

Propagación *in vitro* de especies del género *Turbinicarpus*

In vitro propagation of *Turbinicarpus* genera plants

Leticia Escobedo-Bocardo¹, Hermila Trinidad García-Osuna², Ana Bertaud-de León³, Francisca Ramírez-Godina¹, Lucía Rosales-Marines¹

E-mail: lescobedo@uaaan.mx

¹Depto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México. C.P. 25315. ²Calli, Productores del Desierto SPR de RL. Saltillo, Coah., México. ³Museo del Desierto. Prol. Pérez Treviño # 3745 Saltillo, Coah., México.

Abstract

The plant species that belong to *Turbinicarpus* genera, have been extracted from their natural ambiance, almost causing extinction, reason that makes necessary the establishment of an *in vitro* propagation system that accelerates their multiplication in number of generated plants and needed time, for making this possible, *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis*, *T. hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* and *T. pseudomacroechele* ssp. *krainzianus* seeds were used after being superficially sterilized and placed during 48 h in distilled water for imbibition; then it sowed in containers with nutritious medium of Murashige and Skoog with 50 % of basal composition and incubated for three months until the germination. The vitroplants gotten of the germination phase were used to begin micropropagation, from those, some of them were taken from seedlings of 0.5 cm of diameter and 0.7cm of length, planted in glass bottles with 20 mL of Murashige and Skoog nutritious medium. Was used a randomized experimental design with factorial arrangement; factor A were *Turbinicarpus* species, factor B were kinds of cytokinins (2iP 5 mg L⁻¹, Zeatina 1 mg L⁻¹, BAP 1 mg L⁻¹, K 1 mg L⁻¹) and factor C auxin (ANA 0.05 mg L⁻¹), having a total of 32 treatments; sixty days after, the number of seedlings was measured. Was found significant differences between species and kinds of cytokinins, but not for interactions where auxin took participation. The genotype with more seedlings per each explant was: *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* followed by *T. pseudomacroechele*, *T. hoferi* and *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis*; about the probed cytokinins, the Zeatina generated the largest amount of seedlings per explants, followed by 2iP and BAP. The treatments with auxin (ANA), presented the smallest number of seedlings for each explant.

Key words: *Turbinicarpus* ssp, cactaceae, biotechnology, plant growth regulators.

Resumen

Las especies pertenecientes al género *Turbinicarpus* han sido extraídas de su medio natural causando casi su extinción, por lo que es urgente establecer un sistema de propagación *in vitro* que acelere su multiplicación, tanto en tiempo como en número de

plántulas generadas. Por esta razón el objetivo del presente estudio fue determinar el tipo y combinación de auxinas y citocininas del medio de cultivo para propagar *in vitro* brotes de cuatro especies del género *Turbinicarpus*. Se utilizaron semillas de *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis*, *T. hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* and *T. pseudomacrochele* ssp. *Krainzianus*, las cuales se esterilizaron superficialmente y se colocaron en imbibición por 48 h en agua destilada estéril, luego se sembraron en frascos con medio nutritivo de Murashige y Skoog al 50 % de su composición basal y se incubaron por 3 meses hasta su germinación. Las vitro plantas obtenidas de la fase de germinación se utilizaron para iniciar la micropropagación, de ellas se tomaron brotes de 0.5cm de diámetro y 0.7cm de longitud que se sembraron en frascos de vidrio con 20 mL de medio nutritivo Murashige y Skoog. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A correspondió a especies de *Turbinicarpus*, el factor B a tipos de citocininas (2iP 5 mg L⁻¹, Zeatina 1 mg L⁻¹, BAP 1 mg L⁻¹, K 1 mg L⁻¹) y el factor C auxina (ANA 0.05 mg L⁻¹), teniendo un total de 32 tratamientos; a los 60 d se evaluó el número de brotes. Se encontraron diferencias significativas entre especies y tipos de citocinina, pero no para las interacciones donde participó la auxina. El genotipo que produjo el mayor número de brotes por explante fue *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*, seguida de *T. pseudomacrochele*, *T. hoferi* y *T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis*; en cuanto a las citocininas probadas la Zeatina generó la mayor cantidad de brotes por explante, seguida por 2iP y BAP. Los tratamientos con auxina (ANA) presentaron el menor número de brotes por explante.

Palabras clave: *Turbinicarpus* ssp, cactáceas, biotecnología, reguladores de crecimiento.

Introducción

Cactaceae es la familia de plantas más representativa de las zonas áridas y semiáridas de México, donde podemos encontrar el 70 % de las especies existentes en el mundo (Paredes *et al.*, 2000). El género *Turbinicarpus* se compone de 20 especies distribuidas en la Sierra Madre Oriental y las altas planicies de los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Hofer, 1994). Muchas de las especies de *Turbinicarpus* son muy apreciadas y buscadas pues son consideradas raras y bellas, por lo que han sido extraídas de su medio natural causando casi su extinción, por lo que todas las especies del género *Turbinicarpus* están incluidas en la lista roja del CITES (Apéndice I) y en la NOM-059-ECOL-2001.

La propagación de cactáceas a partir de semillas o en forma vegetativa es muy lenta por lo que es urgente el desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* que permita salvarlas de la extinción, además de contribuir a su conservación como recurso genético y a su posible aprovechamiento comercial. La propagación *in vitro* permite romper el letargo que presentan sus semillas para luego acelerar el proceso de propagación, tanto en tiempo como en número de plántulas generadas, pues con este sistema se pueden propagar todas las plántulas deseadas a partir de una sola semilla

(Malda *et al.*, 1999), por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar el tipo y combinación de reguladores de crecimiento (auxina y citocinina) del medio de cultivo para propagar *in vitro* brotes de *Turbinicarpus*, (*T. schmiedickeanus* ssp. *gracilis*, *T. hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* y *T. pseudomacrochele*).

Metodología experimental

Germinación *in vitro* de semillas

Las semillas se sometieron a un proceso de esterilización que consistió en sumergirlas en etanol 70 % por un minuto; enjuagarlas con agua destilada estéril por un minuto; colocarlas en hipoclorito de sodio al 10 % por 20 min y finalmente enjuagarlas tres veces con agua destilada estéril por un minuto; enseguida se colocaron en imbibición por 48 h en agua destilada estéril y luego se sembraron bajo condiciones de asepsia absoluta en frascos con medio nutritivo de Murashige y Skoog al 50 % de su composición basal, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 250 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 8 g L⁻¹ de agar con pH = 5.7 y se esterilizó a 120 °C durante 15 min. Los frascos conteniendo las semillas se llevaron al cuarto de incubación donde permanecieron por 3 meses.

Desarrollo de vitroplantas

Una vez que las semillas germinaron, las vitroplantas se trasvasaron a frascos gerber con 20 mL de medio nutritivo de Murashige y Skoog, adicionado con 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg L⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico), 20 g L⁻¹ de sacarosa 8 g L⁻¹ de agar con pH = 5.8 y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a temperatura de 25 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h e intensidad lumínica de 2000 lux durante 30 d para obtener plantas de tamaño adecuado para extraer los explantes a partir de los cuales se inició la micropropagación.

Propagación *in Vitro*

Las vitroplantas de *T. hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus* y *T. pseudomacrochele* se seccionaron de manera horizontal en tres partes, tomando la parte basal y media de 0.5 cm de diámetro y 0.7 cm de longitud como explante y eliminando la porción del ápice, para *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *gracilis* cada plántula completa se consideró como un explante, los que se sembraron en frascos gerber con 20 ml de medio nutritivo Murashige y Skoog adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 250 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl y 8 g L⁻¹ de agar con pH = 5.8 y se esterilizó a 120 °C durante 15 min. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a temperatura de 25 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h e intensidad lumínica de 2000 lux.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A correspondió a especies de *Turbinicarpus*, el factor B a tipos de citocininas (6-(y,y-dimetilalilaminopurina (2iP) 5 mg L⁻¹, Zeatina 1 mg L⁻¹, 6-bencilaminopurina (BAP) 1 mg L⁻¹, Kinetina (K) 1 mg L⁻¹) y el factor C a concentraciones de auxina (ácido naftalenacético (ANA) 0.0 y 0.05 mg L⁻¹), teniendo un total de 32 tratamientos. Se colocaron cuatro brotes por frasco gerber considerando cada frasco como una repetición y se establecieron 5 repeticiones por tratamiento. Se evaluó el número de brotes por tratamiento a los 60 d; finalmente se practicaron pruebas de comparación de medias de rango múltiple de Duncan para encontrar la diferencia entre tratamientos con un nivel de significancia (P≤0.05).

Resultados y discusión

Los cuadrados medios y valores de Fc para número de brotes generados por explante a los 60 d de *Turbinicarpus hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. y *T. pseudomacrochele* en medio nutritivo MS mostraron que los factores: especies, citocininas y auxina, así como la interacción de especie-citocininas resultaron ser altamente significativos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cuadrados medios y valores de Fc para número de brotes por explante de *T. hoferi*, *T. schmiedickeanus* ssp. y *T. pseudomacrochele* a los 60 días.

Fuentes de Variación	CM	F _c
Especie	30.0546875	41.69 **
Citocinina	13.9192708	19.31 **
Auxina	9.7515625	13.53 **
Especie x Citocinina	11.8251736	16.40 **
Especie x Auxina	0.6776042	0.94 ^{NS}
Citocinina x Auxina	0.8234375	1.14 ^{NS}
Especie x Citocinina x Auxina	0.4703125	0.65 ^{NS}
Error	0.7208984	
Total		

** , Valor altamente significativo; NS, Valor no significativo

La comparación de medias DMS, ($P \leq 0.05$) para número de brotes por explante generados por las cuatro especies de *Turbinicarpus* mostró que el genotipo que presentó mejor respuesta fue *T. schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* con 4.6 brotes por explante; seguida por *T. pseudomacrochele* con 3.8, *T. hoferi* con 3.4 y en último lugar *T. schmidickeanus* ssp. *gracilis* con 2.5. (Cuadro 2). Lo anterior coincide con lo reportado por Pérez *et al.* (1995), quienes al desarrollar sistemas de propagación *in vitro* obtuvieron respuestas muy variables entre las especies para generación de brotes.

Cuadro 2. Comparación de medias (DMS, 0.05) para número de brotes por explante de *T. hoferi*, *T. schmidickeanus* ssp. y *T. pseudomacrochele* a los 60 días.

Especies	Media	
<i>T. schmidickeanus</i> ssp. <i>klinkerianus</i>	4.6438	a
<i>T. pseudomacrochele</i>	3.8375	b
<i>T. hoferi</i>	3.4188	c
<i>T. schmidickeanus</i> ssp. <i>gracilis</i>	2.5625	d

En cuanto a tipos de Citocinina, la Zeatina (1 mg L^{-1}) presentó el mayor promedio de brotes por explante (4.6 brotes) mientras que el tratamiento con el promedio más bajo fue el de Kinetina (1 mg L^{-1}), con 3.1 brotes (Cuadro 3). Diversos autores han utilizado citocininas para la morfogénesis en cactáceas, al respecto Velázquez y Soltero (2001) encontraron que la Kinetina y el 2IP presentaron efectos altamente significativos sobre la producción de brotes de *Epithelantha micromeris*, Ortiz y Vargas (1995) observaron que la activación de areolas por la Kinetina se traduce en la formación de brotes y plántulas completas; mientras que Dabekaussen *et al.* (1991) mencionan que la citocinina BAP es un requisito esencial para la activación de areolas, lo que permitió la micropropagación de *Sulcorebutia alba*.

Cuadro 3. Comparación de medias (DMS, 0.05) entre Citocininas para número de brotes por explante a los 60 días.

Citocininas	Media	
Zeatina (1 mg L^{-1})	4.6425	a
2IP (5 mg L^{-1})	3.5188	b
BAP (1 mg L^{-1})	3.3750	b c
Kinetina (1 mg L^{-1})	3.1063	c

La comparación de medias para número de brotes por explante a los 60 d con diferentes citocininas mostró que *T. schmidickeanus* ssp. *klinkerianus* fue la especie que presentó la mayor cantidad de brotes en el tratamiento de Zeatina (1 mg L^{-1}) con 5.9 (Figura 1 y 2), seguida de *T. hoferi* que en el mismo tratamiento generó un promedio de 5.9 brotes por explante, en tercer sitio como especie *T. pseudomacrochele* produjo la mayor cantidad de brotes, 5.3 en el tratamiento con 2IP (5 mg L^{-1}) y finalmente *T. schmidickeanus* ssp. *gracilis* se comportó mejor ante BAP (1 mg L^{-1}) con 3.9 brotes por explante en promedio.

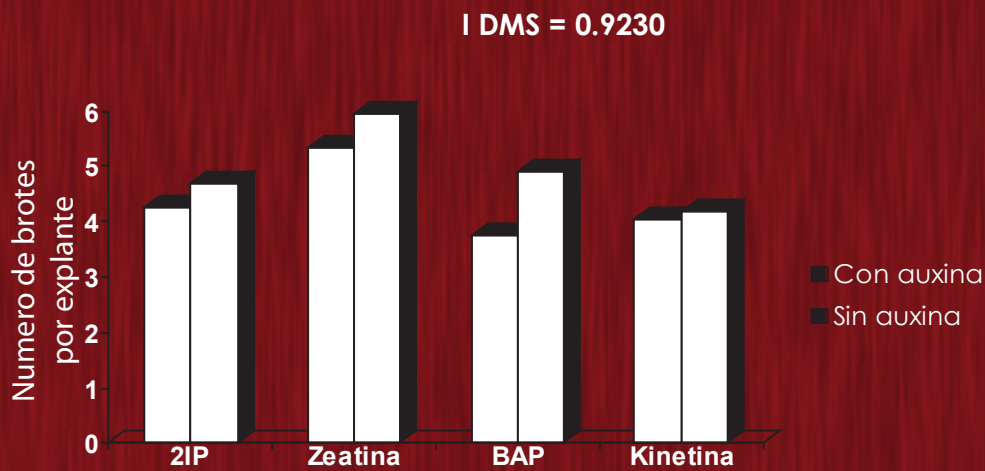


Figura 2. Comparación de medias para número de brotes por explante de *Turbinicarpus klinkerianus* a los 60 días con diferentes citocininas

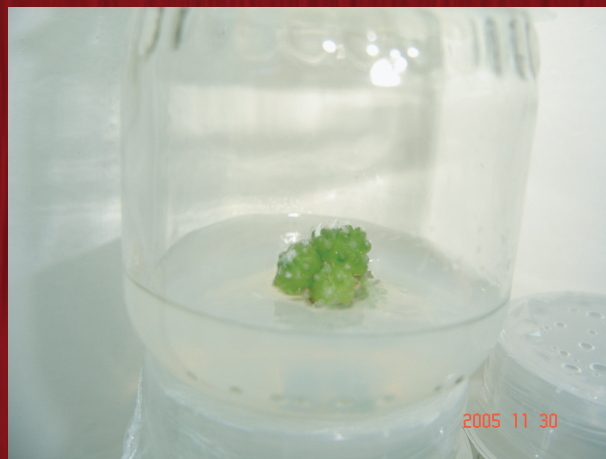


Figura 1. Brotes de *Turbinicarpus schmidickeanus* ssp. *klinkerianus*

de manera endógena. Al respecto varios autores han encontrado que la mejor respuesta para la producción de brotes en cultivo *in vitro* de algunas especies de cactáceas se presenta con bajas concentraciones de auxina, en ausencia de la misma y en combinación con concentraciones moderadas a altas de citocininas (Clayton *et al.*, 1990; Arenas *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 1995; Mata *et al.*, 2001)

Conclusiones

La especie que produjo la mayor cantidad de brotes por explante fue *Turbinicarpus schmiedickeanus* ssp. *klinkerianus*, Zeatina fue la mejor citocinina y no se requirió la presencia de auxina en el medio nutritivo para la proliferación de los brotes.

Literatura Citada

- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribu Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2): 337 - 343.
- Debekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. H. Spaans. 1991. Factors Affecting Areole Activation *In vitro* in the Cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Scientia Horticulturae 46(3-4): 283-294.
- Hofer, A. 1994. Quelques Considérations Sur le Genre *Turbinicarpus*. Succulentas (France) 18: 22 - 29.
- Malda, G., H. Suzan and R. Backhaus. 1999. *In Vitro* Culture as a Potential Method for the Conservation of Endangered Plants Possessing Crassulacean Acid Metabolism. Scientia Horticulturae 81: 71-87.
- Mata, R. M. M.A. Monroy de la Rosa, K. M. Goldammer y V. M. Chavez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass *et Foster*, an Endemic and Endangered Species. *In vitro* Cell. Dev. Biol.Plant. 37: 400-404.
- Norma Oficial Mexicana: NOM-059-ECOL-2001. 2001. Protección ambiental - Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres - Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio - Lista de Especies en Riesgo. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, D.F.
- Ortiz M.,J. G. y M. Vargas F. 1995. Propagación *In Vitro* de *Heliocereus elegantissimus* (Britton y Rose) var. *elegantissimus* (Cactaceae). Cactáceas y Suculentas Mexicanas XL (2): 41-45.
- Paredes A., R., T. R. Van Devender y R. S. Felger. 2000 Cactáceas de Sonora, México: su Diversidad, Uso y Conservación. Primera edición. IMADES - ASDM Press. Tucson, Arizona.
- Pérez M. B., E., E. Villalobos A., E. Meza R. y H. Lizalde V. 1995. Desarrollo de Sistemas para la Propagación Masiva y Conservación de Germoplasma *In Vitro* de 20 Especies Mexicanas de Cactáceas. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Investigación y Ciencia 15: 36 - 43.
- Velázquez E., L. E. y R. Soltero Q. 2001. "Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber *ex* Britton *et* Rose. var. *Micromeris*, Cactaceae. Cactáceas y Suculentas Mexicanas XL VI (3): 56-62.