmiedickeanus* subsp. *gracilis*, *T. swobodae* y *T. ysabelae*, la mejor respuesta ocurrió al utilizar BAP, mientras que en cuatro, *T. bonatzii*, *T. schmiedickeanus* subsp. *dickisoniae*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii* y *T. valdezianus* subsp. *albiflorus*, la 2iP fue la citocinina más eficiente. En las tres especies restantes, *T. rioverdensis*, *T. roseiflorus* y *T. schmiedickeanus* subsp. *macrochele*, las dos citocininas mostraron un efecto similar, ya que entre los mejores tratamientos hubo algunos con BAP y otros con 2iP (Tabla I). En un trabajo anterior, realizado con otras 8 especies y subespecies de este género, se observó un rango de generación de brotes por explante de 7,8 a 19,7 siendo la respuesta de seis especies más eficiente con BAP, mientras que otras dos respondieron mejor a la 2iP (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). En comparación, la capacidad de regeneración *in vitro* reportada para *Ariocarpus kotschoubeyanus* fue de 6,3 brotes por explante (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), para *Notocactus magnificus* fue de 6,0 brotes por explante (de Medeiros *et al.*, 2006) y en diez especies de *Mammillaria*, los valores oscilaron entre 2,4 y 17,4 brotes por explante (Ramírez-Malagón *et al.*, 2007).

En lo que se refiere a otro tipo de respuestas al cultivo *in vitro*, en varias de las especies trabajadas se observó la producción de tejido calloso, sobre todo en los explantes tratados con BAP. Sin embargo, ese tejido no fue de-

masiado abundante, ni impidió la generación de brotes. En el caso de la especie *Turbincarpus valdezianus* var. *albiflorus*, se observó la producción de abundantes pigmentos, seguramente del grupo de las betalainas, en el tejido calloso (Figura 1f). Este fenómeno ha sido reportado y estudiado en el género *Mammillaria*, en donde se generaron callos productores de betaxantinas (Santos-Díaz *et al.*, 2005). En *T. valdezianus* var. *albiflorus* se presentó además la vitrificación o hiperhidratación de ~35% del total de brotes generados. Cabe aclarar que estos brotes hiperhidratados, al no tener la capacidad de generar una planta viable, no fueron contabilizados para los resultados que se presentan en este trabajo. En el resto de las especies, la hiperhidratación de los brotes generados fue prácticamente nula. Esto se debió muy posiblemente a la inclusión en el medio de 10g·l⁻¹ de agar en lugar de los 7-9g·l⁻¹ que normalmente se utilizan en este medio. Con ello la disponibilidad de agua en el medio de cultivo se reduce y se evita la hiperhidratación de los tejidos. En otros trabajos se reportan problemas mucho más severos relacionados con la hiperhidratación de los brotes generados *in vitro*, llegándose a presentar ese fenómeno hasta en el 85% de los mismos (Giusti *et al.*, 2002). Por otro lado, en la especie *T. jauernigii* se observó también la generación de callo y la producción de brotes a partir de éste (Figura 1g). Esos brotes fueron más pequeños que los producidos en las areolas y tampoco fueron incluidos en los resultados mostrados en la Tabla I. La capacidad del tejido calloso para generar brotes adventicios a través

de organogénesis indirecta ya se había reportado para *T. laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001). Sin embargo, como ese proceso puede favorecer la aparición de variación somaclonal en las plantas generadas (Oliveira *et al.*, 1995), no es recomendable para la conservación de la integridad genética de los materiales vegetales sometidos a este sistema de propagación.

En cuanto al enraizamiento de los brotes generados *in vitro*, éste ocurrió de manera más eficiente en medio basal sin auxinas y con 2g·l⁻¹ CA en 11 de las especies trabajadas (Tabla II). En estas especies, los tratamientos con auxinas provocaron la aparición de tejido calloso en la parte basal de muchos de los brotes, inhibiendo así la aparición de raíces. Eso coincide con lo reportado por Santos-Díaz *et al.* (2003) para

Pelecyphora aselliformis. Sólo en las especies *Turbincarpus rioverdensis*, *T. schmiedickeanus* subsp. *gracilis* y *T. ysabelae*, el enraizamiento fue más eficiente en presencia de auxinas. En siete de las especies trabajadas, *T. jauernigii*, *T. pseudomacrochele* subsp. *lausseri*, *T. schmiedickeanus* subsp. *gracilis*, *T. schmiedickeanus* subsp. *macrochele*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii*, *T. swobodae* y *T. ysabelae*, la eficiencia de enraizamiento puede considerarse satisfactoria, ya que superó el 80%. En las otras especies, *T. bonatzii*, *T. hoferi*, *T. pseudomacrochele* subsp. *pseudomacrochele*, *T. rioverdensis*, *T. roseiflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *dickisoniae* y *T. valdezianus* subsp. *albiflorus*, se observaron eficiencias de entre 56 y 76%, por lo que sería importante encontrar tratamientos que pudieran elevar estos valores. Las tasas de enraizamiento *in vitro* reportadas en un trabajo anterior para otras ocho especies y subespecies de *Turbincarpus* oscilaron entre 54 y 94% (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). En otros géneros se han reportado eficiencias menores, por ejemplo 45% de enraizamiento para *Notocactus* (de Medeiros *et al.*, 2006).

La morfología de los sistemas radicales generados *in vitro* fue variable entre las especies trabajadas (Figuras 2a-e). Durante la etapa de enraizamiento, también se observó el crecimiento de los brotes, los cuales alcanzaron un mayor vigor. En otros casos, como en *T. pseudomacrochele* var. *lausseri*, los brotes en medio de enraizamiento cambiaron su morfología juvenil por la adulta (Figura 2e), llegando incluso a producir flores

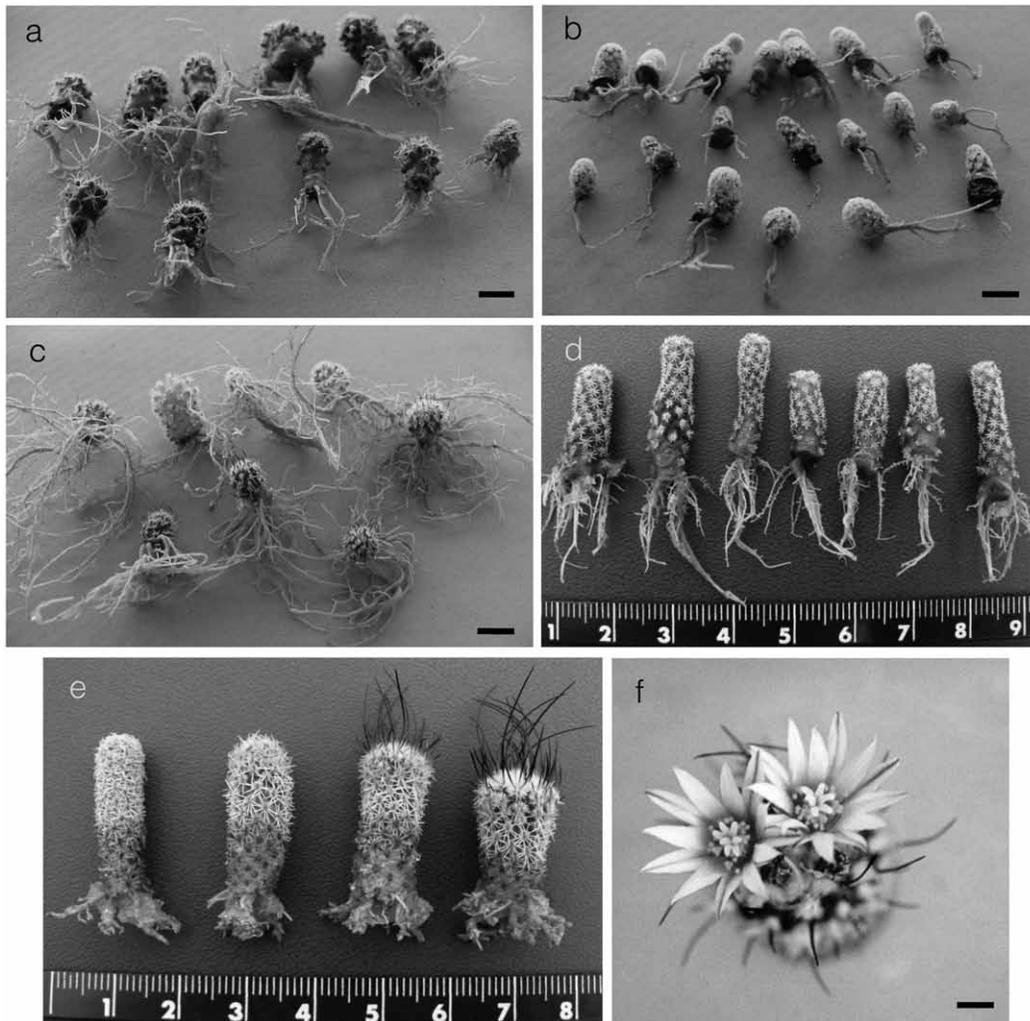


Figura 2. Plantas generadas mediante el enraizamiento de brotes generados *in vitro* de a: *Turbinicarpus bonatzii*, b: *T. valdezianus* var. *Albiflorus*, c: *T. roseiflorus*, d: *T. pseudomacroechele* subsp. *Pseudomacroechele*, e: *T. pseudomacroechele* subsp. *lausseri* (nótese la morfología juvenil de las dos plantas de la izquierda, en contraste con la morfología adulta de las de la derecha), f: floración *in vitro* de un brote de *T. schmieedickeanus* subsp. *gracilis*. Barra= 10mn

in vitro, fenómeno observado en *T. schmieedickeanus* subsp. *gracilis* (Figura 2f). Esto confirma lo reportado por Malda *et al.* (1999), en el sentido de que el cultivo *in vitro* acelera el desarrollo de las cactáceas acortando notablemente su período juvenil, constituyéndose éste en una ventaja adicional de esta técnica.

La supervivencia en suelo de las plantas generadas *in vitro* osciló entre 40 y 92% (Tabla II). En el caso de los valores más bajos, sería recomendable probar otros sustratos con el fin de incrementar la frecuencia de supervivencia. En su hábitat natural, estas especies se encuentran en suelos pedregosos, muy pobres en materia orgánica, y en algunos casos calcáreos. Eso podría considerarse para probar otros sustratos o mezclas que pudieran incrementar la tasa de supervivencia en suelo de algunas de aquellas especies que mostraron una baja efi-

ciencia en esta etapa. Eso sería indispensable para contar con un sistema completo y eficiente de propagación masiva *in vitro*. En otras especies de *Turbinicarpus* se han reportado tasas de supervivencia en suelo de 65 a 98% (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), mientras que en géneros diferentes hay valores de 76 a 92% (Giusti *et al.*, 2002). En algunas cactáceas, como *Notocactus*, este proceso es crítico y sólo se llega a una eficiencia del 20% (de Medeiros *et al.*, 2006).

En conclusión, se demostró que la regeneración y propagación masiva *in vitro* fueron posibles en las 14 especies y subespecies de *Turbinicarpus* estudiadas. Esta tecnología tiene el potencial de ser una herramienta importante para la explotación racional y conservación de este recurso natural. Finalmente, debe subrayarse que esos sistemas de cultivo *in vitro* podrían consti-

tuirse en una fuente ilimitada de material vegetal para ser utilizado en el estudio y aprovechamiento de los compuestos químicos producidos por estas plantas, sin necesidad de afectar a las poblaciones silvestres.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Sectorial de Investigación Ambiental SEMARNAT-CONACYT (SEMARNAT-2002-C01-0057) y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por las becas para estudios de Maestría otorgadas a ML-DRC y MSDR.

REFERENCIAS

- Anderson EF (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, OR, EEUU. 776 pp.
- Dávila-Figueroa CA, De La Rosa-Carrillo ML, Pérez-Molphe-Balch E (2005) *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 540-545.
- De Medeiros LA, Roberval-Cassia SR, Gallo LA, De Oliveira ET, Payao-Dematte ES (2006) *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 165-169.
- Flores J, Arredondo A, Jurado E (2005) Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus. *Nat. Areas J.* 25: 183-187.
- Flores J, Jurado E, Jiménez-Bremont JF (2008) Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroideus* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Sp. Biol.* 23: 43-46.
- Giusti P, Vitti D, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F, Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci. Hort.* 95: 319-332.
- Guzmán U, Arias S, Dávila P (2007) *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. UNAM-CONABIO, México DF, México. 315 pp.
- Hernández HM, Godínez AH (1994) Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mex.* 26: 33-52.
- Hernández-Oria JG, Chávez-Martínez RJ, Sánchez-Martínez E (2007) Factores de riesgo en las cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del Desierto Chihuahuense, México. *Interciencia* 32: 728-734.
- Hubstenberger JF, Clayton PW, Phillips GC (1992) Micropropagation of cacti (Cactaceae). En Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 20. High-Tech*

- and *Micropropagation IV*. Springer. Berlin, Alemania. pp. 49-68.
- Malda G, Backhaus RA, Martín C (1999) Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 1-9.
- Mata-Rosas M, Monroy-De La Rosa MA, Moebius-Goldammer K, Chávez-Ávila VM (2001) Micropropagation of *Turbini- carpus laui*, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 400-404.
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chávez-Ávila V (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cac- taceae), an endemic and endangered Mexi- can species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 39: 388-393.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Oliveira SA, Machado MFPS, Prioli AJ (1995) *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 31: 47-50.
- Pelah D, Kaushik RA, Mizrahi Y, Sitrit Y (2002) Organogenesis in the vine cactus *Selenice- reus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 81-84.
- Pérez-Molphe-Balch E, Dávila-Figueroa CA (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 73-78.
- Ramírez-Malagón R, Aguilar-Ramírez I, Boroda- nenko A, Pérez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43:660-665.
- Santos-Díaz MS, Méndez-Ontiveros R, Arredon- do-Gómez A, Santos-Díaz ML (2003) *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 39: 480-484.
- Santos-Díaz MS, Velásquez-García Y, González- Chávez MM (2005) Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheid- weiler (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 619-626.
- Štarha R, Chybidziurová A, Lacný Z (1999) Alkaloids of the genus *Turbiniacarpus* (Cactaceae). *Biochem. Systemat. Ecol.* 27: 839-841.
- Vyscot J, Jára Z (1984) Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59: 445-449.

IN VITRO CULTURE AND PROPAGATION OF THREATENED CACTI OF THE *Turbiniacarpus* GENUS

Ma. de Lourdes de la Rosa-Carrillo, Manuel S. Domínguez-Rosales, Martha E. Pérez-Reyes and Eugenio Pérez-Molphe-Balch

SUMMARY

In vitro regeneration and propagation capacity was explored in 14 species and subspecies of *Turbiniacarpus* (Cactaceae), all threatened due to the intensive illegal collection and to the destruction of their habitats. In all cases multiple shoot formation on explants from *in vitro* germinated plantlets was achieved through areole activation. Murashige and Skoog medium, pH 5.7, was used, supplemented with 30g·l⁻¹ sucrose, 10g·l⁻¹ agar and several treatments with the cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP) or 6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine (2iP). Efficiencies ranged from 4.0 shoots per explant in *T. hoferi*, in a treatment with 4.44μM BAP, up to 26.3 shoots per explant in *T. pseudomacroleche* subsp. *lausseri*, this using 3.33μM BAP. These results were obtained

in a single proliferation cycle (60 ±5 days). Seven of the studied species responded better when BAP was used, while 2iP induced better results in four species. The three remaining species showed no differences in their response to both cytokinins. Rooting of *in vitro* generated shoots was achieved on MS basal media with 2g·l⁻¹ activated charcoal, 2.46μM indole-3-butyric acid (IBA) or 2.85μM indole-3-acetic acid, with frequencies ranging from 54 to 97%. Frequencies of survival of the plants, once transferred to soil, were from 40 to 92%. With these results, it was possible to carry out the massive *in vitro* propagation of the utilized species; which can represent an important tool for their conservation and rational use.

CULTIVO E PROPAGAÇÃO IN VITRO DE CACTÁCEAS AMEAÇADAS DO GÊNERO *Turbiniacarpus*

Ma. de Lourdes de la Rosa-Carrillo, Manuel S. Domínguez-Rosales, Martha E. Pérez-Reyes e Eugenio Pérez-Molphe-Balch

RESUMO

Explorou-se a capacidade de regeneração e propagação *in vitro* de 14 espécies e sub espécies de *Turbiniacarpus* (Cactaceae), todas elas ameaçadas devido à intensa coleta ilegal e à destruição de seu habitat. Em todos os casos se conseguiu a formação de brotes múltiplos por ativação de aréolas. Utilizou-se meio de Murashige e Skoog (MS) pH 5,7 com 30g·l⁻¹ sacarose, 10g·l⁻¹ ágar e vários tratamentos com as citocininas 6-bencilaminopurina (BAP) o 6-(γ,γ-dimetilalilamino)purina (2iP). As eficiências por espécie em um só ciclo de proliferação (60 ±5 dias) estiveram entre 4,0 brotes por explante em *T. hoferi*, em um tratamento com 4,44μM BAP, até 26,3 brotes por explante em *T. pseudomacroleche* subsp. *lausseri* com 3,33μM

BAP. Sete das espécies estudadas responderam melhor quando se usou BAP, enquanto que a 2iP mostrou melhores resultados em quatro delas. As três espécies restantes não mostraram diferenças em sua resposta a estas citocininas. O enraizamento dos brotos se conseguiu em meio MS com 2g·l⁻¹ carvão ativado (CA), 2,46μM ácido indolbutírico (AIB) o 2,85μM ácido indolacético (AIA), com frequências de 54 a 97%. A sobrevivência das plantas transferidas a solo foi de entre 40 a 92%, dependendo da espécie. Com estes resultados foi possível realizar a propagação massiva *in vitro* das espécies trabalhadas, o que pode constituir uma ferramenta importante para sua conservação e uso racional.