

# MICROPROPAGACIÓN DE *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha CACTACEA ORNAMENTAL DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE, EN ESTATUS DE RIESGO

## MICROPROPAGATION OF *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha, ORNAMENTAL CACTUS OF THE CHIHUAHUA DESERT, AT RISK STATUS

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez<sup>1</sup>, Areli González Cortes<sup>2</sup>, Alberto Arredondo Gómez<sup>3</sup>, Leobardo Iracheta Donjuan<sup>4</sup>,  
Sofía Comparan Sánchez<sup>5</sup> y Rebeca Casique Valdés<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se desarrolló un protocolo en cuatro etapas para la micropropagación de *Turbincarpus knuthianus*, una cactácea en estatus de riesgo, para la obtención de plantas de maceta con tamaño comercial uniforme, en cantidades suficientes y con calidad fitosanitaria. El método de propagación propuesto es eficiente comparado con el tradicional; es una nueva tecnología de producción factible de aplicarse en el sistema-producto ornamental, bajo el esquema de laboratorio-invernadero. Las semillas de esta especie son quiescentes y pueden establecerse *in vitro* en el medio MS al 50%, adicionado con 8.65 mM de AG<sub>3</sub> con un porcentaje de germinación de 75%. La inducción de brotes se logró a partir de segmentos de hipocotilo, como explantes, en medio de cultivo MS con diferentes tratamientos. Se determinó que el tipo y concentración de fitohormona influyen en la tasa de multiplicación, y generan hasta 10 brotes por explante; la cinetina (KIN) en interacción 10:1 con AIB en baja concentración es la promotora de este efecto. Durante la aclimatación se observó que la aplicación de 1.5 x 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de *Azospirillum brasilense* tiene un efecto positivo en el proceso rizogénico, de tal manera que se forman hasta 6 raíces por planta con 2.5 cm de longitud. Con esta metodología es posible regenerar especies en estatus de riesgo de importancia ecológica para el Desierto Chihuahuense y se optimizan los procesos biológicos para la producción de plantas de ornato.

**Palabras clave:** BA-N6-benzyladenina, cactáceas, inoculación de *Azospirillum brasilense*, medio Murashige y Skoog, micropropagación, *Turbincarpus knuthianus*.

### ABSTRACT

A four stage protocol was developed for the micropropagation of *Turbincarpus knuthianus*, an ornamental cactus in risk status, in order to produce plants with standard commercial-sized pots in sufficient amount and good phytosanitary quality. The method here described is efficient compared to the traditional method of propagation; it is a new production technology that can be applied to the ornamental product system under the laboratory-greenhouse scheme. The seeds of this species are quiescent and can be established *in vitro* on MS medium at 50% supplemented with 8.65 2M of GA<sub>3</sub>, with 75% of germination. The induction of shoots and seedlings was obtained by setting segments of explants on MS medium with different treatments. It was determined that the type and concentration of phytohormone affect the multiplication rate and produce as much as 10 shoots/explant; kinetin (KIN) in interaction with AIB 10:1 in low concentrations favors this effect. During the acclimatization stage, it was observed that the application of 1.5 x10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> of *Azospirillum brasilense* promoted a positive reaction of the rhizogenic process, as much as 6 roots 2.5 cm long per plant were formed. With this technology, species of ecological importance in risk status can be restored to the Chihuahuan Desert and the biological processes for the production of ornamental plants can be optimized.

**Key words:** BA-N6-benzyladenine, cacti, inoculation of *Azospirillum brasilense*, Murashige and Skoog medium, micropropagation, *Turbincarpus knuthianus*.

Fecha de recepción: 28 de junio de 2011

Fecha de aceptación: 24 de julio de 2011

<sup>1</sup> Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP. Correo-e: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

<sup>2</sup> Centro de Capacitación de Tecnología de Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

<sup>3</sup> Campo Experimental San Luis Potosí. CIRNE-INIFAP.

<sup>4</sup> Campo Experimental Rosario Izapa. CIRPAS-INIFAP.

<sup>5</sup> Departamento. Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

## INTRODUCCIÓN

*Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha, comúnmente llamada "biznaguita" o "biznaga cono invertido de Knuth", es una cactácea pequeña de 6 cm de diámetro, con tallo esférico, color verde oscuro con espinas agrupadas en aréolas; presenta flores vistosas muy numerosas de 25 mm de longitud de color carmín rosado brillante. Por su morfología y aspecto es apreciada por coleccionistas expertos y aficionados nacionales y extranjeros, quienes la utilizan como planta de ornato (Hunt *et al.*, 2006).

Sus poblaciones naturales se distribuyen en el estado de San Luis Potosí, que forma parte del Desierto Chihuahuense, donde presentan un alto grado de deterioro. Son plantas consideradas endémicas, de lento crecimiento y escasas en su hábitat natural, sujetas a protección especial (Pr), ya que están amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad; por lo tanto, es necesario propiciar su recuperación y conservación (SEMARNAT, 2010).

Dado que la flora del país es parte del patrimonio nacional y que es prioritaria su regeneración, sobre todo de aquellas especies con estatus de riesgo, la micropropagación constituye una forma de conservación *ex situ*, a partir del grado de deterioro que tienen sus poblaciones naturales y el interés que existe por algunos taxa como plantas de ornato, en países europeos y asiáticos.

Los métodos de conservación *ex situ* se basan en el mantenimiento del material biológico en bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro* y en colecciones de plantas (en campo, viveros o jardines botánicos). Los dos primeros son de los sistemas más convenientes para el germoplasma, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica; sin embargo, en especies como *T. knuthianus*, cuyas poblaciones no son de alta densidad y tienen una reducida producción de semillas y de brotes laterales, además de un bajo porcentaje de germinación, es necesario implementar opciones de conservación *ex situ* como el cultivo de tejidos vegetales (CTV), con el propósito de multiplicarlo, puesto que cuenta con pocos individuos y tiene dificultades para propagarse por métodos convencionales (Villavicencio *et al.*, 2005).

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 (1979a), 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 meristemas preexistentes y a partir de estos se pueden generar uno o más brotes (Murashige, 1974; Villalobos y Thorpe, 1985; Pierik, 1987).

## INTRODUCTION

*Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha, known as "biznaguita" or "biznaga cono invertido de Knuth" (Knuth's inverted cone biznaga), is a small cactus of 6 cm diameter, with a dark green spherical stem, with spines grouped in areolas; it has numerous bright 25 mm long of carmine-rose flowers. From its morphology and look it is very appreciated by expert collectors as well as by national and foreign amateurs, who use it as an ornamental plant (Hunt, *et al.* 2006).

Natural populations of the species are distributed in San Luis Potosi State, which is a part of the Chihuahuan Desert, where they suffer great deterioration. They are considered endemic plants of slow growth and scarce in their habitat, are subject to special protection (Pr), since they are threatened by several factors that negatively influence their viability; thus, it is necessary to favor their restoration and conservation (SEMARNAT, 2010).

As flora is part of the national wealth and its regeneration, a priority, particularly of those species at risk status, micropropagation is a way of *ex situ* conservation, starting from the deterioration that their natural populations have and the prevailing interest for some taxa as ornamental plants in countries of Europe and Asia.

*Ex situ* conservation methods are based on the preservation of biological material in seed banks, *in vitro* cultivation banks and in plant collections (in the field, nurseries or botanical gardens). The first two are more convenient systems for germ plasm, since they allow the storage of a great genetic variability in an economic and practical way; however, in species like *T. knuthianus*, that have a scarce density, low seed and lateral shoot production and reduced germination per cent, it is necessary to implement *ex situ* conservation options such as plant tissue cultures (PTC), in order to multiply it, as it has few individuals and difficulties for propagation by conventional methods (Villavicencio, *et al.*, 2005).

*In vitro* PTC or micropropagation is based on the total potentiality concept of vegetal cells, which establishes that it is possible to develop normal and complete plants from explants (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). In this respect, Johnson and Emino (1979a), Hubstenberger *et al.* (1992) and Giusti *et al.* (2002) proposed clonal propagation through micropropagation, as a feasible way for Cactaceae, with which it might be possible to contribute to the rescue and conservation of this phylogenetic resource. This is a system in which tissues or organs are used as explants and are taken from one or more donating plants, which have pre-existing meristems and, from them on, shoots can be produced (Murashige, 1974; Villalobos and Thorpe, 1985; Pierik, 1987).

En cactáceas los brotes se obtienen de yemas axilares que se desarrollan *in vitro*; estas estructuras están contenidas en areolas o mamilas y su procedencia pueden ser segmentos de plantas de vivero (Vyskot y Jara, 1984; Escobar, 1985; Yassen-Mohamed *et al.*, 1995), campo (Clayton *et al.*, 1990) y de plántulas germinadas *in vitro* (Fay y Gratton, 1992).

Algunos autores señalan que en el cultivo de yemas axilares aún existen varias incógnitas por resolver; sin embargo, este método de clonación resulta eficiente en especies útiles como es el caso de *T. knuthianus* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Hubstenberger *et al.*, 1992).

Dada la importancia ecológica y económica que tiene este recurso fitogenético para las zonas semiáridas del desierto Chihuahuense y para el sector ornamental se desarrolló un protocolo para su micropropagación, en el que también se consideró el efecto que produce el inoculante de *Azospirillum brasilense*, por ser una bacteria que incide en el proceso rizogénico, como se ha comprobado en *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L. y en plantas propagadas *in vitro* como; jojoba, caña de azúcar, papa y mandioca (Carletti *et al.*, 2003; Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Okon, 1985).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se utilizaron semillas de una colecta masal de poblaciones naturales ubicadas en los municipios de Guadalcázar, Cerritos y Villa Hidalgo en el estado de San Luis Potosí. En cada localidad se hizo una caracterización del medio físico, que incluyó: la altitud, precipitación, temperatura, textura del suelo, pendiente, orientación de la pendiente y vegetación asociada (Figura 1, Cuadro 1).

In Cactaceae, the shoots are taken from axillary buds that develop *in vitro*; these structures are contained in areolas and mamilas and their origin might be segments of nursery plants (Vyskot and Jara, 1984; Escobar, 1985; Yassen-Mohamed *et al.*, 1995), field specimens (Clayton *et al.*, 1990) or seedlings germinated *in vitro* (Fay and Gratton, 1992).

Some authors point out that in axillary bud cultivation there are still several questions to be solved; however, this clonation method proved to be efficient for useful species such as *T. knuthianus* (Rodríguez-Garay and Rubluo, 1992; Hubstenberger *et al.*, 1992).

Since this phylogenetic resource is important from an ecological and economic stand point for the semiarid zones of the Chihuahuan Desert and for ornamental endings, a protocol for its micropropagation was developed, in which it was considered the effect of *Azospirillum brasilense* as inoculant since it is a bacterium that affects the rhizogenic process, as has been probed by *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. and in plants propagated *in vitro* such as jojoba, sugar cane, potatoes and tapioca (Carletti *et al.*, 2003; Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Okon, 1985).

## MATERIALS Y METHODS

### Genetic Material

The seeds that were used came from a massal collection taken at locations of natural populations, at Guadalcázar, Cerritos and Villa Hidalgo in San Luis Potosí State. In each location the environment was described through the following data: altitude, precipitation, temperature, soil texture, slope, hillside and associated vegetation (Figure 1, Table 1).

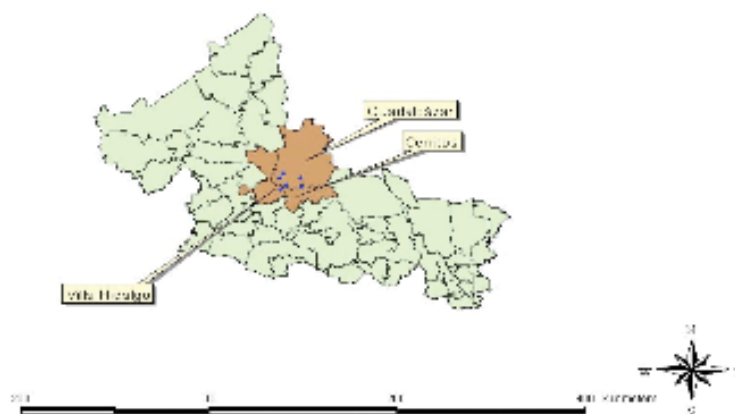


Figura 1. Distribución de *Turbinicarpus knuthianus* en San Luis Potosí, México.

Figure 1. Distribution of *Turbinicarpus knuthianus* in San Luis Potosí State, Mexico.

Cuadro 1. Principales características ecológicas de las poblaciones de *Turbinicarpus knuthianus* en San Luis Potosí, México.  
 Table 1. Main ecological characteristics of *Turbinicarpus knuthianus* populations in San Luis Potosí, Mexico.

Clima	Precipitación (mm)	Temperatura	Unidad de suelo	Textura	Altitud (m)
BSohw	Lluvias de verano 300 a 400	Árido, semicálido	Xerosol háplico	Media	1,500 a 2,000
		Temperatura de 18°C y 22°C, Temperatura del mes más frío < 18°C,	Xerosol gypsicó		1,000 a 1,500
		Temperatura del mes más caliente > 22°C. Temperatura máxima 34 a 36°C			

Etapa 1. Establecimiento de semillas en un cultivo aséptico

Se evaluó la germinación *in vitro* de *T. knuthianus* mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, en el cual se consideró como factor A: dos tipos de medio (MBG1= 0.6% agar + 87.64 mM de C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> y MBG2= MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%. El factor B consistió en dos tratamientos: sin C1= 0.0 mM de AG<sub>3</sub> y con aplicación de ácido giberélico, C2= 8.65 mM de AG<sub>3</sub> adicionado al medio de cultivo como promotor de la germinación. Se usaron semillas de una colecta masal, desinfectadas de acuerdo al protocolo de Villavicencio *et al.* (2009), con 60 días de colecta, para 30 semillas y tres repeticiones por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron cada siete días, durante un período de nueve semanas, las variables consideradas fueron la velocidad (VG) y el porcentaje de germinación (PG).

Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes

Mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2X6 se establecieron segmentos de hipocotilo, obtenido de las plántulas germinadas *in vitro*, en un medio para la inducción de brotes (MIB), el cual se adicionó con una relación citocinina-auxina 10:1. El factor A correspondió a los dos tipos de fitohormona (F); cinetina 6-furfuryl aminopurina (Kin) y 6-bencil aminopurina (BA). Como factor B se evaluaron seis concentraciones (C) de estas citocininas (T1=0.46, T2=0.69, T3=1.16, T4=2.32, T5=3.48 y T6=4.64 mM de Kin) y (T1=0.44, T2=0.66, T3=1.10, T4=2.21, T5=3.30 y T6=4.40 mM de BA), combinadas con su proporción correspondiente de auxina (T1=0.41, T2= 0.61, T3=1.03, T4=2.07, T5=3.1 y T6=4.13 x 10<sup>-1</sup> μM de AIB), así mismo se incluyó un tratamiento sin fitohormonas. Como unidad experimental se establecieron tres explantes por frasco con 10 repeticiones por tratamiento. A las ocho semanas se registró el número de brotes (NB) y la altura (A) de los mismos, en mm.

Stage 1. Seed establishment in an aseptic culture

*In vitro* *T. knuthianus* germination was assessed through a completely randomized experimental design with a 2x2 factorial arrangement, in which the following elements were considered as A Factor: (MBG1= 0.6% agar + 87.64 C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> mM and MBG2= MS (Murashige and Skoog, 1962). Factor B consisted in two treatments: without C1= 0.0 mM de AG<sub>3</sub> and with application of gibberellic acid, C2= 8.65 mM de AG<sub>3</sub> which was added to the culture media as a stimulant for germination. The seeds that were used came from a masal collection, were disinfected according to the protocol of Villavicencio *et al.* (2009), with 60 collection days, 30 seeds and three replications per treatment. Assessments were made every seven days, during a nine week period, the variables were speed (GS) and germination percent (GP).

Stage 2. Shoot multiplication or induction

Through a completely randomized experimental design with a 2x6 factorial arrangement hypocotyls, which came from the *in vitro* germinated seedlings segments, were established in a shoot induction medium (SIM) to which a qitocinine-auxine 10:1 relation was added. Factor A matched the two phytohormone (F) types; kinetine, 6-furfuryl aminopurine (Kin) and 6-Benzyl aminopurine (BA). As factor B six concentrations of these qitocinines (C) were assessed (T1=0.46, T2=0.69, T3=1.16, T4=2.32, T5=3.48 y T6=4.64 mM de Kin) and (T1=0.44, T2=0.66, T3=1.10, T4=2.21, T5=3.30 y T6=4.40 mM de BA), combined with their corresponding auxine proportion (T1=0.41, T2= 0.61, T3=1.03, T4=2.07, T5=3.1 y T6=4.13 x 10<sup>-1</sup> μM de AIB); also, a phytohormone treatment was included. As experimental unit three explants per bottle with 10 replications by treatment were established. After 8 weeks, the number of shoots (SN) and their height (mm) were recorded.

Condiciones de incubación.- En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo del CIRNE-INIFAP se hicieron las dos primeras etapas anteriores. Las semillas se colocaron en tubos Erlenmeyer, con un volumen de 5 mL de medio de cultivo. Las plántulas se subcultivaron en frascos Gerber<sup>®</sup> de 70 mL de capacidad, con un volumen de 20 mL de medio de cultivo. Los subcultivos en la etapa de multiplicación se llevaron a cabo en envases de polipropileno de 500 mL con un volumen de 50 mL de medio de cultivo, que se incubaron a una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  y con un fotoperíodo de  $16 \text{ h luz}^{-1}$ .

### Etapa 3. Enraizamiento y aclimatación

En el invernadero del Campo Experimental Saltillo del CIRNE-INIFAP se establecieron vitro-plantas del 10 mm de altura, mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial  $4 \times 2$ , con tres repeticiones por tratamiento. El factor A consistió en los cuatro tipos de sustratos (S): S1=arena; S2= "peat moss"; S3= negra y S4= mezcla homogénea de las tres anteriores y el factor B en la inoculación de la cepa de *Azospirillum brasilense* en dos concentraciones: CONCI=  $1.5 \times 10^6$  y CONC 2=  $3 \times 10^7$  UFC/ mL<sup>-1</sup>. Además se contó con un testigo por tipo de sustrato, sin aplicación de la cepa. Las aplicaciones del concentrado de la cepa se realizaron cada siete días, con evaluaciones a los 30 días; las variables consideradas fueron: incremento en altura del tallo (IAT), longitud de raíces (LR) y número de raíces (NR).

La información de las etapas se analizó con el procedimiento GLM del sistema de Análisis Estadístico SAS (2002), mediante la prueba de comparación de medias, con una probabilidad del 95% para la selección de los tratamientos significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Etapa 1. Establecimiento de semillas en un cultivo aséptico

Porcentaje de germinación (PG). Se obtuvieron diferencias significativas de la interacción MBGxC, con un efecto positivo en proporciones diferentes, al adicionar el promotor de la germinación, el tratamiento MBG2= MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% + 8.65 mM de  $\text{AG}_3$  del que resultó un PG=75%, mismo que duplicó la emergencia de las vitro-plántulas, con respecto al medio MBG1= 0.6% agar + 87.64 mM  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  + 8.65 mM de  $\text{AG}_3$ . Esto muestra que en condiciones *in vitro* *T. knuthianus* requiere de la adicción de nutrimentos y fitohormonas para promover la imbibición, absorción de oxígeno, activación de enzimas, el transporte de moléculas hidrolizadas hasta el ápice meristemático y con ello activar el proceso de respiración, división celular y alargamiento para el crecimiento de la vitro-plántula.

Incubation conditions.- At the Vegetation Tissue Culture Laboratory of Saltillo Experimental Station of CIRNE-INIFAP the two previous stages were made. The seeds were placed in Erlenmeyer tubes, with 5 mL of culture medium. Seedlings were under cultivated in 70 mL Gerber<sup>®</sup> bottles, with 20 mL of culture medium. The under cultivations in the multiplication stage were carried out in 500 mL polypropylene containers with 50 mL of culture medium, which were incubated at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  and a  $16 \text{ h}^{-1}$  light photoperiod.

### Stage 3. Rooting and acclimatization

In the greenhouse of Saltillo Experimental Station of CIRNE-INIFAP were established vitro-plants of 10 mm high, through a completely randomized experimental design with a  $4 \times 2$  factorial arrangement, with three replications per treatment. Factor A consisted of four kinds of substrates (S): S1=sand; S2= "peat moss"; S3= black and S4= homogeneous mixture of the three mentioned before, and factor B in the inoculation of *Azospirillum brasilense* in two concentrations: CONCI=  $1.5 \times 10^6$  and CONC 2=  $3 \times 10^7$  UFC/ mL<sup>-1</sup>. Also, a control was considered for each kind of substrate, without addition of the fungus. The additions of the fungus concentration were made every 7 days, assessing every 30 days; the variables were: stem height increment (SHI), root length (RL) and number of roots (NR).

The information of the stages was analyzed by means of the GLM procedure of the Statistics Analysis SAS (2002), by the mean comparison test, with a 95% probability for the significant treatment selection.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Stage 1. Seed establishment in an aseptic culture

Germination per cent (GP). Significant differences were obtained from the MBGxC, interaction with a positive effect in different proportions, when the germination stimulant was added, the al 50% MBG2= MS treatment (Murashige and Skoog, 1962) + 8.65 mM of  $\text{AG}_3$  which resulted in 75% of GP, which doubled the emergence of the vitro-plants, in regard to the MBG1 medium = 0.6% agar + 87.64 mM  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  + 8.65 mM de  $\text{AG}_3$ . This shows that in *in vitro*, *T. knuthianus* demands nutriment and phytohormone addition to promote imbibition, oxygen absorption, enzymatic activation, hydrolyzed molecule transport up to meristematic apex and thus, to stimulate the respiration process, cell division and elongation for the growth of the vitro-plant.

With the osmotic potential present in the MBG4 medium = 0.6% agar+87.64 mM of  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  was determined a 10% of PG, which shows that the seed is viable, quiescent and its structure favors imbibition, tissue hydration and digestion,

Con el potencial osmótico presente en el medio MBG4= 0.6% agar+87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  se determinó un PG del 10%, lo que muestra que la semilla es viable, quiescente y que su estructura permite la imbibición, hidratación de los tejidos y la digestión pero no así la translocación y división celular para la emergencia de la vitro-plántula.

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 el cual influye el medio de cultivo que se utilice como lo refieren Dutra *et al.*, 2008; Kauth *et al.*, 2006 y Malda *et al.*, 1999.

La modificación al medio de cultivo *in vitro* se ha realizado en otras cactáceas (*Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton *et Rose* para favorecer el metabolismo celular de la semilla, activar el crecimiento del embrión y el proceso enzimático de los tegumentos, para que la cubierta de la semilla se rompa y emerja una nueva vitro-plántula (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002) (Figura 2).

but not translocation, and cell division for the emergence of the vitro-plant.

According to Maiti *et al.* (1994) species with seeds of this kind have a thin test and only demand favorable environmental conditions for their germination, since there is a strong relation between the ultrastructure of the seed and the germination process, in which the culture medium has an influence that is used as Dutra *et al.*, 2008; Kauth *et al.*, 2006 and Malda *et al.*, 1999 refer.

The modification of the medium of the *in vitro* culture has been accomplished with other cacti (*Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran and *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton *et Rose* to stimulate seed cell metabolism, to activate the growth of the embryo and the enzymatic process of teguments, so that the seed cover brakes and emerges a new vitro-plant (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002) (Figure 2).

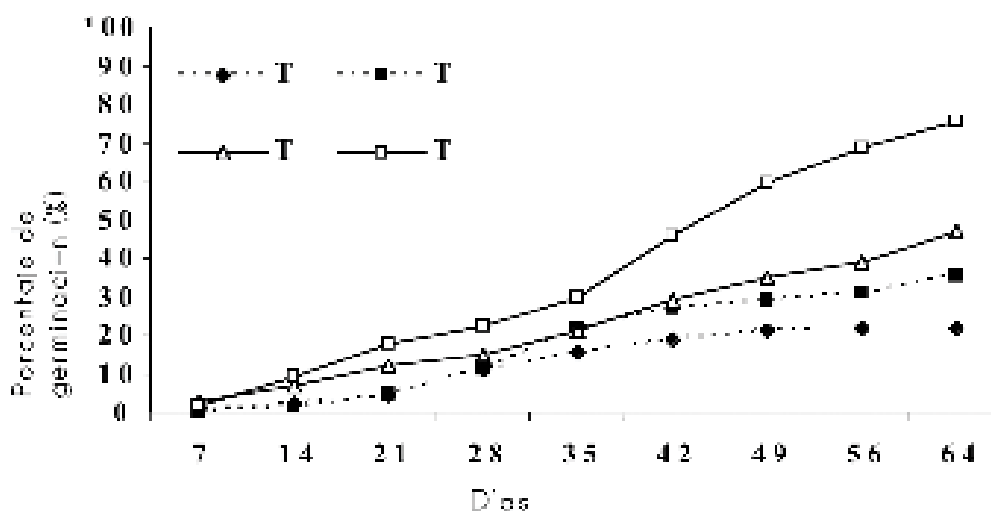


Figura 2. Establecimiento de semillas y aspecto de las plántulas de *Turbinicarpus knuthianus* después de 9 semanas de incubación.

Figure 2. *Turbinicarpus knuthianus* seed establishment and seedling looks after 9 weeks of incubation.

Velocidad de Germinación (VG).- Durante los primeros 14 días de incubación no existieron diferencias significativas en el porcentaje de germinación registrado en los diferentes medios de cultivo (MBG). A partir de los 21 días el valor más alto se registró con el MBG T4, esta tendencia se mantuvo hasta el final del experimento. Se determinó que la velocidad de emergencia de *T. knuthianus* estuvo mediada por el medio de cultivo y por el ácido giberélico ( $AG_3$ ), por lo que requiere de un promotor para la germinación, ya que los niveles endógenos de esta fitohormona no fueron suficientes para activar los procesos enzimáticos, como se mostró con los tratamientos sin fitohormona (T1 y T2) (Figura 3). El mismo comportamiento también se ha observado en *Astrophytum capricorne* (A. Dietr.) Britton et Rose, otra cactácea del Desierto Chihuahuense, y en *Salvia splendens* Sellow ex Roem. et Shult.) para ésta última se ha estimado un PG=87%, con 100 y 150 mg  $MI^{-1}$  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* H. L. Wendl., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Britton et Rose 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).

Germination Speed (GS).-During the first 14 days of incubation there were no significant differences in the germination per cent in the different culture media (MBG). From the 21 days, the highest value came from MBG T4, this tendency stayed as such till the end of the experiment. It was determined that the emergence speed of *T. knuthianus* was affected by the culture medium and the gibberellic acid ( $AG_3$ ), which demands a germination stimulant, since the endogenous levels of this phytohormone were not enough to activate the enzymatic processes, as was shown by the treatments without phytohormone (T1 y T2) (Figure 3). The same behavior has been observed in *Astrophytum capricorne* (A. Dietr.) Britton et Rose, another cactus from the Chihuahuan Desert, and in *Salvia splendens* Sellow ex Roem. et Shult.; for the latter a GP of 87% has been estimated, with 100 y 150 mg  $MI^{-1}$  of  $AG_3$  and a GP of 13% when the stimulant was not added to the medium (De la Rosa-Ibarra and García, 1994; De la Vega and Alizaga, 1987). In *Melocastus caesius* H. L. Wendl., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Britton et Rose and other *Mammillaria* species it was observed that gibberellins do not promote germination if the process is made in the dark (Araya et al., 2000; Rojas, 2008).



(T1= 0.6% agar y 87.64 m M de  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; T2= MS 50%; T3= 0.6% agar + 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  + 8.65 mM de  $AG_3$ ;  
T4= MS 50%+8.65 mM de  $AG_3$ ).

(T1= 0.6% agar and 87.64 m M de  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; T2= MS 50%; T3= 0.6% agar + 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  + 8.65 mM de  $AG_3$ ;  
T4= MS 50%+8.65 mM de  $AG_3$ ).

Figura 3. Velocidad de germinación de *Turbincarpus knuthianus* en diferentes medios de cultivo MBG  
Figure 3. Germination speed of *Turbincarpus knuthianus* in different culture media.

Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes

Existen diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el tipo de fitohormonas (F) utilizadas para la inducción de brotes; con la cinetina (Kin) se obtuvo la mejor respuesta, con un NB promedio de 6.0 brotes por explante con una altura (A) de 6.0 mm, a diferencia de los explantes establecidos en BA, los cuales registraron 30% menor cantidad de brotes con una altura de 5 mm en promedio (cuadros 2 y 3).

Stage 2. Shoot multiplication or induction

There are significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among the type of phytohormones (F) used for the shoot induction; with kinetine (Kin) the best response was obtained, with an average NB of 6.0 shoots per explant of 6.0 mm high (A) which is different compared to those established in BA, which registered 30% less number of shoots with an average height of 5 mm (Tables 2 and 3).

Cuadro 2. Significancia de las variables Número (NB) y Altura (AB) de brotes de *Turbinarpus knuthianus* en la etapa de multiplicación en laboratorio.

Table 2. Significance of the Number (NB) and Height (AB) of *Turbinarpus knuthianus* in the multiplication stage in the laboratory.

F.V.	g.l.	Número de Brotes	Altura de Brotes
Fitohormona (F)	1	*	**
Concentracion (C)	5	**	**
FxC	4	**	NS
FxCxR	25	**	
Error		5173	4863
r <sup>2</sup>		0.53	0.29
CV		23.61	21.12
media		4.43	5.40

F.V. = fuente de variación; g.l.= grados de libertad; NS= No significativo; \* = significativo ( $\alpha \leq 0.05$ ), \*\* = altamente significativo ( $\alpha \leq 0.01$ ); R= Repetición.  
 F.V. = source of variation; g.l.= degrees of freedom; NS= Non significant; \* = significant ( $\alpha \leq 0.05$ ), \*\* = highly significant ( $\alpha \leq 0.01$ ); R= Replication.

Cuadro 3. Influencia de las fitohormonas en el Número (NB) y Altura (AB) de brotes de *Turbinarpus knuthianus* en laboratorio.

Table 3. Influence of phytohormones on the Number (NB) and Height (AB) of shoots of *Turbinarpus knuthianus* in the laboratory.

Fitohormona	Número de Brotes	Altura (mm)
Kin	5.87 a	5.91 b
BA	3.87 b	5.18 b
Sin Fitohormona	2.33 c	8.22 a
CME	3.74	4.93
DMS	1.23	1.42
r <sup>2</sup>	0.71	0.65
CV	23.61	21.12
Media	4.43	5.40

Kin = Cinetina; BA = Bencilaminopurina  
 CME= Cuadrado medio del error; DMS= Diferencia minima significativa; CV= Coeficiente de variación.  
 Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ).  
 Kin = Kinetine; BA = Bencilaminopurine  
 MSE= Mean Square Error; MSD= Minimum Significant Difference; CV= Coefficient of variation  
 Values with the same letter in the columns have not significant differences (Tukey  $P \leq 0.05$ ).



Al comparar este efecto con el tratamiento sin fitohormonas se comprobó que de forma endógena *T. knuthianus* es capaz de producir brotes; sin embargo, su regeneración es baja (2.33 brotes por explante) (Cuadro 3).

Después de analizar los tratamientos como efectos independientes con la prueba de medias ( $P \leq 0.05$ ), se determinó que el tratamiento T12 tiene un efecto positivo en la inducción de brotes, hasta 10 brotes por explante en el medio MIB adicionado con 4.40 mM de BA + 4.13 x  $\mu\text{M}$  de AIB. Lo anterior contrasta con el tratamiento T2, en el cual se obtuvieron 9 brotes por explante en un MIB con una baja concentración de Kin 0.46 mM de Kin + 0.61  $\mu\text{M}$  de AIB. Los resultados muestran que la concentración de citosina-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.

La interacción citosina-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 utilizaron de 8.8-13.31 mM de BA y 0-2.6  $\mu\text{M}$  de ANA en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

Altura de brotes (A). Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin fitohormona, éste último presentó la mayor altura de brotes (8.22 mm), a diferencia de los tratamientos con fitohormonas, mismos que registraron un valor estadísticamente igual a 6 mm, cuando se utilizó cinetina (KIN) (Cuadro 4, Figura 4).

Al analizar el efecto del tipo de fitohormona se observó que la altura de los brotes se reduce al aumentar su número de explantes, como sucedió en los tratamientos T2 y T12, con 4 y 3 mm, respectivamente (Cuadro 4).

Un efecto opuesto se obtuvo cuando se utilizó BA, en los que el número y altura de los brotes se incrementa conforme se aumenta la concentración de la citocinina, de tal manera que con la concentración entre 0.66 a 3.3 mM de BA el número máximo de brotes por explante fue de cuatro con una altura superior a 5 mm; sin embargo, con la concentración más alta (4.40 mM de BA), la tasa de multiplicación es más del doble, pero los brotes son de menor tamaño (3 mm en promedio) (Cuadro 4). Algo similar se presentó en *Mammillaria sanangelensis* Sánchez-Mej., cuando se utilizó una concentración alta de fitohormona (4.4 mM de BAP + 0.53  $\mu\text{M}$  de ANA), la cual indujo la generación de 21 brotes por explante, con una altura menor a 3 mm (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

When this effect was compared to the treatment without phytohormones, it was proved that in an endogeneous form, *T. kurbnicarpus* can produce shoots; however, its regeneration is low (2.33 shoots per explants) (Table 3).

After analyzing the treatments as independent effects by the mean test ( $P \leq 0.05$ ), it was determined that the T12 treatment has a positive incidence in shoot induction, up to 10 shoots per explant in a MIB medium added with 4.40 mM of BA + 4.13 x  $\mu\text{M}$  of AIB. The former contrasts with the T2 treatment in which 9 shoots per explant were obtained in a MIB with low concentration of Kin 0.46 mM of Kin + 0.61  $\mu\text{M}$  of AIB. Results show that the 10:1 kytosine-auxine relation is positive for shoot induction, even if its reaction depends on the type of phytohormone that is used, which is different from what happened with the treatment without phytohormone, in which the least number of shoots was produced.

The kytosine-auxine interaction has been effective in direct organogenesis of 21 species of Mexican cacti as Pérez *et al.* (1998) and Mata *et al.* (2001) refer, among them those of *Turbinicarpus* genus, when 8.8-13.31 mM of BA and 0-2.6  $\mu\text{M}$  of ANA in MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium were used.

Shoot height (A). Significant differences were found among treatments with and without phytohormones, the latter having recorded a greater shoot height (8.22 mm), in contrast to the treatments with phytohormones, which recorded a value statistically equal to 6 mm, when kinetine (KIN) was used (Table 4, Figure 4).

When analyzing the effect of the phytohormone type it was observed that the height of the shoots is reduced when the number of explants increases, as it happened with T2 and T12 treatments, which produced 4 and 3 mm (Table 4).

The opposite effect was obtained when BA was used: the number and height of the shoots increases as the kitocinine concentration does, in such a way that with the 0.66 to 3.3 mM of BA concentration the maximum number of shoots per explant was 4 with a height over 5 mm; however, with the highest concentration (4.40 mM of BA), the multiplication rate becomes more than twice, but shoots are smaller in size (3mm average) (Table 4). Something similar happened with *Mammillaria sanangelensis* Sánchez-Mej. when a high concentration of phytohormone (4.4 mM of BAP + 0.53  $\mu\text{M}$  of ANA) was used, which induced the generation of 21 shoots per explant, with a height lower than 3 mm (Martínez-Vázquez and Rubluo, 1989).

Cuadro 4. Tasa de multiplicación de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha.  
 Table 4. Multiplication rate of *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha.

TRATAMIENTOS	Concentración (µM)			NB	A
	mM		(µM)		
	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 <sup>2</sup>	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  $P \leq 0.05$ ).

NB= Número de brotes; A=Altura

Values with the same letter in the columns have not significant differences (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

NB= Number of shoots; A=Height

Con base en los resultados aquí documentados se puede decir que el control hormonal influye en la diferenciación del explante como lo refieren Mauseth (1976, 1979), y se demuestra que la regeneración de brotes *in vitro* de *T. knuthianus* es posible inducirla a partir de yemas axilares; así mismo, la eficiencia del método de propagación se expresa en el número de brotes por explante (Vyskot y Jara, 1984; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Clayton *et al.*, 1990 y Dabekaussen *et al.*, 1991).

También se determinó que la micropropagación de *T. knuthianus* ocurre si al medio de cultivo (MIB) se le agregan fitohormonas, ya que sus yemas axilares presentan letargo, con meristemas axilares quiescentes con potencial mitótico activo en cada una de sus zonas (a) célula madre central; b) zona periférica y c) meristemo), en donde es posible desarrollar primordios fotosintéticamente normales, llamados brotes, tal como lo describió Mauseth (1976, 1978, 1979), quien fue el primero en evaluar este efecto en cactáceas.

Based upon the results here supported, it can be stated that hormonal control influences the explant differentiation, as Mauseth (1976, 1979) refer and it is proved that *T. knuthianus* shoot regeneration *in vitro* can be induced from auxiliary buds; also, the efficiency of the propagation method is expressed in the number of shoots per explant (Vyskot and Jara, 1984; Martínez-Vázquez and Rubluo, 1989; Clayton *et al.*, 1990; Dabekaussen *et al.*, 1991).

It was also determined that the micropropagation of *T. knuthianus* occurs if phytohormones are added to the culture medium (MIB), since their axillary buds show lethargy with quiescent axillary meristems that have active mitotic potential in each of their zones a) central mother cells, b) peripheric zone and c) meristem), in which it is possible to develop photosynthetically normal primordial structures known as shoots, as Mauseth (1976, 1978, 1979) described, being the first one to assess this effect on cacti.



Figura 4. Brotes de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha obtenidos en la etapa de multiplicación.  
Figure 4. *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha shoots produced in the multiplication stage.

La tasa de multiplicación de *T. knuthianus* es exponencial y varía dependiendo de la fitohormona que se utilice, siempre que se mantenga una relación 1:8:8:8; del medio de cultivo (MIB) adicionado con 0.69 mM de Kin + 0.61  $\mu\text{M}$  de AIB. Los valores para esta variable fueron superiores al citado por Dávila *et al.* (2005) y Clayton *et al.* (1990) en *Escobaria missouriensis* (Sweet) D.R. Hunt, *Pediocactus paradinei* B. W. Benson y *Toumeyia papyracantha* (Engelm) Britton *et Rose*, cuya tasa de multiplicación máxima fue de 6.0 brotes por explante.

En el caso de la cactácea estudiada la máxima tasa de multiplicación en relación de 1:10:10:10 se obtiene *in vitro* en un medio de cultivo MIB con 4.4 mM de BA+ 0.413  $\mu\text{M}$  (relación 1:10:10:10). Esta cifra es semejante a la que se ha registrado en especies de los géneros: *Coryphantha*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Clayton *et al.*, 1990) y en *Astrophytum myriostigma* Lem. (Villavicencio *et al.*, 2006; 2009), pero que supera a la consignada en otras especies de cactáceas mexicanas como *Mammillaria voburnensis* Scheer y *Mammillaria elongata* DC. (Ordóñez, 2003; Papafotiou *et al.*, 2001).

### Etapa 3 enraizamiento y aclimatación

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 y aserrín entre otros.

The multiplication rate of *T. knuthianus* is exponential and varies according to the phytohormone that is used, in so far as is kept a 1:8:8:8 relation of the culture medium (MIB) to which is added 0.69 mM of Kin + 0.61  $\mu\text{M}$  of AIB. The values for this variable were higher than those of Dávila *et al.* (2005) and Clayton *et al.* (1990) for *Escobaria missouriensis* (Sweet) D.R. Hunt, *Pediocactus paradinei* B. W. Benson and *Toumeyia papyracantha* (Engelm) Britton *et Rose*, whose maximum multiplication rate was 6.0 shoots per explant.

In the case of the studied cactus, the maximum multiplication rate in a 1:10:10:10 relation results from an *in vitro* essay in a MIB culture medium (1:10:10:10 relation). This number is similar to what is recorded in species of the genus *Coryphantha*, *Echinocereus* and *Mammillaria* (Clayton *et al.*, 1990) and in *Astrophytum myriostigma* Lem. (Villavicencio *et al.*, 2006; 2009), but that is over that recorded for other species of Mexican cacti such as *Mammillaria voburnensis* Scheer and *Mammillaria elongata* DC. (Ordóñez, 2003; Papafotiou, *et al.*, 2001).

### Stage 3. Rooting and acclimatization

In greenhouses when ornamental plants are produced a great variety of organic and inorganic materials is used, as simple or mixed substrata that provide the medium for plant growth such as fine "tezontle", "tepojal" (extrusive volcanic rock of vesicular texture, bubbled and porous that keeps heat), coconut dust, clinkstone, sand, mashed leaf-soil, "peat moss", vermiculite, mashed sugar cane bagasse, rice husk and sawdust.

Stem height increment (SHI). In the three first dates of application were determined highly significant differences

Incremento en altura del tallo (IAT). En las tres primeras fechas de aplicación se determinaron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los efectos independientes S y CONC, de tal manera que, al final de la evaluación, el IAT fue estadísticamente igual en los tres primeros sustratos evaluados (S1=arena, S2= peat moss y S3= negra), con un IAT de 17 mm, superior al de las plantas aclimatadas en el sustrato S4. Se obtuvo un efecto positivo con la interacción SxCONC, cuando se inoculó la cepa de *Azospirillum brasilense* en baja concentración (CONC1=1.5x10<sup>6</sup> UFC/ ml-1), y los tres sustratos referidos superan en IAT al resto de los tratamientos. Al final del proceso de aclimatación se tuvieron plantas entre 4 y 7 cm de altura con un 95% de sobrevivencia; con ello se demuestra que la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) influye positivamente en el aumento de IAT, a diferencia de sus homólogos, los testigo, en donde los que los IAT resultaron estadísticamente igual y menor a 2 mm (cuadros 5 y 6).

( $P \leq 0.05$ ) between the independent S effects and the CONC, in such a way that, at the end of the assessment, the SHI was statistically equal in the three first evaluated substrates (S1=sand, S2= peat moss and S3= black) with a SHI = 17 mm, which is higher to the acclimatated plants in substrate S4. A positive effect with the SxCONC interaction was obtained when the *Azospirillum brasilense* in a low concentration (CONC1=1.5x10<sup>6</sup> UFC/ ml-1), was inoculated and the three referred substrata surpass the SHI of the rest of the treatments. At the end of the acclimatization process plants were between 4 and 7 cm high with a 95% survival; thus, it is proved that the concentration of colony-forming units (CFU) has a positive influence upon the increment of SHI, compared to their homologous, the controls, in which SHI were statistically equal or below 2 mm (Tables 5 and 6).

Cuadro 5. Significancia de las variables Incremento en altura de tallo, longitud de raíz y número de raíces evaluadas en el enraizamiento de *Turbinicarpus knuthianus* en invernadero.

Table 5. Significance of the stem height increment, root length and number of assessed roots in the rooting of *Turbinicarpus knuthianus* at the greenhouse.

F. V.	gl	IAT	NR	LR
Sustrato (S)	3	**	**	**
Concentración cepa (CON)	2	**	**	
REP	2			
SxCONC	6	**	**	
SxCONCXREP	22	**		**
Error	324			
Total	359			
r <sup>2</sup>		0.65	0.66	60.42
CV (%)		21.82	27.41	15.19
Media		1.1	3.96	2.30

gl= grados de libertad; \*\* Diferente de cero ( $P \leq 0.01$ ); CV= Coeficiente de variación; IAT = incremento en altura de tallo; NR = número de raíces; LR = longitud de raíz.  
 gl= degrees of freedom; \*\* Different from zero ( $P \leq 0.01$ ); CV= Coefficient of variation; IAT = increment of stem height; NR = number of roots; LR = root length

Cuadro 6. Influencia del sustrato en el incremento de altura de tallo, longitud de raíz y número de raíces durante la aclimatación de *Turbinicarpus knuthianus*.

Table 6. Influence of substrate upon stem height increment, root length and number of roots during the acclimatization of *Turbinicarpus knuthianus*.

Sustrato	IAT	LR	NR
	(cm)	(cm)	
S1	1.25 a	2.97 a	4.32 a
S2	1.12 a	2.15 bc	4.12 a
S3	1.19 a	2.35 b	4.24 a
S4	0.88 b	1.75 c	3.16 b
DMS	0.22	0.41	0.41

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; S1=arena, S2= "peat moss", S3= negra y S4= mezcla homogénea de las tres anteriores; DMS = Diferencia mínima significativa.

Means with the same letters between columns, are not statistically different (Tukey, 0.05).

IAT = stem height increment; NR = number of roots; LR = root length; S1=sand, S2= "peat moss", S3= black and S4= homogeneous mixture of the three mentioned before; DMS = Least significant difference.

Número de raíces (NR). Se obtuvo un efecto igual al descrito para el IAT con los tres sustratos usados. En promedio 4 raíces por planta, con la misma concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) (cuadros 5 y 6). Los resultados duplican en NR a los observados con sus tratamientos homólogos, pero sin la aplicación de la cepa, lo que muestra que *T. knuthianus* tiene niveles endógenos de auxinas que le permiten inducir el proceso rizogénico, como lo citado para *Capsicum chinese* Jacquin, con una concentración similar (CONC1=1.5x10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) (Canto et al., 2004) (Cuadro 7); sin embargo son relativamente bajos comparados con los de otras especies (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) según Tomasz et al. (2006).

Al analizar los tratamientos como efectos independientes, el tratamiento T2 en la prueba de medias (Tukey  $\infty$  0.05) resultó significativo, con un valor máximo de 6 raíces por planta, mientras que T1 y T3 fueron estadísticamente iguales con 5 raíces por planta, y duplican el número de raíces, con respecto a los tratamientos homólogos sin la aplicación de la cepa, cuyo número de raíces no fue mayor a 2 por planta, lo que confirma que la especie tiene niveles endógenos de auxinas (Canto et al., 2004) (Cuadro 8, Figura 5).

Cuadro 7. Influencia de la concentración de las unidades formadoras de colonias de *Azospirillum brasilense* en el incremento de altura del tallo, longitud de raíz y número de raíces durante la aclimatación de *Turbinicarpus knuthianus*.

Table 7. Influence of *Azospirillum brasilense* concentration of colony-forming units (CFU) upon stem height increment, root length and number of roots during the acclimatization of *Turbinicarpus knuthianus*.

Concentración	IAT	LR	NR
	(cm)	(cm)	
0	0.28 c	2.45 a	2.16 b
1	1.63 a	2.21 a	4.92 a
2	1.42 b	2.25 a	4.80 a
DMS	0.17	0.42	0.33

Medias con letras iguales entre columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

CONC1= 1.5x10<sup>6</sup> y CONC 2= 3x10<sup>7</sup> UFC/ ml-1 de *A. brasilense*; IAT = incremento en altura de tallo; NR = número de raíces; LR = longitud de raíz; DMS = Diferencia mínima significativa.

Means with the same letters between columns, are not statistically different (Tukey, 0.05).

CONC1= 1.5x10<sup>6</sup> and CONC 2= 3x10<sup>7</sup> UFC/ ml-1 of *A. brasilense*; IAT = stem height increment; NR = number of roots; LR = root length; DMS = Least significant difference.

Number of roots (NR). The same effect to that described for the IAT was obtained with the three substrates that were used. Four roots per plant in average, with the same concentration of colony-forming units (CFU) (Tables 5 and 6). These results duplicate the NR observed in the homologous treatments, but without the bacteria, which shows that *T. knuthianus* has endogenous levels of auxines that helps in the rhizogenic process as has been reported for *Capsicum chinese* Jacquin, with a similar concentration (CONC1=1.5x10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) (Canto et al., 2004) (Table 7); however, they are rather low compared to other species (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) according to Tomasz et al. (2006).

While analyzing the treatments as independent events, T2 treatment in the mean test (Tukey  $\infty$  0.05) was significant, with a maximum value of 6 roots per plant, while T1 and T3 were statistically the same with 5 roots per plant, and doubled the number of roots in regard to the homologous treatments without the bacterium, whose number of roots was not over 2 per plant, which confirms that the species has endogenous levels of auxines (Canto et al., 2004) (Table 8, Figure 5).

Cuadro 8. Comparación de medias de los tratamientos evaluados en el enraizamiento y aclimatación de *Turbinicarpus knuthianus*.  
 Table 8. Comparison of the means of the assessed treatments of rooting and acclimatization of *Turbinicarpus knuthianus*.

Tratamientos	IAT	LR	NR	AFP	Supervivencia (%)
	(cm)	(cm)		(cm)	
T1 Arena + 1.5x10 <sup>6</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.73 ab	2.67 a	5.20 b	4.28 ab	90 b
T2 Peat moss + 1.5x10 <sup>6</sup> UFC/ ml-1 cepa	2.09 a	2.50 ab	5.90 a	7.6 a	100 a
T3 Tierra de monte + 1.5x10 <sup>6</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.88 ab	2.25 cd	5.20 b	5.35 ab	100 a
T4 Mezcla de sustratos + 1.5x10 <sup>6</sup> UFC/ ml-1 cepa	0.82 de	1.42 f	3.40 e	2.71 c	90 b
T5 Arena + 3x10 <sup>7</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.46 bc	2.45 bc	5.26 b	6.46 a	90 b
T6 Peat moss + 3x10 <sup>7</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.19 cd	1.94 e	4.60 c	2.97 c	90 b
T7 Tierra de monte + 3x10 <sup>7</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.48 bc	2.53 ab	5.33 b	4.69 ab	80 c
T8 Mezcla de sustratos + 3x10 <sup>7</sup> UFC/ ml-1 cepa	1.56 bc	2.06 de	4.00 d	2.4 cd	90 b
T9 Arena + Fertilización (Testigo)	0.55 ef	1.76 cd	2.50 f	2.35 cd	80 c
T10 Peat moss + Fertilización I (Testigo)	0.09 f	1.42 f	1.86 g	1.8 d	60 c
T11 Tierra de monte + Fertilización (Testigo)	0.20 f	1.36 g	2.20 fg	1.5 d	70 c
T12 Mezcla de sustratos + Fertilización (Testigo)	0.28 f	1.34 g	2.10 fg	1.25 e	80 c
DMS	0.52	0.15	0.34	4.28	
Media	1.11	1.97	3.96	3.61	85
CV	19.27	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 de la planta.  
 Means with the same letters between columns, are not statistically different (Tukey, 0.05). IAT = stem height increment; NR = number of roots; LR = root length; AFP = Final plant height.



Figura 5. Efecto de *Azospirillum brasilense*. en el proceso rizogénico de *Turbinicarpus knuthianus*. Invernadero del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.  
 Figure 5. Effect of *Azospirillum brasilense* in rhizogenic process of *Turbinicarpus knuthianus*. Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

Longitud de raíces (LR). La interacción SxCONC, presentó diferencias significativas, y con el sustrato poroso (S1=arena) se obtuvo una LR (LR= 3 cm) superior al resto de los sustratos, por lo que se infiere que puede utilizarse cepa de *A. brasiliense* para el enraizamiento y aclimatación de *T. knuthianus*, ya que entre la planta y la bacteria se verifica una "simbiosis asociativa", que favorece la producción de hormonas de crecimiento, cambios morfológicos y fisiológicos en las cactáceas 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 (Burdman *et al.*, 2000; Okon y Labandera-González, 1994) (cuadros 5 y 6).

De acuerdo a Kapulnik *et al.* (1985), la aplicación de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> incide en el número y longitud de total de raíz, en tanto que la inoculación de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> causa la inhibición de desarrollo. El efecto rizogénico es similar al consignado por otros autores; al trabajar con *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton *et Rose*, la concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC L<sup>-1</sup> de *Azospirillum* spp. inoculado a un suelo pobre de áreas desérticas, incrementa la materia vegetal 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 primeros 30 días de aclimatación considerando este tiempo como un período de adaptación (Pacovsky *et al.*, 1985; Puente y Bashan, 1993).

Supervivencia. 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 adaptativos como lignificación, cubiertas cuticulares, estomas y órganos fotosintéticos para que las plantas tengan un desarrollo autónomo, mismo que ocurre durante la aclimatación. 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 una supervivencia mayor al 91%, independientemente del tipo de sustrato, mientras que sus homólogos sin la cepa sólo alcanzaron un valor promedio de 72 %, y el tratamiento T10 presentó mayor contenido de humedad lo cual provocó un incremento en la pudrición de las plantas (Cuadro 8 y Figura 6). Trinidad (2005) cita el mismo efecto en *T. knuthianus* con un porcentaje bajo de supervivencia (60%).

A pesar de que se trata de un sustrato estéril comúnmente usado en plantas ornamentales de tallo suculento, los resultados muestran que para la especie de interés es poco recomendable, ya que sus requerimientos de humedad son bajos. *T. knuthianus* es una planta propia de condiciones semiáridas, por lo que se propone utilizar un sustrato poroso como lo refieren Johnson y Emimo (1979 b). Los tratamientos T1 y T5 tuvieron un efecto positivo en la aclimatación, si se inocula con una cepa rizogénica, en ambos casos se observó una sobrevivencia estadísticamente igual (90%).

Root length (LR). The SxCONC interaction showed significant differences, and with the porous substrate (S1=sand) LR was higher than the rest of the substrates (LR= 3 cm), from which it can be inferred that *A. brasiliense* may be used for the rooting and acclimatization of *T. knuthianus*, since an "associative symbiosis" takes place between the plant and the bacterium which favors the production of growth hormones, morphologic and physiologic changes in cacti that promote, as well, in a shorter time, the development of roots with greater growth, which influences water and mineral salts uptake (Burdman *et al.*, 2000; Okon and Labandera-González, 1994) (Tables 5 and 6).

According to Kapulnik *et al.* (1985), the application of  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> affects the number and total root length, while the inoculation with  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> causes development inhibition. The rhizogenic effect is similar to that reported by other authors; when testing *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton *et Rose* with an *Azospirillum* spp. concentration of  $1.5 \times 10^6$  UFC L<sup>-1</sup>, inoculated to a poor soil of desert lands, green matter increases up to 60% and root length, 100%. For *T. knuthianus* it was determined that the bacterium invaded the root system of the cactus during the first 30 days of acclimatization, taking this time as an adaptation period (Pacovsky, *et al.*, 1985; Puente and Bashan, 1993).

Survival. *Ex vitro* growth is autotrophic, and not heterotrophic as *in vitro*, which makes it necessary to reconstruct and develop processes and adaptive structures such as lignification, cuticular covers, stomas and photosynthetic organs for an autonomous development of plants, which takes place during acclimatization. In this regard, significant differences were obtained between substrates with or without inoculation of strains; the plants that were acclimatized with the strains interaction registered a survival over 91%, regardless of the substrate, while their homologous without strains showed an average value of 72% and the T10 treatment, a higher humidity content, which produced an increment in plant rotteness (Table 8 and Figure 6). Trinidad (2005) describes the same effect for *T. knuthianus* with a low survival per cent (60%).

In spite of being a sterile substrate regularly used in ornamental plants of succulent stem, results show that for the studied species it is not advisable, since its moisture requirements are low. *T. knuthianus* lives in a semi-arid environment, which suggests the convenience of using a porous substrate (Johnson and Emimo, 1979b). The T1 and T5 treatments had a positive effect on acclimatization if inoculation is includes a rhizogenic strain; in both cases, survival was statistically the same (90%).

These results show the ability that *in vitro* cultivated plants have to control water loss through activation of their stomata (Santamaría *et al.*, 1995; Santamaría, 1996) and that the morpho-physiologic behavior and the biochemistry



Figura 6. Planta aclimatada de *Turbinicarpus knuthianus*, a los 90 días de desarrollo en condiciones de invernadero, inoculadas con *Azospirillum brasilense*.

Figura 6. Acclimatized *Turbinicarpus knuthianus* plants after 90 days of development under greenhouse environment inoculated with *Azospirillum brasilense*.

Estos resultados muestran la capacidad que tienen las plantas cultivadas *in vitro* para controlar la pérdida de agua a través de la activación de sus estomas (Santamaría *et al.*, 1995; Santamaría, 1996), y que el comportamiento morfo-fisiológico y la bioquímica de las plántulas aclimatadas dependen de las condiciones hetero-mixotróficas a las que están expuestas durante este proceso.

## CONCLUSIONES

En especies con un número reducido de semillas, como es el caso de *T. knuthianus*, la pérdida de plántulas limita su regeneración en condiciones controladas, por lo que la selección del medio de cultivo es importante en la etapa de establecimiento, dado que su efecto se refleja en las siguientes fases de la micropropagación.

La micropropagación es un método factible para regenerar especies de cactáceas, involucra cuatro etapas en las cuales se pueden producir vitroplantas de tamaño uniforme y con buena calidad fitosanitaria. Mediante el cultivo de tejidos vegetales y el uso de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas, se pueden optimizar procesos biológicos de este tipo de especies de importancia ecológica y económica.

El uso de rizobacterias es una alternativa exitosa para la aclimatación de *T. knuthianus*, ya que mantiene la fertilidad del suelo, sin causar contaminación ambiental. 🌱

of acclimatized seedlings depend on the hetero-mixotrophic conditions to which they are exposed during this process.

## CONCLUSIONS

In species with a small amount of seeds, as *T. knuthianus*, the loss of seedlings limits its regeneration under control conditions; thus, the selection of culture medium is important in the establishment stage, since their effect affects the following micropropagation phases.

Micropropagation is a feasible method to regenerate cacti species involves four stages, in which vitro-plants of a uniform size and with good phytosanitary quality may be produced. By means of vegetal tissue culture and the use of microorganisms that promote growth in plants, biological process of this kind of species of ecological and economic importance might be optimized.

The use of rhizobacteria is a successful option for the acclimatization of *T. knuthianus*, since it holds soil fertility without causing environmental pollution. 🌱

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CONAFOR-CONACYT for having sponsored the CO3-10569 project, as well as to the Fundación Produce Coahuila A. C. and to SNICS-SINAREFI for the support that gave birth to the actual work. Also to the Comisariados ejidales and to the producers of the different municipalities of San Luis Potosí State for their help and the facilities that they provided to accomplish the field work.

*End of the English version*



## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento al fondo sectorial CONAFOR-CONACYT por el financiamiento del proyecto CO3-10569, así como a la Fundación Produce Coahuila A. C. y al SNICS-SINAREFI por el apoyo que dio origen al presente trabajo. También se agradece a los Comisariados ejidales y productores de los diferentes municipios de San Luis Potosí por su colaboración y facilidades brindadas para los trabajos de campo.

## REFERENCIAS

- 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.
- Burdman S., Y. Okon and E. Jurkevitch. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* Vol 26:91-110.
- Canto M., J. C. S. Medina P. y D. Morales A. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 4(1): 21-27.
- Carletti S., M. E. Rodríguez C. A. y E. Llorente B. 2003. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la micropropagación de plantas. In: Albanesi, A., A. Anriquez, S. Luna, C. Kunst y R. Ledesma (Eds.). *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación Argentina.* Universidad Nacional de Santiago del Estero. Ciudad Santiago del Estero, Argentina. pp. 119-129.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. Phillips C. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinoe. *J. Amer. Soc. Hor. Sci.* 115(2):337-343.
- Dabekausen, 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. Sci. Hort.* 46:283-294.
- Dávila, F. C. A., De La Rosa, C. M. L., Pêre, 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-Ibarra M., García H. 1994. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. *Phyton-Int. J. Exp. Bot.* 56: 147-150.
- De la Vega, B. y R. Alizaga, 1987. Efecto del ácido giberélico y del preenfriamiento sobre la ruptura del reposo en semillas de salvia. *Agronomía Costarricense.* 11(1): 89-95.
- Díaz-Zorita, M., R. Ballina, M. Fernández C., C. Penna and A. Peticari A. 2004. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) with *Azospirillum brasilense* in the Pampas region, Argentina. 22nd Latin American Conference on Rhizobiology. Brasil. *Journal of Soil Biology* 45: 28-35.
- 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 Tiss Organ Cult.* 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. México. 80 p.
- 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. *Scientia Horticulturae* 95(4): 319-332.
- Hubstenberger J. F. P., W. Clayton and G. Phillips C. 1992. Micropropagation of Cacti (Cactaceae) IV. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 20:49-68.
- Hunt, D., N. Taylor and G. Charles (Eds.) 2006. *The New Cactus Lexicon. Descriptions and illustrations of the cactus family.* International Cactaceae Systematic Group. DH Books. UK. Vol. I, 375 p.
- Johnson J. L. and E. Emino R. 1979a. Tissue culture propagation of cacti. *Cact. Succ. J. (US)* 51: 275-277.
- Johnson J. L. and E. Emino R. 1979b. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *Hort Science* 14(5): 605-606.
- Kapulnik Y., Y. Okon and Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31:881-887.
- Kauth J. P., A. Wagner V. and E. Michael K. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 85(1): 91-102.
- Maiti R., K. P. Hernández J. L. and M. Valdez M. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton* No. 55 pp. 97-105.
- 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. *Sci Hortic* 81(1):71-87.
- Martínez V., O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hort. Sci.* 61(1):99-105.
- Mata, R. M., M. Monroy-De La Rosa, K. M. Goldammer and V.M. Chávez-Ávila. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 400-404.
- Mauseth, D. J. 1976. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems In: *Opuntia polyacantha* (cactaceae). *Amer. J. Bot.* 63 (10): 1295-1301.
- Mauseth, D., J. 1978. An investigation of the phylogenetic and ontogenetic variability of shoot apical meristems in the Cactaceae. *Amer. J. Bot.* 65(3): 326-333.
- Mauseth, D. J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. and Succ. J.* (51): 186-187.
- Moebius-Goldammer K., M. Goldammer, R. Mata M. and 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.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497-
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology.* pp. 223-228.
- Okon, Y. and C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- Ordóñez 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, Guatemala. 70 p.
- 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. Panayioti 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, 2001.
- 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, 2002.
- Pérez, M. B., E. Villalobos, E. Meza E., L. R., Morones and J. Lizalde, 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. Boston, MA USA. pp. 54-82
- Puente, M. E. and Y. Bashan. 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.
- Rodríguez, G. B. and A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cact. Succ. J.* 64 (3):116-119.
- Rojas A., M. 2008. Efecto del ácido giberélico en la germinación de cuatro especies del género *Mammillaria* del Valle de Tehuacán-Cuicatán, México. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* 5(1), 21-23

- Santamaría, J. M., W. J. Davies, and C. J. Atkinson. 1993. Stomata of micropropagated delphinium plants respond to ABA, CO<sub>2</sub>, light and water potential, but fail to close fully. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 44. (258) pp. 99- 107.
- Santamaría, J. M., J. L. Herrera and M. L. Robert. 1995. Stomatal physiology of micropropagated CAM plant: *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*. 16: 211- 214.
- Debe decir: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Normativo II. [http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones\\_normas/rec\\_nat/no\\_059a2g.html](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones_normas/rec_nat/no_059a2g.html). (4/marzo/2011).
- Statistical Analysis System (SAS). 2002. SAS/STAT user's guide. Release 10.0 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA. 1,028 p.
- Tomasz P., W., M. Hamerska and M. Wróblewska. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87:27-32
- Trinidad G., R. 2005. Multiplicación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. y *Turbinicarpus knuthianus* Boed. y aclimatación de éstas especies y *T. lophophoroides* Werd. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía. Buenavista Saltillo, Coah., México. 85 p.
- Villalobos A., V. y M. Thorpe. 1985. La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In: Fundamentos y Aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura*. W. Roca CIAT. Bogotá, Colombia. pp. 67-85.
- Villavicencio G., E. E., A. Cano P. y 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.) Cactacea ornamental del desierto Chihuahuense. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto para productores Núm. 12. ISBN 970-43-0118-9 Coahuila, México. 10 p.
- Villavicencio G., E. E., A. Cano P. y A. Juárez S. 2009. Micropropagación 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 Coahuila, México. 42 p.
- Villavicencio G., E. E., A. Arredondo G., M. A. Carranza P., O. Mares A., S. Comparan S. y 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. 345 p.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59(3): 449-452.
- Yassen-Mohamed, 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.