

Efecto de las fitohormonas en la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Ríha, una cactácea endémica de San Luis Potosí en vía de extinción.

GEORGINA GUADALUPE SARABIA-VELA, ABRAHAM DE JESÚS ZAMUDIO-AYALA, ANDRÉS ADOLFO ESTRADA-LUNA, ABRAHAM AGUSTÍN ARELLANO-PERUSQUÍA

Resumen— *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Ría es un cactus amenazado de extinción. Para rescatar la especie y establecer un sistema de micropropagación comercial y sustentable se llevó a cabo este estudio. Se aislaron y cultivaron areolas en medio MS con tres diferentes citocininas: 2ip (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg L⁻¹), KN (0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mg L⁻¹), BA (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg L⁻¹). A los 150 días se observaron dos respuestas: producción de raíces y brotes. Todos los tratamientos excepto el control lograron la producción de raíces adventicias pero 2ip 2, 3 y 4 mg L⁻¹; BA 0.5, 2 y 4 mg L⁻¹ y KN 6, 9, 12 y 18 mg L⁻¹ fueron los mejores (90%). KN 15 mg L⁻¹ produjo el mayor número de raíces por explante (5), seguido de KN 1.5, 2ip 0.5, KN 9 y KN 12 mg L⁻¹. Las tres citocininas evaluadas rompieron la dormancia de las yemas, sin embargo, el número de brotes producidos varió en función de la concentración adicionada, siendo BA: 6 mg L⁻¹ la que mayor número de brotes generó (3.1 brotes por explante en promedio), seguida por la citocinina 2ip: 2 mg L⁻¹ (3 brotes por explante en promedio). Dado lo anterior, se logró conocer el efecto de las fitohormonas de tipo citocinina en la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Ría.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es nativa de América. Su área de distribución abarca una gran superficie que incluye desde el sur de Canadá hasta Argentina. México es el país que posee la mayor diversidad de especies dentro de este grupo, además de un alto índice (78 %) de endemismo (Hernández y Godínez, 1994). Desafortunadamente, 255 taxones de cactáceas mexicanas están amenazados, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Además, algunas organizaciones internacionales como el Libro Rojo de la IUCN y el Apéndice de la CITES incluyen en sus listados a 65 y 41 taxones, respectivamente. Entre las muchas cactáceas mexicanas amenazadas, resultan de especial interés las del

género *Turbinicarpus*, el cual es endémico de las regiones centro y sur del Desierto Chihuahuense, el que se extiende desde la Meseta Central de México hasta el Suroeste de los EEUU. Este género incluye varias especies y subespecies de cactus de tamaño relativamente pequeño que son muy apreciadas por los coleccionistas debido a su belleza, a la facilidad con la que producen flores y a su talla reducida, que permite el mantenimiento de grandes colecciones en espacios mínimos. Lo anterior ha traído como resultado una intensa colecta ilegal que ha afectado a las poblaciones silvestres.

Este fenómeno se agrava debido a que muchas de las especies de este género tienen áreas de distribución muy restringidas y son muy sensibles a los disturbios ecológicos, por lo que su hábitat está siendo constantemente degradado [1]. Algunas actividades humanas que se desarrollan en estas áreas de distribución, tal como la extracción de materiales pétreos, han afectado y producido importantes disturbios de los hábitats naturales de algunas especies del género [2]. La conservación de los individuos del género *Turbinicarpus* se complica debido a su lento crecimiento y la reducida capacidad para activar sus areolas y producir re-brotes en condiciones ambientales naturales, lo cual da como resultado una pobre capacidad de recuperación de las poblaciones naturales. Esta situación se empeora si se considera que varias especies tienen problemas de autoincompatibilidad, por lo que manifiestan una muy baja producción de semillas y una baja tasa de germinación, que sólo llega a ser del 8% en algunas ocasiones. Esto último se debe tanto a la pérdida de viabilidad como a la existencia de diversos mecanismos de latencia [3] [4].

Turbinicarpus gielsdorffianus (Werderm.) V. John & Ríha, es una especie considerada actualmente en estado crítico por la IUCN Red List of Threatened Species (lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza) y en categoría de amenazada (A) por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 debido a la colecta ilegal y pérdida de hábitat, donde sus poblaciones han disminuido un 80-90 % en los últimos cinco años, por lo que es urgente la implementación de técnicas de propagación intensiva para el rescate y conservación de la especie. Una de las alternativas más prometedoras para la conservación y uso racional de este tipo de plantas la constituyen los sistemas de cultivo o regeneración *in vitro*.

GEORGINA GUADALUPE SARABIA-VELA y ABRAHAM DE JESÚS ZAMUDIO-AYALA pertenecen a la carrera de INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN DE LA ESCUELA DE AGRONOMÍA y realizaron el proyecto dentro del curso de FISIOLÓGIA VEGETAL.

El proyecto fue asesorado por el PROF. ABRAHAM AGUSTÍN ARELLANO-PERUSQUÍA Y EL DR. ANDRÉS ADOLFO ESTRADA-LUNA (aestradaluna@yahoo.com), profesores investigadores de la Escuela de Agronomía de la Universidad De La Salle Bajío Campus Campestre.

Agradecemos a la Dirección de Investigación de la Universidad De La Salle Bajío Campus Campestre y al CINVESTAV-Irapuato por los recursos brindados para la realización del presente proyecto.

La propagación masiva a través de las técnicas de regeneración *in vitro* o micropropagación ya se ha logrado con buenos resultados en varias especies del género *Turbinicarpus*. Existen reportes para *Turbinicarpus pseudomacrole* [5], *T. schmiedickeanus* var. *Klinkerianus* [6], *T. laui* [7], *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, *T. subterraneus*, *T. schmiedickeanus* var. *Schwarzii*, *T. roseiflorus*, *T. valdezianus* [8] [9] [10] [11] [12], *T. knuthianus* [13] y recientemente para *T. ysabelae* [14], mas no los hay para la especie aquí propuesta. Por tal motivo, en el presente estudio proponemos la regeneración de plantas a través de sistemas de cultivo *in vitro* como herramienta para el rescate, conservación y propagación comercial de esta especie amenazada por la extinción.

II. OBJETIVO

Conocer y evaluar el efecto de las fitohormonas (citocininas) en la regeneración *in vitro* de plantas de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha.

III. MATERIALES Y METODOS

El material vegetal usado en este trabajo fueron plantas de 3 años de edad de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha las cuales fueron utilizadas como donadoras de explantes para la proliferación *in vitro* a través de la activación de areolas (yemas axilares), a las cuales se les disectó manualmente el sistema radicular con la ayuda de un bisturí previamente esterilizado y se colocaron en una solución de etanol al 75 % durante 10 minutos. Posterior a esto, se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 30 % (v/v) preparada a partir del producto comercial Clorox con el 6 % de Cl activo, más 0.01 % del surfactante Tween-20 (SIGMA-ALDRICH) por un lapso de 20 minutos y bajo agitación continua, para después decantar la solución desinfectante y el surfactante y enjuagar al menos cinco veces con agua desionizada esterilizada. Finalizado lo anterior, las plantas fueron colocadas en una solución que contenía 1 ml de PPM (Plant Preservative Mixture) por cada 100 ml de agua desionizada estéril con el fin de asegurar la limpieza de los explantes a través de éste biosida. Finalmente, con ayuda de bisturí y pinzas esterilizadas, se cortaron fragmentos de tallo con areolas (yemas axilares) y se sembraron en placas de cultivo de 100 mm X 25 mm con 20 ml de medio basal M&S [15] adicionado con diferentes tipos y concentraciones de fitohormonas y ajustando el pH a 5,7. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación iluminado con lámparas de luz blanca de 75 W, con una intensidad lumínica de 250.25 Lux (25.075 μmol) y fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad a nivel de la placa. La temperatura de incubación se mantuvo a 25 ± 2 °C aproximadamente.

Para el establecimiento de los cultivos e inducción de respuesta morfogénéticas (organogénesis) se evaluó la respuesta de los explantes de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha a diferentes concentraciones y reguladores del crecimiento o fitohormonas (citocininas). Se llevó a cabo un experimento con un diseño estadístico simple y una distribución completamente al azar con el propósito de determinar la mejor concentración y tipo de regulador del crecimiento. Los tratamientos evaluados en este experimento fueron diferentes concentraciones de las siguientes citocininas: 2ip (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg L⁻¹), KN (0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mg L⁻¹) y BA (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg L⁻¹), dando un total de 24 tratamientos (incluyendo el control) los cuales estuvieron representados por 8 explantes (n=8). Las variables evaluadas fueron: desarrollo de raíces por explante (DRE) [%], número de raíces por explante (NRE), desarrollo de brotes por explante (DBE) [%] y número de brotes por explante (NBE).

Con el fin de determinar el efecto de los tratamientos probados, todos los datos obtenidos en este estudio fueron sometidos a un análisis paramétrico de varianza (ANDEVA) y los promedios fueron comparados con la prueba de Fisher (5%) mediante el software XL-Stat 2009.3.02.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

El presente trabajo se llevó a cabo con el propósito de establecer las bases para la propagación asexual de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha a través del cultivo de tejidos. La técnica que se estudió fue la activación de yemas axilares (areolas) para la regeneración de brotes múltiples.

Después de 82 días de iniciados los cultivos se comenzaron a producir dos tipos de respuestas morfogénéticas en los explantes de algunos tratamientos: **1)** la brotación directa a partir de la activación de las yemas axilares presentes en las areolas y **2)** la producción de raíces adventicias (**Figura 1**). Es importante mencionar que por naturaleza, esta especie vegetal muestra tasas de crecimiento extremadamente lentas, por lo que bajo condiciones *in vitro* se observó el mismo comportamiento. Debido a esto, antes de realizar el conteo final de los brotes se dio un subcultivo a medio fresco para mantener vivos los explantes y permitir el crecimiento de los brotes producidos.

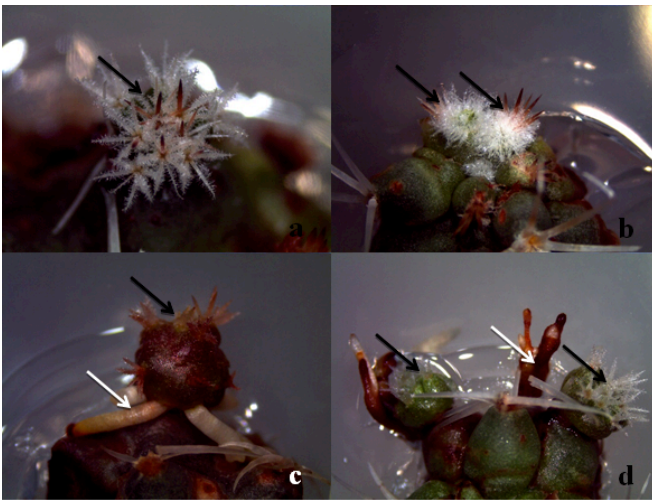


Figura 1. Explantes de *Turbinicarpus gielsdorfianus* (Werderm.) V. John & Ríha después de 83 días de cultivo sometidos a diferentes tipos y concentraciones de citocininas. **a y b** inicio de la activación de yemas axilares y desarrollo de brotes (**flechas negras**); **c y d** brotes bien diferenciados y en proceso de activo crecimiento producto de la activación de las areolas (**flechas negras**) y presencia de raíces adventicias en brote diferenciado y explante (**flechas blancas**).

A los 150 días de iniciados los cultivos en los diferentes tratamientos evaluados, y dadas las dos respuestas morfológicas mencionadas con anterioridad todos los explantes de los tratamientos probados se observó que mostraron la regeneración de brotes producto de la activación de las yemas axilares o areolas, así como la regeneración de raíces adventicias (**Figura 2**).

En términos generales, se observó que las tres citocininas evaluadas en este experimento fueron capaces de romper la dormancia de las yemas axilares de *Turbinicarpus gielsdorfianus* (Werderm.) V. John & Ríha, sin embargo, el número de brotes producidos varió en función de la concentración adicionada a los medios de cultivo.

En el presente estudio se evaluaron las variables desarrollo de raíces por explante (DRE) [%], número de raíces por explante (NRE), desarrollo de brotes por explante (DBE) [%], número de brotes por explante (NBE).

El análisis de los datos obtenidos de la variable DRE reveló diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados según los análisis de varianza (ANDEVA) realizados.



Figura 2. Secuencia de fotos donde se muestra la regeneración de brotes de *Turbinicarpus gielsdorfianus* (Werderm.) V. John & Ríha a partir de la activación de las yemas axilares (**flechas negras**) y la diferenciación de raíces adventicias (**flechas blancas**) en los explantes utilizados en el experimento de inducción después de 150 días de cultivo.

En el **Cuadro 1** se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias de los datos obtenidos en la variable DRE. En general, se puede observar que todos los tratamientos desarrollaron raíces adventicias (excepto el control) siendo los tratamientos 2ip 2, 3 y 4 mg L⁻¹; KN 6, 9, 12 y 18 mg L⁻¹ y BA 0.5, 2 y 4 mg L⁻¹ los que más presentaron desarrollo de raíces en sus explantes (90%).

En lo que se refiere al NRE, el análisis de los resultados obtenidos de esta variable reveló diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados según los análisis de varianza (ANDEVA) realizados. Se pudo observar que el valor promedio más alto encontrado para esta variable fue el tratamiento KN 15 mg L⁻¹ donde se produjeron 5 raíces por explante, seguidos de KN 1.5, 2ip 0.5, KN 9 y KN 12 mg L⁻¹ (4.8, 4.6, 4.3 y 4.2 raíces por explante respectivamente) [**Cuadro 1**].

Cuadro 1. Resultados de la prueba de comparación de medias de los datos de la variable DRE y NRE durante el cultivo de *Turbinicarpus gielsdorfianus* (Werderm.) V. John & Riha, después de 150 días de cultivo.

Tratamiento (mg L-1)	Valor medio DRE (%)	Valor medio NRE
2ip 0.5	78.75 ab*	4.62 abc*
2ip 1.0	67.50 ab	2.12 defg
2ip 2.0	90.00 a	3.00 abcdef
2ip 3.0	90.00 a	3.62 abcdef
2ip 4.0	90.00 a	3.25 abcdef
2ip 5.0	56.25 b	1.50 fg
2ip 6.0	67.50 ab	2.25 defg
KN 1.5	67.50 ab	4.87 ab
KN 3.0	56.25 b	2.12 defg
KN 6.0	90.00 a	3.25 abcdef
KN 9.0	90.00 a	4.37 abcd
KN 12.0	90.00 a	4.12 abcde
KN 15.0	78.75 ab	5.00 a
KN 18.0	90.00 a	2.75 abcdef
BA 0.5	90.00 a	4.00 abcde
BA 1.0	78.75 ab	2.25 defg
BA 2.0	90.00 a	2.62 bcdef
BA 3.0	67.50 ab	2.37 cdef
BA 4.0	90.00 a	3.00 abcdef
BA 5.0	67.50 ab	2.12 defg
BA 6.0	58.50 b	1.87 efg

*Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Fisher ($\alpha = 0.05$).

Se tienen reportes de la generación de raíces adventicias en condiciones *in vitro* en explantes de *Ortegocactus macdougallii* y *Turbinicarpus swoboda* [16,17] al usar combinaciones de hormonas que incluyen Auxina:Citocinina (ANA:BA) en concentraciones de 3 mg L-1, mostrando ser este balance en las concentraciones de los dos reguladores del crecimiento el adecuado para controlar la diferenciación y desarrollo de raíces. Sin embargo, en los tratamientos usados en el presente trabajo no se adicionaron auxinas y también se observó la presencia de raíces adventicias. Esta respuesta puede deberse a que la concentración endógena de auxinas de éstos explantes eran adecuadas para promover la generación de raíces adventicias, tal y como sucede cuando se somete a enraizamiento un esqueje en condiciones de vivero [18] [19].

Los datos obtenidos señalan que todas las citocininas evaluadas en las diferentes concentraciones adicionadas en los medios de cultivo fueron capaces de inducir la diferenciación de raíces, lo cual contrastó con lo observado en los tratamientos control; sin embargo, el número de raíces producido estuvo influenciado fuertemente en relación a la concentración, aunque no se aprecia una tendencia clara.

Respecto a la regeneración de brotes, el análisis de los resultados obtenidos de la variable DBE reveló diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados según los análisis de varianza (ANDEVA) realizados.

En el **cuadro 2** se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias. Se pudo observar que el valor promedio más alto encontrado para esta variable fueron los tratamientos 2ip 2, 3 y 4 mg L-1; BA 2 y 3 mg L-1 y KN 9 mg L-1 donde el 90% de los explantes regeneraron brotes

derivados de la activación de las yemas axilares. El resto de los tratamientos oscilo entre el 45 y 78.7 % de explantes que presentaron activación meristemática axilar.

En cuanto a la variable NBE, se observó que la respuesta a la activación de yemas axilares fue satisfactoria en varios tratamientos. El análisis de los resultados obtenidos de la variable reveló diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados según los análisis de varianza (ANDEVA) realizados. Se pudo observar que el valor promedio más alto encontrado para esta variable fue el tratamiento BA 6 mg L-1, seguido del tratamiento 2ip 2 mg L-1 y KN 12, BA 5 y BA 3 mg L-1 donde estos últimos tres no muestran diferencias significativas entre ellos, pero resultaron estadísticamente diferentes a los promedios de los tratamientos restantes. En términos generales, se podría considerar que el tratamiento con BA 6 mg L-1 resultó ser el mejor, ya que la tendencia muestra que indujo el mayor número de brotes por explante (3.1). Debemos resaltar que las concentraciones evaluadas para BA muestran que conforme se incrementan estas, se logró una mayor inducción de brotes (BA 4, BA 5 y BA 6 mg L-1 produjeron 1.5, 2.6 y 3.1 brotes por explante respectivamente), sin embargo, con el rango de concentraciones evaluadas no se alcanzó el punto máximo de producción de brotes. Contrario a esto, con KN y 2ip logramos obtener el óptimo tratamiento dentro del rango de las concentraciones evaluadas, ya que en el caso de KN en el tratamiento de 12 mg L-1 produjo un valor medio de 2.7 brotes por explante, el cual se redujo cuando se incrementó la concentración a 15 mg L-1 (1.7 brotes por explante en promedio). De manera similar se observó en 2ip, donde en el tratamiento de 2 mg L-1 produjo un valor medio de 3 brotes por explante, reduciéndose éste cuando se incrementó de 3 a 6 mg L-1 (entre 1.8 y 1.6 brotes por explante en promedio) [Cuadro 2].

Se observó que las tres citocininas a diferentes concentraciones lograron el rompimiento de la dominancia apical de los explantes, dando como resultado la activación de los meristemas axilares. Este proceso se logró inducir sin la adición de auxinas en el medio. En muchas cactáceas sometidas a la propagación *in vitro*, la adición de auxinas al medio de cultivo favorece una interacción positiva y cierto balance con las citocininas que parece ser de gran importancia cuando se desea la producción de brotes [20] [21]. Sin embargo, muchas veces esta interacción induce también una respuesta indeseable: la producción de callos. Debido a que la activación areolar y la consecuente brotación directa también se ha observado en algunas especies con la sola presencia de citocininas [22] [23] [24] y muy especialmente con el género *Turbinicarpus* [25] [26], estos resultados demuestran, que al menos para el género, parece seguir siendo más efectivo, en cuanto a número de brotes producidos por explante, el uso de reguladores de tipo citocinina sin la adición al medio de auxinas.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de comparación de medias de los datos de la variable DBE y NBE durante el cultivo de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha, después de 150 días de cultivo.

Tratamiento (mg L-1)	Valor medio DBE (%)	Valor medio NBE
2ip 0.5	67.50 abc*	0.87 def*
2ip 1.0	56.25 bc	1.00 def
2ip 2.0	90.00 a	3.00 ab
2ip 3.0	90.00 a	1.87 abcde
2ip 4.0	90.00 a	1.87 abcde
2ip 5.0	56.25 bc	0.87 def
2ip 6.0	67.50 abc	1.62 bcde
KN 1.5	45.00 c	0.50 ef
KN 3.0	56.25 bc	1.37 cde
KN 6.0	78.75 ab	1.62 bcde
KN 9.0	90.00 a	2.12 abcd
KN 12.0	78.75 ab	2.75 abc
KN 15.0	67.50 abc	1.75 abcde
KN 18.0	78.75 ab	2.12 abcd
BA 0.5	78.75 ab	1.62 bcde
BA 1.0	67.50 abc	1.00 def
BA 2.0	90.00 a	1.50 cde
BA 3.0	90.00 a	2.62 abc
BA 4.0	78.75 ab	1.50 cde
BA 5.0	78.75 ab	2.62 abc
BA 6.0	67.50 abc	3.12 a

*Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Fisher ($\alpha = 0.05$).

V. CONCLUSIONES

- Se logró conocer el efecto de las fitohormonas de tipo citocinina en la regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha.
- La regeneración de brotes en los cultivos fue el resultado de la activación de los meristemos o yemas axilares presentes en las aréolas.
- La regeneración de brotes estuvo bajo el control de las citocininas 2ip, KN y BA, siendo BA 6 mg L-1 la que mayor número de brotes generó (3.1 brotes por explante en promedio), seguida por la citocinina 2ip 2 mg L-1 (3 brotes por explante en promedio), KN 12, BA 5 y BA 3 mg L-1 (2.7, 2.6 y 2.6 brotes por explante en promedio respectivamente).
- Todos los tratamientos experimentales evaluados para *Turbinicarpus gielsdorffianus* (Werderm.) V. John & Riha lograron inducir la diferenciación de raíces adventicias en los explantes.

REFERENCIAS

[1] E. F. Anderson, "The Cactus Family", Timber Press, Portland, OR, EEUU, pp.776, 2001.

[2] J. G. Hernández-Oria, R. J. Chávez-Martínez, E. Sánchez-Martínez, "Factores de riesgo en las cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del Desierto Chihuahuense, México", *Interciencia*, vol. 32, pp. 728-734, 2007.

[3] J. Flores, A. Arredondo, E. Jurado, "Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus", *Natural Areas Journal*, vol. 25, pp. 183-187, 2005.

[4] J. Flores, E. Jurado, J. F. Jiménez Bremont, "Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae)", *Plant Sp. Biology*, vol. 23, pp. 43-46, 2008.

[5] L. Torres-Muñoz, B. Rodríguez-Garay, "Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg)", *J. PACD*, Vol. 1, pp 36-38, 1996.

[6] A. Arias-Azcona, R. M. E. Santa-Cruz, R. Soltero-Quintana, "Micropropagación de *Turbinicarpus schmiedickeanus* (Bödeker) F. Buxbaum y Backeberg var. *klinkerianus*, Cactaceae, Memorias Electrónicas del IX Congreso Nacional de Biotecnología, SMBB, Veracruz, México, 2001.

[7] M. Mata-Rosas, M. A. Monroy-De La Rosa, K. Moebius-Goldammer, V. M. Chávez-Ávila, "Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glass et Foster, an endemic and endangered species", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, vol. 37, num. 3, pp 400-404, 2001.

[8] T. Arenas, E. Monroy, R. Mata, B. Martín, A. Jiménez, G. Chávez, "Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus*", XV Congreso Mexicano de Botánica, Conservación y Manejo de Recursos, 2003.

[9] C.A. Dávila-Figueroa, M.L. De La Rosa-Carrillo, E. Pérez-Molphe-Balch, "In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae)", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, vol. 41, pp 540-545, 2005.

[10] M. S. Domínguez-Rosales, E. Pérez-Molphe-Balch, "Micropropagación de seis especies del género *Turbinicarpus* y análisis con marcadores moleculares de la variabilidad genética de once especies del mismo género", Memoria del primer congreso estatal "La Investigación en el Posgrado", Universidad Autónoma de Aguascalientes, 2005.

[11] J. Flores, E. Jurado, J. F. Jiménez-Bremont, "Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae)", *Plant Sp. Biol.*, vol. 23, pp. 43-46, 2008.

[12] H. T. García-Ozuna, A. Benavides-Mendoza, L. Escobedo-Bocardo, J. A. Villareal-Quintanilla, E. Cornejo-Oviedo, "Hyperhydricity control of *in vitro* shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) GL & F.", *Int. J. Exp. Bot.*, vol. 80, pp. 175-179, 2011.

[13] E. E. Villavicencio-Gutiérrez, A. González-Cortes, A. Arredondo-Gómez, L. Iracheta-Donjuan, S. Sofía Comparan-Sánchez, R. Casique-Valdés, "Micropropagación de *turbinicarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha Cactácea Ornamental del Desierto Chihuahuense, en Estatus de Riesgo". *Rev. Mex. Cien. For.*, vol. 6, num. 2, pp. 37-54, 2011.

[14] A. Arellano-Perusquía, A. A. Estrada-Luna, "Morphogenetic Responses Induced by Cytokinins During Micropropagation of *Turbinicarpus ysabelae* (Werderm.) John & Riha (Cactaceae)", *Southern Nursery Association: Research Conference*. Atlanta, GA, USA, Vol. 59, pp. 247-253, 2014.

[15] T. Murashige, F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, vol. 4, pp. 473-497, 1962.

[16] A. Arellano-Perusquía, M. C. G. López-Peralta, F. Chablé-Moreno, A. A. Estrada-Luna, "Effect of growth regulators on the organogenesis and multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander", *Propagation of Ornamental Plants*, num. 13, vol. 4, pp. 160-167, 2013.

[17] A. Arellano-Perusquía, A. A. Estrada-Luna, "Morphogenetic Responses Induced by Cytokinins During Micropropagation of *Turbinicarpus ysabelae* (Werderm.) John & Riha (Cactaceae)", *Southern Nursery Association: Research Conference*. Atlanta, GA, USA, vol. 59, pp. 247-253, 2014.

[18] T. A. Thorpe, "Plant tissue culture: methods and applications in Agriculture", Academic Press, Inc. London, England, 1981.

[19] R. N. Trigiano, D. J. Gray, "Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises", CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, U.S.A., 1996.

[20] J. L. Johnson, E. R. Emimo, "Tissue culture propagation in the cactaceae", *Cactus and Succulent Journal (U. S.)*, vol. 51, pp. 275-277, 1979a.

[21] J. D. Mauseth, "A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds", *Cactus Succulent Journal*, vol. 51, pp. 186-187, 1979.

[22] A. Dabekausen, M. Pierik, J. Hock, "Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch", *Scientia Horticulturae*, vol. 46, pp. 283-294, 1991.

[23] D. Ruvalcaba Ruiz, D. Rojas, A. Valencia, "Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* Britton & Rose, un cactus endémico y amenazado", *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 12, pp. 139-143 pp, 2010.

[24] A. A. Estrada-Luna, J. J. Martínez Hernández, M. E. Torres Torres, F. Chablé-Moreno, "In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck. and effects of sprayed GA3

after transplantation to *ex vitro* conditions”, *Scientia Horticulturae*, vol. 117, pp. 378-385, 2008.

- [25] H. T. Garcia Ozuna, A. Benavides Mendoza, L. Escobedo Bocardo, J. A. Villareal-Quintanilla, E. Cornejo Oviedo, “Hyperhydricity control of *in vitro* shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) GL & F. *International Journal Experimental Botany*, vol. 80, pp. 175-179, 2011.
- [26] A. Arellano Perusquía, A. A. Estrada Luna, “Morphogenetic Responses Induced by Cytokinins During Micropropagation of *Turbinicarpus ysabelae* (Werderm.) John & Riha (Cactaceae)”, *Southern Nursery Association: Research Conference*, Atlanta, GA, USA, vol. 59, pp. 247-253, 2014.