

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) UN CACTUS
ENDÉMICO Y AMENAZADO**

**[*In vitro* PROPAGATION OF *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) AN
ENDEMIC AND ENDANGERED CACTUS]**

D. Ruvalcaba-Ruiz¹*, D. Rojas-Bravo¹, A. J. Valencia-Botín¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro Universitario de la Ciénega,
Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Col. Lindavista, Ocotlán, Jalisco,
CP 47810, MEXICO. Tel (392) 925-94-00 ext. 8342.

E-mail: druvalcaba@cuci.udg.mx

* Corresponding author

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue lograr la regeneración vía organogénesis directa de plantas completas de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) Cactaceae, la cual es una especie amenazada. Los tratamientos de micropropagación consistieron de medio basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0.0, 0.5, 1.0 mg/L de ácido naftalenacético (ANA). Posterior a 60 días de incubación se evaluó la proliferación de brotes axilares. La variable respuesta fue la regeneración de plántulas por la vía de organogénesis directa. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza ($P < 0.05$) y las medias se compararon con la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores mas altos de proliferación de brotes axilares se observaron en el medio que contenía 2 mg/L de 6-BAP, las plántulas obtenidas fueron enraizadas *in vitro* en medio MS sin reguladores de crecimiento. El 95 % de las plantas regeneradas presentaron buen crecimiento y fueron fenotípicamente similares la planta madre.

Palabras clave: Cactaceae; micropropagación; reguladores del crecimiento.

INTRODUCCIÓN

La cactácea *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) se ubica taxonómicamente en el género, subgénero y sección *Coryphantha* y en la serie *Retusae* (Dicht y Lüthy, 2005). El nivel endémico de *Coryphantha* en México es muy alto alcanzando hasta 83%, además en nuestro país es posible encontrar 39 de las 45 especies reportadas mismas que se localizan principalmente en un área pequeña de los estados de Puebla y Oaxaca (Hernández y Godínez, 1994).

SUMMARY

The objective of this study was to regenerate via direct organogenesis complete plants of *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) Cactaceae, an endangered cactus. The treatments of micropropagation consisted on half Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L of 6-(benzylaminopurine) (6-BAP), 0.0, 0.5, 1.0 mg/L naftalenacetic acid (NAA). After 60 days the axillary bud proliferation were evaluated. Response variable was shoots regeneration by organogenesis via. Results were analyzed by analysis of variance ($P < 0.05$) and means were compared by Duncan's multiple range test. A highest axillary bud proliferation was observed on a medium containing 2 mg/L 6-BAP. The plantlets were rooted on MS medium without (plant) growth regulators. The 95 % of regenerated plants showed good overall growth and were phenotypically similar to the mother plant.

Key words: Cactaceae; growth regulators; micropropagation.

Los especímenes de *C. retusa* revisten un alto valor ornamental debido a la belleza y colorido de sus flores, por tal motivo existe una alta sobrecolección con la consecuente reducción de su diversidad poblacional. Aunado a lo anterior, destaca el hecho de que los individuos de esta especie presentan hábitos solitarios y no producen brotes de manera natural. Por tal motivo, el gobierno mexicano ha clasificado a *C. retusa* como rara y en protección de acuerdo a lo estipulado por la NOM-059-ECOL-2001.

Los métodos de propagación *in vitro* se consideran técnicas valiosas para la conservación de recursos fitogenéticos en extinción. La regeneración de plantas por la vía organogénesis directa e indirecta son los métodos biotecnológicos de mayor aplicación y permiten superar las desventajas que se producen con la propagación sexual por semillas (Wakhlu y Bhau, 2000). Se ha observado en un gran número de cactáceas, que el desarrollo de brotes se obtiene directamente al adicionar al medio de cultivo cantidades relativamente altas de citocininas y bajas o nulas cantidades de auxinas (George, 1993). Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) demostraron que la utilización de benciladenina (BA; 1 mg/L) sola o en combinación con ácido α -naftalenacético (ANA; 0.01 mg/L) fueron muy efectivos en la formación directa de brotes en 21 especies de cactáceas mexicanas, entre ellas se encontraban varias especies del género *Coryphanta*; *C. clavata*, *C. duranguensis* y *C. radians*.

La primera propagación exitosa del género *Coryphanta in vitro* por la vía de organogénesis indirecta, se realizó a partir de tubérculos en medio de cultivo, con la especie *C. elephantidens* (Lem.) Lem, en donde se aplicó 9.05 μ M de 2-4 D y 2.3 μ M de kinetina (KIN). Por su parte, Mata-Rosas *et al.* (2001) lograron inducir brotes adventicios en *Turbinucarpus laui* al utilizar 8.8-13.31 μ M de 6-BAP y 0-2.6 μ M de ANA en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). En otra investigación, Katja *et al.* (2003) demostraron la factibilidad de la proliferación de *Ariocarpus kotschoubeyanus* con un promedio de 6.3 brotes por explante mediante la inducción de organogénesis directa en plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* cuando el medio de cultivo fue suplementado con BA (13.3 μ M) y ANA (5.4 μ M). En 2002 fue posible la propagación exitosa de las especies en extinción *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis*, al adicionar al medio de cultivo varias concentraciones y combinaciones de BA, KIN y TDZ (tidiazuron) (Giusti *et al.*, 2002). Existen también reportes de la inducción de embriogénesis somática como herramienta de regeneración de plántulas completas (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Infante, 1992; Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996).

Por lo anterior, se planteó el objetivo de desarrollar un protocolo viable para la propagación *in vitro* de *C. retusa* por organogénesis directa mediante la adición en el medio de cultivo de 6-BAP y ANA. La hipótesis fue que la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo facilitará el desarrollo de brotes en *C. retusa* por la vía de organogénesis directa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Los explantes usados para esta investigación fueron obtenidos a partir de semillas botánicas. La colecta de frutos frescos silvestres se realizó en el municipio de Tehuiztzingo (18° 15' 48'' LN y 98° 09' 06'' LO) localizado en la Zona de la Mixteca Poblana, entre Izúcar de Matamoros y Acatlán de Osorio, aproximadamente a 200 km de Puebla, México. Un fruto con aproximadamente 56 semillas se lavó con jabón líquido (Axió®) y agua corriente, bajo la campana de flujo laminar para mantener condiciones asépticas y se desinfectó superficialmente con una solución de cloro comercial (Cloralex®) al 1 % por 15 minutos, seguido de tres enjuagues con agua bidestilada estéril (George, 1993).

Germinación de las semillas y obtención de explantes

Los frutos se disectaron en una caja de Petri, para extraer las semillas y se transfirieron a tubos de ensaye que contenían 25 mL de medio de cultivo MS basal (Murashige y Skoog, 1962) a media fuerza, suplementado con 20 g/L de sacarosa, 0.001 g/L de tiamina y solidificado con 3 g/L de Phytigel®.

Después de 20 días de germinación de las semillas, las plántulas se transfirieron a medio fresco y se cultivaron durante 50 días hasta obtener un tamaño de 2 a 3 cm. En el experimento se utilizaron dos tipos de explantes: apical y lateral (sin el ápice, cortados longitudinalmente), como se ilustra en la Figura 1.

Los explantes se colocaron en frascos de vidrio con 25 mL de medio de cultivo conteniendo sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 30 g/L de sacarosa y 10 mL de vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), solidificado con 3 g/L de Phytigel. Los tratamientos consistieron de la aplicación de cuatro dosis de 6-BAP (0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/L) y tres de ANA (0.0, 0.5 y 1 mg/L) así como los respectivos testigos.



Figura 1. Fuentes de obtención de explantes para la micropropagación.

En todos los casos se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento, en donde un tratamiento se integró con un explante apical y dos explantes laterales por frasco, lo cual arrojó 50 unidades experimentales de explantes de ápice y 100 unidades experimentales de explantes laterales. El pH de todos los tratamientos se ajustó a 5.8 con NaOH 0.1N y HCl 0.1N y se esterilizaron a 121 °C, a una presión de 1.5 kg/cm² por 15 minutos. Las condiciones de incubación fueron de 26±2 °C, fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente (25 µmol/m²/s) (George, 1993).

Después de 60 días de inducción, se evaluó visualmente la proliferación de brotes, se sistematizaron los datos y se realizó un análisis de varianza (ANOVA). La media de los tratamientos se comparó con la prueba de rangos múltiple de Duncan (P<0.05), mediante el paquete estadístico SAS (1999). El enraizamiento *in vitro* se indujo en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), sin adición de reguladores de crecimiento. Para la adaptación *ex vitro* las plántulas enraizadas se lavaron con agua bidestilada estéril para remover los restos de medio de cultivo y se transplantaron en macetas de plástico, las cuales contenían una mezcla estéril de teocintle y jal (1:1), cada maceta se cubrió con una bolsa de plástico de polietileno transparente por 15 días, para posteriormente transportar las plántulas a vivero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La consecución del tamaño óptimo de las plántulas (longitud de 2 a 3 cm) fue posible a los 56 días. El porcentaje de germinación se consideró alto al compararse con lo reportado para otras especies de cactáceas (Katja *et al.*, 2003; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005 y Aíra de Mederos *et al.*, 2006), por lo que se reporta que las semillas de *C. retusa* presentan alta tasa de viabilidad y no tienen latencia. Otros factores que explican la obtención de alto porcentaje de germinación fueron las condiciones que proporciona el medio MS como son la adecuada presión osmótica del medio y alta humedad relativa. Es importante mencionar que estudios similares para otras cactáceas no hacen referencia a la edad del fruto y el tiempo posterior a la colecta para la extracción de semillas, en la presente investigación se utilizó un fruto fresco cuyas semillas se extrajeron y cultivaron *in vitro* cinco días después de haberlo colectado en campo. Este hecho posiblemente influyó en el mantenimiento de la viabilidad y germinación de las semillas.

Después de 21 días de cultivo se observó desarrollo de callo blanco y poco compacto en los tratamientos con el regulador ANA, la presencia de callo se detectó en los lugares de corte que estuvieron en contacto con el medio de cultivo, tanto en los explantes apicales como laterales. Los explantes apicales presentaron cierta

variación en su morfología, ya que crecieron en tamaño pero su interior era hueco. Se conoce que la formación de callo va precedido de algún tipo de daño cuando las auxinas se añaden al medio de cultivo (George, 1993). En los tratamientos sin ANA no se desarrolló callo, contrario a lo reportado en otras especies de cactus, donde ha sido posible desarrollar callo en presencia de algún regulador de crecimiento (Katja *et al.*, 2003)

El mayor efecto en la proliferación de brotes a partir de explantes apicales lo produjo el tratamiento con 2 mg/L de 6-BAP y sin ANA, al presentar una media de 8.8 brotes, con un rango de 7 a 14 brotes por explante después de 70 días de cultivo, sin embargo estadísticamente no fue posible detectar diferencias significativas entre este tratamiento con los tratamientos que produjeron entre 6 y 7 brotes, lo que indica que la aplicación de 6-BAP a concentraciones de 1 y 3 mg/L afecta negativamente la proliferación de brotes (Tabla 1).

En los explantes laterales, el desarrollo de brotes presentó un comportamiento similar a lo observado para los explantes apicales, es decir a mayor cantidad de 6-BAP en los tratamientos, el número de brotes disminuyó. Los tratamientos con las concentraciones de 2 a 3 mg/L produjeron la mayor cantidad de brotes de 6 a 10 (Tabla 1). Una respuesta similar en la proliferación de brotes se reporta para *Hylocereus undatus* al utilizarse una concentración de 2 mg/L de 6-BAP (Morales *et al.*, 2000). Esas eficiencias son similares a lo reportado para otras especies de cactáceas, en el cual la proliferación de brotes se obtuvo a partir de la activación de areolas. Dávila-Figueroa *et al.* (2005) reportó un rango de 7.8 a 19.7 en *Turbincarpus valdeziannus* y *T. pseudopectinatus*. En *Ariocarpus kotschyobeyanus* se obtuvo un promedio de siete brotes por explante mediante organogénesis directa y 38 por organogénesis indirecta (Karja *et al.*, 2003). La adición al medio de cultivo de altas concentraciones de 6-BAP y bajas o nulas concentraciones de ANA han permitido obtener altos porcentajes de brotes en diferentes especies de cactáceas, lo que concuerda con los resultados de la presente investigación (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Mata-Rosas *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002; Katja *et al.*, 2003; Aíra de Mederos *et al.*, 2006). Wakhlu y Bhau (2000) indujeron una alta producción de brotes en *Coryphanta elephantidens* cultivado *in vitro* en medio MS basal suplementado con 2,4-D y KIN, utilizando la vía de organogénesis indirecta.

Las citocininas, en especial la 6-BAP (bencilaminopurina), son capaces de generar brotes a través de la activación de areolas (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002; Katja *et al.*, 2003; Dávila-

Figuroa *et al.*, 2005), en este trabajo al utilizar 6-BAP, todos los brotes se obtuvieron mediante el sistema de activación de areolas, el cual tiene la ventaja de generar plantas genéticamente más estables ya que provienen de estructuras meristemáticas (Machado y Priori, 1996).

Tabla 1. Efecto de la combinación de la auxina ANA y de la citocinina 6-BAP sobre la proliferación de brotes en *C. retusa*.

Tratamiento (6-BAP+ANA mg/L)	Media de proliferación de brotes	
	Apicales	Laterales
Testigo	0.8 ^c	1.0 ^c
1.0+0.0	1.6 ^{de}	2.6 ^{bc}
1.0+0.5	2.4 ^{cde}	3.2 ^{bc}
1.0+1.0	4.4 ^{bcde}	4.6 ^{bc}
2.0+0.0	8.8 ^a	10.4 ^a
2.0+0.5	5.6 ^{abc}	7.4 ^{ab}
2.0+1.0	4.2 ^{bcde}	3.0 ^{bc}
3.0+0.0	6.6 ^{ab}	3.6 ^{bc}
3.0+0.5	5.2 ^{bcd}	5.8 ^{abc}
3.0+1.0	1.6 ^{de}	1.6 ^c
CV (%)	62.16	80.59

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $P < 0.05$.

En ambos tipos de explantes la menor producción de brotes se encontró en el control así como en el tratamiento con mayor concentración de 6-BAP y ANA con 0.8 a 1.6 brotes para el explante apical y de 1.0 a 1.6 brotes para el explante lateral. En todos los tratamientos, los brotes emergieron directamente de las areolas de los explantes tratados, asimismo se observó el desarrollo de brotes secundarios procedentes de las areolas de brotes primarios tanto *in vitro* como *ex vitro* (Figura 2A), este hecho indica que esta especie puede mantener su potencial morfogénico y continuar generando brotes después del periodo de inducción, efecto reportado para diferentes especies de cactáceas (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figuroa, 2002; Katja *et al.*, 2003; Dávila-Figuroa *et al.*, 2005).

El enraizamiento de los brotes se logró en todos los explantes en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento. Después de su adaptación *ex vitro*, las plantas regeneradas mostraron una morfología similar a la planta madre (Figura 2B), obteniéndose una sobrevivencia del 95 %.

CONCLUSIONES

La proliferación de brotes a partir de explantes tanto apicales como laterales fue mayor cuando las plantas micropropagadas se trataron con 6-BAP a 2.0 mg/L, al

producir en promedio nueve brotes por explante, por el contrario se indujo menor producción de brotes cuando se aplicaron altos niveles de 6-BAP y de ANA. En todos los brotes fue posible inducir el enraizamiento y las plantas regeneradas presentaron una sobrevivencia del 95 %, por lo que se confirma que la técnica de micropropagación es útil para reproducir a *C. retusa* vía organogénesis. El protocolo que se describió en esta investigación permite regenerar plantas completas de *C. retusa* y utilizarse en multiplicación masiva y rápida.

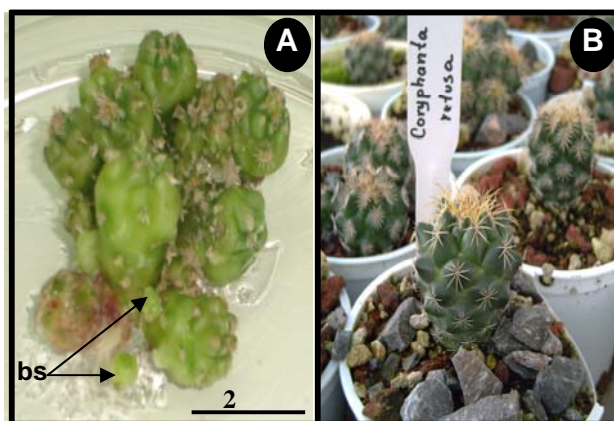


Figura 2. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose). A. Proliferación de brotes de explantes apicales obtenidos con 2.0 mg/L 6-BAP + 0.0 mg/L ANA después de 10 semanas de cultivo y presencia de brotes secundarios (bs) B. Plantas adaptadas y en crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero otorgado por el Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) para la realización de la presente investigación del Cuerpo Académico UDG-CA-295 Biotecnología y Sanidad de la Universidad de Guadalajara.

REFERENCIAS

- Aíra de Mederos, L.; Salvador de Ribeiro, R.C.; Gallo, L.A.; Tiago De Oliveira, E.; Payáo, E.S. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 84: 165-169.
- Dávila-Figuroa, C.A., De La Rosa-Carrillo M.L., Pérez-Molphe, B. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 41: 540-545.

- Dicht, R.F., Lüthy, A.D. 2005. *Coryphanta* Cacti of Mexico and Southern USA. Springer-Verlag, Germany. 200 p.
- Infante, R. 1992. *In vitro* auxiliary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31: 155-159.
- George, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology.* Exegetics, Limited. England.
- Giusti, P., Vitti D., Fiocchetti F., Colla G., Saccardo F., Tucci M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Hernández, H.M., Godínez, A.H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52.
- Katia, G., Goldammer, M., Mata-Rosas M., Chávez-Ávila V.M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Iriocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 388-393
- Machado, M.F.P.S., Priori, A.J. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*. 32: 155-159.
- Mata-Rosas, M., Monroy-De La Rosa, M., Goldammer, K.M., Chávez-Ávila, V.M. 2001. Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37: 400-404.
- Morales, R.E., Torres, C.T., Verde, S.J., Mercado, H.R., Cárdenas, C.E., Treviño, N.J. 2000. Germinación, desarrollo y cultivo “*in vitro*” de *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose. *In: Resúmenes del Simposio Internacional sobre el Cultivo y Aprovechamiento de la Pitaya (Stenocereus) y la Pitahaya (Hylocereus y Selenicereus).* Guadalajara, Jalisco, México, 10-13 de mayo de 2000. Universidad de Guadalajara, Fundación Produce Jalisco, A. C. 60 p.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial de la Federación. Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F. Febrero 13, 2002.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Villalobos, E., Meza, E., Morone, L.R., Lizalde, J. 1998. Propagation of 21 species of Mexican cactus by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34: 131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila-Figueroa, C.A. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 73-78.
- Phillips, G.C., Collins, G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration of red clover. *Crop Science* 19: 59-64.
- Rodríguez-Garay, B., Rubluo, A. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal (US)* 64: 116-119.
- SAS. 1999. SAS/STAT Introductory Guide, Version 8.0. SAS Institute. Cary, NC. USA. 1028 p.
- Torres-Muñoz, L., Rodríguez-Garay, B. 1996. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbiniacarpus pseudomacrochele* (Buxbaum and Backeberg). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 1: 36-38.
- Wakhlu, A.K., Bhau, B. 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphanta elephantidens* (Lem). Lem. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 211-214.

Submitted January 09, 2009 – Accepted May 06, 2009

Revised received May 27, 2009