

GERMINACIÓN *IN VITRO* DE CACTÁCEAS, UTILIZANDO ZEOLITA COMO SUSTRATO ALTERNATIVO*

CACTI *IN VITRO* GERMINATION BY USING ZEOLITE AS ALTERNATIVE SUBSTRATE

Lidia Rosaura Salas-Cruz^{1§}, Rahim Foroughbackch-Pournabav¹, María de Lourdes Díaz-Jiménez³, María Luisa Cárdenas-Ávila² y Alfredo Flores-Valdes³

¹Departamento de Botánica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Universidad s/n. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C. P. 66451. Tel. 01 818 3159880, 3598158 y 3598158. (rahimforo@hotmail.com). ²Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad Autónoma de Nuevo León. (cardenasavila@yahoo.com). ³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Saltillo. Carretera Saltillo-Monterrey, km 13.5. Ramos Arizpe, Coahuila, México. C. P. 25900. Tel. 01 844 4389600. Ext. 8520. (lourdes.diaz@cinvestav.edu.mx), (alfredo.flores@cinvestav.edu.mx). [§]Autora para correspondencia: biolidiasalas@yahoo.com.mx.

RESUMEN

Se evaluó la germinación *in vitro* de seis especies de cactáceas usando zeolita como alternativa de sustrato. Se realizó la siembra *in vitro* de: *Astrophytum capricorne* A. Dietr. Britton & Rose, *A. myriostigma* Lem., *Echinocereus reichenbachii* Terscheck ex Walp. Haage, *Escobaria dasyacantha* Engelm Britton & Rose, *Mammillaria prolifera* Mill. Haw. y *Sclerocactus scheeri* Salm-Dyck N. P. Taylor. Para ello se aplicaron tres granulometrías de zeolita: fina (de 0.71 a 1 mm), mediana (de 1.1 a 2 mm) y gruesa (de 2.1 a 3.36 mm de calibración). En total se aplicaron nueve tratamientos a las estructuras de granulometrías de zeolitas: fina, mediana y gruesa + agua destilada (tratamientos 1, 2 y 3), tres tipos de zeolitas + medio Murashige y Skoog (MS) (tratamiento 4, 5 y 6); tratamiento 7 agar + MS + sacarosa, tratamiento 8 agar + MS; y tratamiento 9 agar. Se analizaron estadísticamente los resultados sobre la tasa de germinación y se determinaron diferencias altamente significativas para las variables porcentaje ($F=7.036$, $p<0.01$), velocidad (7.767 , $p<0.01$) e índice de germinación (4.298 , $p<0.01$). Los valores de germinación más altos se obtuvieron con el tratamiento agar + MS con un valor promedio de 63.3%; seguido del

ABSTRACT

By using zeolite as an alternative substrate, *in vitro* germination of six cacti species was evaluated. *In vitro* seeding was performed for: *Astrophytum capricorne* A. Dietr. Britton & Rose, *A. myriostigma* Lem., *Echinocereus reichenbachii* Terscheck ex Walp. Haage, *Escobaria dasyacantha* Engelm Britton & Rose, *Mammillaria prolifera* Mill Haw. and *Sclerocactus scheeri* Salm-Dyck N. P. Taylor. In order to do this, three particle sizes of zeolite were applied: thin (from 0.71 to 1 mm), medium (from 1.1 to 2 mm) and coarse (2.1 to 3.36 mm of calibration). A total of nine treatments were applied to zeolite's structures of the following granulometric sizes: fine, medium and coarse + distilled water (treatments 1, 2 and 3), three types of zeolites + Murashige and Skoog (MS) (treatment 4, 5 and 6) treatment 7 agar + MS + sucrose, treatment 8, agar + MS; and treatment 9 agar. The germination index evaluation results were statistically analyzed identifying highly significant differences for the variables percentage ($F=7.036$, $p<0.01$), speed (7.767 , $p<0.01$) and germination index (4.298 , $p<0.01$). The highest germination values were obtained with agar +

* Recibido: enero de 2011
Aceptado: julio de 2011

tratamiento zeolita mediana + MS (58%). La especie con mejor respuesta germinativa fue *E. dasyacantha* (92.6%), seguida de *A. myriostigma* (54.07%). Este protocolo indica la conveniencia de usar como sustrato zeolitas sustituyendo al agar, favoreciendo así acciones de conservación *in vitro* de cactáceas, aprovechando lo redituable del sustrato debido a su abundancia y fácil obtención.

Palabras clave: agar, cactáceas, germinación in vitro, zeolita natural.

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae contiene entre 1 500 y 2 000 especies (Hunt, 1999; Guzmán *et al.*, 2007; Velazco, 2009). Para México esta familia es considerada de gran importancia en cuanto a su diversidad biológica. Se estima que las cactáceas en la flora de México alcanzan alrededor de 700 especies, que corresponde al 40% de la familia, siendo el país más diverso para este grupo de plantas, con más 84% de endemismo a nivel de especie (Arias, 1993). Sin embargo, sus poblaciones naturales han sido diezmadas por el cambio de uso de suelo y la extracción ilegal de especies de alto valor ornamental. El empleo de cactáceas como plantas de colección u ornamentales es quizá el más demandado a nivel internacional, por su rareza y belleza y sobre todo por su lento crecimiento y hermosa floración (Carmona *et al.*, 2008). Alrededor de 300 especies de cactus están disponibles como ornamentales.

Usualmente los cactus son propagados por semilla y esquejes; sin embargo, estos métodos convencionales, aunados a la falta de metodologías más eficientes de propagación, no siempre resultan satisfactorios, especialmente en aquellas especies en peligro de extinción, de lento crecimiento y que producen pocas semillas. Otros métodos usuales para la propagación de cactáceas son: hijuelos, yemas e injertos (Reyes *et al.*, 2001). Por lo tanto, es inminente la necesidad de establecer técnicas de producción de cactáceas eficientes y de bajo costo, para satisfacer la alta demanda que ha vuelto vulnerables a las poblaciones naturales de este llamativo grupo de plantas.

Al respecto, Bunt (1988) señala que la calidad de las plántulas depende del tipo de sustrato donde se desarrollan, en particular de sus características físico-químicas, ya que el desarrollo y el funcionamiento de las raíces están

MS treatment. The species with the highest germination response was *E. dasyacantha* (92.6%), followed by *A. myriostigma* (54.07%). This protocol calls for the convenience of using zeolites as a replacement for agar substrate, thus promoting the cacti *in vitro* conservation, taking advantage of such profitable substrate because of its abundance and easy acquisition.

Key words: Agar, cacti, *in vitro* germination, natural zeolite.

INTRODUCTION

The Cactaceae family contains between 1 500 and 2 000 species (Guzmán *et al.*, 2007; Hunt, 1999; Velazco, 2009). For Mexico, this family is considered quite important in terms of its biodiversity. It is estimated that in the Mexican flora, Cactaceae reach about 700 species, corresponding 40% of the whole family, being the most diverse country in this group of plants, with over 84% of endemism at species level (Arias, 1993). However, its natural populations have been decimated by the change in land-use and the illegal extraction of high valued ornamental species. Due to their beauty, scarcity and slow growing, cacti are one of the plant groups more requested internationally (Carmona *et al.*, 2008). Around 300 species of cacti are available as ornamentals.

Cacti usually are propagated by seed and cuttings, but these conventional methods, combined with the lack of more efficient methods of propagation, not always are satisfactory, especially in endangered species, with slow growing and produce few seeds. Other conventional methods for the propagation of cacti are shoots, buds and grafts (Reyes *et al.*, 2001). Therefore, it is important to define new, efficient and economical cacti production techniques, to meet the high demand that has become vulnerable the natural populations of this remarkable group of plants.

About plant propagation, Bunt (1988) indicates that the quality of seedlings depends on the substrate where they develop, in particular its physic-chemical characteristics, because the development and functioning of roots are directly linked to the conditions of aeration, water content, as well as having direct influence on the availability of nutrients. Meanwhile, Andrade *et al.* (2008), consider

directamente ligados a las condiciones de aireación, contenido de agua, además de tener influencia directa sobre la disponibilidad de los nutrientes. Por su parte, Andrade *et al.* (2008), consideran necesario usar en los sustratos algún componente que aporte nutrimentos para el crecimiento de las plantas, además del soporte adecuado.

Una opción para cubrir dichas necesidades específicas lo constituyen las zeolitas naturales que son minerales del grupo de los aluminosilicatos hidratados con estructura porosa, que presentan alta capacidad de retención de humedad y de intercambio catiónico. Estas características físicas y químicas las hacen un sustrato atractivo en la agricultura (Allen y Ming, 1995; Urbina *et al.*, 2006) y para el cultivo de cactáceas entre otras plantas; sin embargo, en México, la información sobre las zeolitas como sustrato natural, abundante y económico es mínimo para las especies en general, y nulo para el caso de la producción y propagación de las cactáceas.

Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten la propagación masiva y comercial de especies de interés hortícola (Thorpe, 1981); por lo tanto, la germinación *in vitro* de cactáceas con alta demanda ornamental puede llegar a tener un gran impacto a nivel industrial y en la conservación *in situ* (Molina *et al.*, 2005), abasteciendo la alta demanda en el mercado (Manzo, 2010), lo cual reduciría el saqueo ilegal en las poblaciones silvestres. El propósito del presente estudio es desarrollar una nueva estrategia, mediante la aplicación de metodologías para acelerar el proceso de germinación *in vitro* de cactáceas, aprovechando las propiedades físicas y químicas de zeolitas naturales, como una buena alternativa de sustrato que ayudaran a incrementar la tasa de germinación de las especies de cactáceas.

En base a este objetivo se planteo la siguiente hipótesis: los tratamientos aplicados a zeolitas naturales incrementan en forma significativa la tasa de germinación de las especies de cactáceas en el estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las especies de cactáceas evaluadas fueron: *Astrophytum capricorne* (A. Dietr.) Britton & Rose, *Astrophytum myriostigma* Lem. (ambas endémicas y bajo estatus

necessary to use on substrates some kind of component that provides nutrients for plant growth, in addition to suitable support.

An option to meet those specific needs is natural zeolites which are minerals of the hydrated aluminosilicates group with pore structure, with high moisture holding capacity and cationic exchange. These physical and chemical properties make them an attractive substrate in agriculture (Allen and Ming, 1995; Urbina *et al.*, 2006) and for the cultivation of cacti and other plants, but in Mexico, information about zeolites as abundant and cheap natural substrate is minimal for the species in general, and zero for the case of the production and propagation of cacti.

The *in vitro* culture techniques allow mass and commercial propagation of several horticultural interest species (Thorpe, 1981), therefore, *in vitro* germination of ornamental cacti with high market demand can have a high impact in terms of their industrial use and also in their *in situ* conservation (Molina *et al.*, 2005), supplying the high demand in the market (Manzo, 2010), which would reduce looting on their wild populations. The purpose of this study is to develop a new strategy by applying methodologies to accelerate the process of *in vitro* germination of cacti, taking advantage of physical and chemical properties of natural zeolites as a good alternative substrate to help increase the rate of germination of species of cacti.

Based on this objective, the following hypothesis was proposed: the treatments applied to natural zeolites significantly increased the germination rate of the species of cacti involved in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal materials

Cacti species evaluated were: *Astrophytum capricorne* (A. Dietr.) Britton & Rose, *Astrophytum myriostigma* Lem. (both endemic and in threatened status according to NOM-ECOL-059-2001-SEMARNAT), *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck ex Walp.) Haage, *Escobaria dasyacantha* (Engelm) Britton & Rose, *Mammillaria prolifera* (Mill.) Haw. and *Sclerocactus scheeri* (Salm-Dyck) N. P. Taylor. Seeds were provided by Dr. Alfredo Flores Valdés (Senior Researcher at CINVESTAV, Saltillo Unit), from his collection registered under Num. MX/VIV-CO-132/COAH.

amenazada de acuerdo a la NOM-ECOL-059-2001-SEMARNAT), *Echinocereus reichenbachii* (Terscheck ex Walp.) Haage, *Escobaria dasyacantha* (Engelm) Britton & Rose, *Mammillaria prolifera* (Mill.) Haw. y *Sclerocactus scheeri* (Salm-Dyck) N. P. Taylor. Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Alfredo Flores Valdés (Profesor investigador del CINVESTAV, Unidad Saltillo), procedentes de su colección registrada bajo el Núm. MX/VIV-CO-132/COAH.

Criterio de la selección de especies

La selección de especies para el estudio fue efectuado en base su adaptabilidad, su potencial e importancia ecológica y ornamental. Además las especies mencionadas se encuentran presentes dentro de las áreas naturales protegidas de zonas desérticas del noreste de México consideradas de gran riqueza y diversidad de cactáceas, de acuerdo a lo reportado por Carmona *et al.* (2008), tomando en cuenta las siguientes características: a) mínimo nodricismo; b) asociación a sustrato rocoso; c) alta tasa de crecimiento; d) valor ornamental; e) endemismo; f) especies en peligro de extinción; y g) valor ecológico.

Sustratos y tratamientos

Se evaluó el tamaño de las partículas de sustrato para establecer una relación con la eficiencia en la toma de nutrientes por la planta, expresado en el porcentaje, velocidad e índice de germinación. Para esto se tamizó la zeolita a tres granulometrías de sustratos: fina (de 0.71 a 1 mm), mediana (de 1.01 a 2 mm) y gruesa (de 2.01 a 3.36 mm de calibración). Se realizó la siembra en cada granulometría.

En total se aplicaron nueve tratamientos. Los tratamientos 1 a 3 consistieron en 10 g de zeolita de cada una de las respectivas granulometrías, más 10 mL de agua destilada. En el caso de los tratamientos 4 al 6, se usaron 10 g de zeolita de cada una de las respectivas granulometrías y fue humedecida con 10 mL de sales básicas del medio Murashige y Skoog (MS), señalado como MS al 50% de su concentración original. Se ajustó el pH del medio a pH 5.7. Para los tratamientos 7 y 8, se usaron las sales básicas del medio MS al 50% y agar (4 g L⁻¹) con y sin sacarosa (10 g L⁻¹) respectivamente (10 mL por frasco). Finalmente, para el tratamiento 9 se usó agar-agua (4 g L⁻¹) a razón de 10 mL por frasco (Cuadro 1). Todos los tratamientos fueron esterilizados a 121 °C y 15 libras de presión por 15 min.

Species selection criteria

The selection of species for this study was conducted based on their adaptability, ecological importance and their potential as ornamentals. Besides the above, the indicated species are present within the protected areas of desert areas of northeastern Mexico considered of great richness and diversity of cacti, according to that reported by Carmona *et al.* (2008), taking into account the following characteristics: a) minimum nodricism; b) association to rocky substrate; c) high growth rate; d) ornamental value; e) endemism; f) endangered species, and g) ecologic value.

Substrates and treatments

It was evaluated the particle size of substrate to establish a connection with the efficiency of nutrient uptake by the plant, expressed in percentage, speed and rate of germination. For this zeolite was sieved to three particle sizes of substrates: fine (from 0.71 to 1 mm), medium (from 1.01 to 2 mm) and coarse (2.01 to 3.36 mm of calibration). The sowing was carried out in each indicated zeolite size.

A total of nine treatments were applied. The treatments 1 to 3 consisted of 10 g of zeolite for each of the respective particle sizes, plus 10 mL of distilled water. In the case of treatment 4 to 6 were used 10 g of zeolite for each of the respective particle sizes and was moistened with 10 mL of basic salts of Murashige and Skoog (MS) medium, designated as MS 50% of their original concentration. The pH of the medium was adjusted at pH 5.7. For treatments 7 and 8, were used basic salts of MS medium at 50% and agar (4 g L⁻¹) with and without sucrose (10 g L⁻¹) respectively (10 mL per bottle). Finally, for the treatment 9 was used agar-water (4 g L⁻¹) at 10 mL per bottle (Table 1). All treatments were sterilized at 121 °C and 15 pounds of pressure for 15 min.

Before sowing, seeds were submerged in sterile distilled water for 10 min, followed by absolute ethyl alcohol for 30 s. They were then disinfected with a solution of commercial sodium hypochlorite (Cloralex®) diluted to 20% (v/v) containing 0.1% Tween 20 for 15 min. Subsequently, and under aseptic conditions, the seeds were rinsed again with 500 mL of sterile distilled water and were placed for germination in glass bottles (35 mL). The culture conditions were: photoperiod 12 h light and 26 ± 1 °C in a growth chamber (SEV model INLC 297).

Antes de la siembra, las semillas fueron sumergidas en agua destilada estéril por 10 min, seguido de alcohol etílico absoluto por 30 s. A continuación fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) diluido al 20% (v/v), conteniendo 0.1% de Tween 20 por 15 min. Posteriormente y bajo condiciones asépticas, las semillas se enjuagaron nuevamente con 500 mL de agua destilada estéril y fueron colocadas para su germinación en frascos de vidrio (35 mL). Las condiciones de cultivo fueron: fotoperiodo de 12 h luz y 26 ± 1 °C en cámara de crecimiento (SEV modelo INLC 297).

Para llevar a cabo el proceso de germinación, cada tratamiento consistió de cinco repeticiones cada uno con 5 semillas. El 2 de marzo de 2009 se realizó la siembra y diariamente se registró la germinación durante 20 días, posteriormente se determinó el porcentaje final, índice y velocidad de germinación, de acuerdo con González y Orozco (1996).

Diseño experimental y análisis estadístico

El mecanismo de germinación se efectuó bajo la aplicación de un diseño factorial en bloques completamente al azar, donde el factor A esta conformado por 6 especies y el factor B por 9 combinaciones de sustratos como tratamientos.

Para poder realizar el análisis de varianza (ANOVA) bajo un modelo factorial, los resultados sobre el porcentaje de germinación fueron transformados en arcoseno de la raíz cuadrada, de acuerdo con Zar, (2010). Los efectos principales de los factores fueron determinados, así mismo que los valores promedios fueron comparados.

Las variables de respuesta evaluadas fueron: porcentaje final de germinación, velocidad de germinación (M) e índice de germinación (IG); la velocidad e índice de germinación se calcularon de acuerdo con González y Orozco (1996), mediante las siguientes ecuaciones:

$$a) IG = \sum (n_i t_i) / N \text{ y } b) M = \sum (n_i) / t$$

Donde: IG= índice de germinación, definido como la medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad germinativa; n_i = número de semillas germinadas en el día i ; t_i = número de días después de la siembra; N = total de semillas sembradas; M = velocidad de germinación, definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación; t = tiempo de germinación desde la siembra

Cuadro 1. Composición de tratamientos para el cultivo *in vitro* de seis especies de cactáceas.

Table 1. Composition of treatments for *in vitro* culture of six species of cacti.

Tratamiento	Sustrato	Humedecido con 10 mL de:
1	zeolita fina	Agua destilada
2	zeolita mediana	Agua destilada
3	zeolita gruesa	Agua destilada
4	zeolita fina	Medio MS 50%
5	zeolita mediana	Medio MS 50%
6	zeolita gruesa	Medio MS 50%
7	Agar	Medio MS 50% + 10 g sacarosa
8	Agar	Medio MS 50%
9	Agar	Agua destilada

Zeolita fina= partículas de 0.71 a 1 mm; zeolita mediana= 1.1 a 2 mm; zeolita gruesa= 2.1 a 3.36 mm de calibración.

In order to experimentally evaluate the germination process, all the treatments consisted of five replicates, each one integrated with 5 seeds. On March 2th, 2009, the sowing was made and the germination was recorded daily for 20 days, later, the final percentage, index and speed germination were determined, according to González and Orozco (1996).

Experimental design and statistical analysis

The germination process was experimentally evaluated through randomized complete block design with factorial arrangement, where the factor A consisted of 6 species and the factor B for 9 combinations of substrates and treatments.

To perform the analysis of variance (ANOVA) under a factorial model, the results related with the percentage of germination were transformed into arc-sine square root, according to Zar (2010). The main effects of the factors were determined by the statistical procedure known as means test.

The response variables evaluated were: final germination percentage, germination rate (M) and germination index (GI); the speed and germination index were calculated according to González and Orozco (1996), by the following equations:

$$a) GI = \sum (n_i t_i) / N \text{ y } b) M = \sum (n_i) / t$$

Where: GI= germination index, defined as the timing of germination in relation to germination capacity; n_i = number of seeds germinated on day i ; t_i = number of days after

hasta la germinación de la última semilla. De acuerdo con este índice, entre mayor es el valor calculado, mayor es la velocidad a la que ocurre la germinación de las semillas.

Los resultados sobre porcentaje, velocidad e índice de germinación se sometieron a un análisis de varianza (en un diseño de bloques completamente al azar) y comparación múltiple de medias por el método de Tukey (Zar, 2010), mediante el paquete estadístico SPSS, (2006), vers. 15.0. El nivel de significancia para los análisis fue de 5%.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos sobre el proceso de germinación, indican que la especie *E. dasyacantha* fue la de mayor porcentaje de germinación (92.59%) en comparación con *M. prolifera* con 22.96%. Esta última especie fue considerada de muy baja tasa de germinación. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($F=7.036$, $p<0.01$) para porcentaje, velocidad ($F=7.767$, $p<0.01$) e índice de germinación ($F=4.298$, $p<0.01$).

De acuerdo al ANOVA y comparación múltiple de medias de Tukey, las semillas del tratamiento con agar + MS, obtuvieron altos valores en porcentaje ($63.33 \pm 3.95\%$), velocidad (0.48) e índice de germinación (5.46) para las seis especies, seguido del tratamiento con zeolita granulometría media + MS, donde se obtuvo 57.78% de germinación; asimismo, los tratamientos de zeolitas + MS y los 3 tratamientos con agar conformaron un grupo estadísticamente similares ($p \leq 0.05$). Por otro lado, los 3 tratamientos de zeolitas + agua destilada establecieron un grupo estadísticamente diferente; el tratamiento con zeolita gruesa + agua destilada arrojó el porcentaje de germinación más bajo con 25.56% (Cuadro 2 y Figura 1).

sowing; N= total number of seeds sown; M= germination rate, defined as the ratio of the number of germinated seeds with germination time; t= germination time from sowing until the last seed germination. According to this index, the greater is the calculated value, the greater the speed at which occur the seed germination.

The results on percentage, germination speed and rate were subjected to analysis of variance (in a completely random block design) and multiple comparison of means by Tukey method (Zar, 2010), using the statistical package SPSS (2006), ver. 15.0. The level of significance for the analyzes was 5%.

RESULTS

The results obtained on the germination process, indicate that the species *E. dasyacantha* had the highest germination percentage (92.59%) compared to *M. prolifera* with 22.96%. The latter species was considered very low germination rate. Analysis of variance showed highly significant differences ($F=7.036$, $p<0.01$) for percentage, rate ($F=7.767$, $p<0.01$) and germination index ($F=4.298$, $p<0.01$).

According to ANOVA and multiple Tukey means comparison, seed treatment + MS agar, showed high values in percentage ($63.33 \pm 3.95\%$), speed (0.48) and germination index (5.46) for the six species, followed by the zeolite treatment with mean particle size + MS, which yielded 57.78% germination; also treatments of zeolites + MS and the 3 treatments with agar, formed a group statistically similar ($p \leq 0.05$). On the other hand, the 3 treatments of zeolites + distilled water established a statistically different group, the treatment with zeolite thick + water distilled, showed the lowest germination percentage with 25.56% (Table 2 and Figure 1).

Cuadro 2. Porcentaje, velocidad e índice de germinación para nueve tratamientos del cultivo *in vitro*.

Table 2. Percentage, speed and germination index for nine treatments from *in vitro* culture.

Tratamiento	Germinación (%)	Velocidad de germinación	Índice de germinación
1. Zeolita fina + agua	27.38 $\pm$ 6.02 cd	0.23 $\pm$ 0.06 cd	2.83 $\pm$ 0.68 bc
2. Zeolita media + agua	36.67 $\pm$ 7.45 bcd	0.3 $\pm$ 0.07 bcd	2.93 $\pm$ 0.59 abc
3. Zeolita gruesa + agua	25.56 $\pm$ 6.12 d	0.2 $\pm$ 0.06 d	2.19 $\pm$ 0.48 c
4. Zeolita fina + MS[$\frac{1}{2}$]	50 $\pm$ 4.48 abc	0.36 $\pm$ 0.07 abc	4.59 $\pm$ 0.36 abc
5. Zeolita media + MS[$\frac{1}{2}$]	57.78 $\pm$ 4.95 ab	0.41 $\pm$ 0.07 ab	5.23 $\pm$ 0.33 ab
6. Zeolita gruesa + MS[$\frac{1}{2}$]	44.44 $\pm$ 5.27 abcd	0.33 $\pm$ 0.06 bcd	3.97 $\pm$ 0.41 abc
7. Agar + MS[$\frac{1}{2}$] + sacarosa	51.11 $\pm$ 5.47 abc	0.42 $\pm$ 0.08 ab	3.98 $\pm$ 0.38 abc
8. Agar + MS[$\frac{1}{2}$]	63.33 $\pm$ 3.95 a	0.48 $\pm$ 0.07 a	5.46 $\pm$ 0.41 a
9. Agar	54.44 $\pm$ 5.56 ab	0.37 $\pm$ 0.07 abc	5.3 $\pm$ 0.47 ab

Letras diferentes en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los valores promedio.

En cuanto a la comparación múltiple de medias por especie, se formaron cuatro grupos diferentes para la variable porcentaje, el primero conformado sólo por *E. dasyacantha*; la cual obtuvo la mejor respuesta germinativa (92.59%) y velocidad de germinación (1.09); el segundo lo integraron *A. myriostigma* con 54.07% y 0.34 para las respectivas variables, y *A. capricorne* (47.41 y 0.24 respectivos porcentaje y velocidad de germinación); sin embargo, el índice de germinación mostró valores estadísticamente iguales para 5 especies (*A. capricorne*, *A. myriostigma*, *S. scheeri*, *E. dasyacantha* y *E. reichenbachii*) (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Los resultados evidencian la conveniencia del uso de zeolita natural en sustitución del agar, lo anterior debido que se obtuvieron resultados estadísticamente similares en la

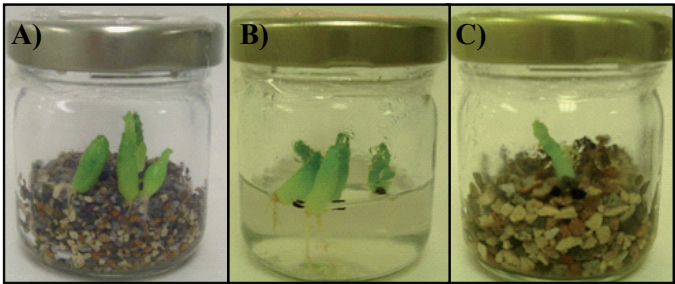


Figura 1. Germinación *in vitro* de *Sclerocactus scheeri* bajo diferentes tratamientos. A) zeolita media + MS; B) Agar + MS; y C) zeolita gruesa + agua destilada.
Figure 1. *In vitro* Germination under different treatments: A) Medium Zeolite + MS, B) Agar + MS; and C) thick Zeolite + distilled water.

In relation with the multiple means comparison by species, It was formed four different groups for the percentage variable, the first conformed only by *E. dasyacantha*, which reached the best germination answer (92.59%) and germination

Cuadro 3. Comparación del porcentaje, velocidad e índice de germinación en cactáceas cultivada *in vitro*.
Table 3. Comparison of percentage, speed and germination index in cacti *in vitro* cultivated.

Especie	Germinación (%)	Velocidad de germinación	Índice de germinación
<i>A. capricorne</i>	47.41 ±3.71 bc	0.24 ±0.02 bc	5.16 ±0.38 a
<i>A. myriostigma</i>	54.07 ±3.12 b	0.34 ±0.02 b	5.27 ±0.43 a
<i>S. scheeri</i>	27.41 ±3.62 d	0.12 ±0.02 cd	3.26 ±0.43 ab
<i>E. dasyacantha</i>	92.59 ±2.8 a	1.09 ±0.03 a	4.45 ±0.18 ab
<i>E. reichenbachii</i>	31.85 ±3.99 cd	0.17 ±0.02 cd	3.36 ±0.44 ab
<i>M. prolifera</i>	22.96 ±3.57 d	0.1 ±0.02 d	2.85 ±0.42 b

Letras diferentes en columna indican diferencias significativas ($p\leq 0.05$) entre los valores promedio.

germinación de las seis especies de cactáceas con 63.33% y 57.78% con agar y zeolita, respectivamente; al respecto Martínez *et al.* (2006), mencionan la existencia de alternativas viables para la sustitución del agar en el cultivo *in vitro*, mediante el uso de sustratos inertes como agrolita, vermiculita, y tezontle en la obtención de patrones de cítricos, los autores mencionan además, que la incorporación de dichos sustratos incrementa la sobrevivencia 50% y en algunos casos hasta 100% al pasar las plantas a macetas, ya que sus raíces no se dañan. Resultados similares fueron reportados por Izquierdo *et al.* (2002), quienes evaluaron diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de ajo; resultando la utilización de la zeolita mezclada con materia orgánica un sustrato óptimo que favoreció la supervivencia de las plantas, al parecer, ligado con las propiedades químicas y físicas de este mineral.

rate (1.09), the second was composed by *A. myriostigma* with 54.07% and 0.34 for the respective variables, and *A. capricorne* (with 47.41 and 0.24 percentage and germination rate respectively), but the germination index showed values statistically equal to 5 species (*A. capricorne*, *A. myriostigma*, *S. scheeri*, *E. dasyacantha* and *E. reichenbachii*) (Table 3).

DISCUSSION

The results show the suitability of natural zeolite as agar substitute, because the above results were obtained statistically similar in the germination of six species of cacti with 63.33% and 57.78% with agar and zeolite, respectively, Martínez *et*

Las especies *M. prolifera* y *E. reichenbachii* mostraron los valores más bajos para las variables evaluadas; al respecto, factores internos de las semillas, como su viabilidad (Enríquez *et al.*, 2004) o tamaño (Sánchez *et al.*, 2006), pueden influir en su respuesta germinativa (Venable y Pake, 1999); aún y cuando la semilla obtenida para la realización del presente experimento fue colectada poco antes de la siembra, para algunas semillas de cactáceas la viabilidad es limitada en semillas frescas o recién colectadas y aumenta a los dos o tres años, así lo mencionaron Trejo y Garza (1993), quienes reportaron que las semillas de *Mammillaria heyderi* de cero años de edad tiene un porcentaje de germinación menor, a diferencia de las de dos y tres años, por lo que es posible que las semillas de *E. reichenbachii* y *M. prolifera*, tuvieran embriones inmaduros durante la prueba, ya que se colectaron 3 meses antes.

El tamaño de partícula del sustrato o granulometría con los mejores resultados fue la de textura media (1-2 mm), lo que coincide con lo reportado por Ansorena (1994), quien menciona que el tamaño óptimo de partículas para sustratos hortícolas está entre 0.25 y 2.5 mm y con Gislerød (1997), quien menciona que el desarrollo de las raíces primarias y secundarias se ve favorecido al mejorar el suministro de oxígeno con sustratos de partículas de tamaño uniforme, tal como se observó en la presente investigación, en relación con mezclas de partículas de diferentes tamaños.

La zeolita en textura gruesa (2.01-3.36 mm) fue el tratamiento con el menor porcentaje de germinación. Al respecto, Santos *et al.* (2004), mencionan que la textura fina es importante para permitir buen contacto entre las semillas (especialmente si son pequeñas) y la humedad de la mezcla, fomentando la germinación. No obstante, la zeolita en textura fina (0.71-1 mm) retuvo en exceso el agua aplicada, por lo que se observó un decremento en la germinación de las semillas de cactáceas debido a la saturación del sustrato, puesto que se necesita una mezcla o sustrato que sea permeable, que absorba el agua pero que no retenga los excesos como su característica más importante (Santos *et al.*, 2004).

Estos estudios han sido considerados por algunos autores como importantes contribuciones en la conservación de especies vegetales en peligro de extinción, así lo refieren Molina *et al.* (2005), al realizar la conservación *in vitro* de cinco especies de cactáceas de Guatemala en peligro

al. (2006), informaron la existencia de viables alternativas para reemplazar el agar en la *in vitro* cultura, usando sustratos inertes como perlita, vermiculita y roca volcánica en la obtención de patrones de cítricos, los autores refieren también que la incorporación de estos sustratos incrementa la supervivencia 50% y en algunos casos hasta 100%, desde plantas en maceta porque sus raíces no se dañan. Resultados similares fueron reportados por Izquierdo *et al.* (2002), quien evaluó diferentes sustratos en la aclimatación de vitro-plántulas y micro bulbos de ajo, resultando en el uso de una mezcla de zeolita y materia orgánica como un sustrato óptimo que favoreció la supervivencia de las plantas, aparentemente debido a las propiedades químicas y físicas de este mineral.

M. prolifera y *E. reichenbachii* mostraron los valores más bajos para las variables evaluadas y en este respecto, factores internos de las semillas, como su viabilidad (Enríquez *et al.*, 2004) o tamaño (Sánchez *et al.*, 2006), pueden influir en su respuesta germinativa (Venable y Pake, 1999), incluso si la semilla obtenida para realizar este experimento fue colectada justo antes de sembrar. Para algunas semillas de cactus la viabilidad es limitada cuando son extraídas de frutos frescos, incrementando su capacidad germinativa después de dos o tres años, como indicó Trejo y Garza (1993), quien reportó que las semillas de *Mammillaria heyderi* de cero años de edad tienen un porcentaje de germinación menor, en contraste con las de la misma especie de dos y tres años de edad en las que el índice de germinación fue mayor, por lo que es posible que las semillas de *E. reichenbachii* y *M. prolifera*, involucradas en este trabajo, tuvieran embriones inmaduros, debido a que fueron colectadas 3 meses antes.

El tamaño de partícula del sustrato o granulometría con los mejores resultados fue la de textura media (1-2 mm), lo que coincide con lo reportado por Ansorena (1994), quien menciona que el tamaño óptimo de partículas para sustratos hortícolas está entre 0.25 y 2.5 mm y con Gislerød (1997), quien menciona que el desarrollo de las raíces primarias y secundarias se ve favorecido al mejorar el suministro de oxígeno con sustratos de partículas de tamaño uniforme, tal como se observó en la presente investigación, en relación con mezclas de partículas de diferentes tamaños.

La zeolita en textura gruesa (2.01-3.36 mm) fue el tratamiento con el menor porcentaje de germinación. Al respecto, Santos *et al.* (2004), mencionan que la textura fina es importante para permitir buen contacto entre las semillas (especialmente si son pequeñas) y la humedad de la mezcla, fomentando la germinación. No obstante, la zeolita en textura fina (0.71-1 mm) retuvo en exceso el agua aplicada, por lo que se observó un decremento en la germinación de las semillas de cactáceas debido a la saturación del sustrato, puesto que se necesita una mezcla o sustrato que sea permeable, que absorba el agua pero que no retenga los excesos como su característica más importante (Santos *et al.*, 2004).

de extinción. Además, se genera información valiosa para aquellas personas que quieran dedicarse a su cultivo y exportación, evitando con ello la extinción de las especies.

CONCLUSIONES

Los tratamientos conformados por Agar + medio Murashige Skoog (MS) y zeolita en granulometría media + medio MS, fueron los que obtuvieron mejores resultados en cuanto a porcentaje, velocidad e índice de germinación para las seis especies de cactáceas; asimismo, de las granulometrías evaluadas, la zeolita con granulometría media (de 1 a 2 mm) proporcionó los mejores resultados para la germinación de las cactáceas.

Con estos resultados se muestra la conveniencia de usar zeolitas naturales como alternativa de sustrato en la germinación de cactáceas, al lograr resultados estadísticamente similares en ambos medios de cultivo, ya sea zeolita o agar (medio convencional de cultivo *in vitro*), destacando además, que se trata de un recurso natural de bajo costo, poco aprovechado a la fecha, abundante y relativamente fácil de extraer y con las características ideales de un sustrato, para el óptimo establecimiento y desarrollo de las plántulas. Además se facilita la implementación de acciones de conservación *in vitro* de cactáceas y de otras especies vulnerables o en peligro de extinción, aprovechando lo redituable de las zeolitas debido a su abundancia y fácil obtención.

Finalmente, los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de sustratos alternativos al agar, para el cultivo *in vitro* es una buena opción para la germinación de especies de cactáceas, por lo que se sugiere realizar futuros estudios del uso de zeolita en otras especies de importancia ornamental, ecológica e industrial. Así mismo, es necesario desarrollar estudios puntuales acerca de las propiedades físicas y químicas de las zeolitas naturales, con la finalidad de comprender los efectos sobre la germinación y desarrollo de dichas especies.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto 51739 y al proyecto de PAICYT Proyecto CN-427-10, por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

a mixture or substrate enough permeable to absorb water, but that does not retain the excess as its most important characteristic (Santos *et al.*, 2004).

According to Molina *et al* (2005), studies like this, have been considered by several researchers as important contributions to the conservation of plant species in danger of extinction. Performing *in vitro* conservation of five species of cacti from Guatemala in danger of extinction, they provided valuable information for those who want to engage in its cultivation and export, thereby preventing the extinction of plant species.

CONCLUSIONS

The treatments comprised of Agar + Murashige Skoog (MS) and zeolite with mean particle size + MS medium, were the best performing in terms of percentage, speed and germination index for the six species of cacti, also among those evaluated grain size, the zeolite with medium particle size (1 to 2 mm) provided the best results for germination of cacti.

These results show the convenience of using natural zeolite as an alternative substrate in the germination of cacti, achieving results statistically similar in both culture media, either agar or zeolite (as components of conventional mixtures for *in vitro* culture), noting also that the last one is a natural resource of low cost, little used to date, abundant, relatively easy to extract and with ideal characteristics as substrate for optimal establishment and development of seedlings. It also facilitates the implementation of conservation actions *in vitro* of cacti and other vulnerable or endangered species, taking advantage of zeolite profitability because of its abundance and readily available.

Finally, the results of the present work show that the incorporation of alternative substrates as agar substitutes for *in vitro* cultivation is a good choice for germination of some species of cacti, so future studies about the use of zeolite involving other species with ornamental, ecological and industrial importance are suggested. It is also necessary to develop specific studies about the physical and chemical properties of natural zeolites, in order to understand the effects on germination and development of such species.

End of the English version



LITERATURA CITADA

- Allen, E. R. and Ming, D. W. 1995. Recent progress in the use of natural zeolites in agronomy and horticulture. In: Ming, D. W. and Mumpton, F. A. (ed.), Natural zeolites '93: occurrence, properties, use. International Committee on Natural Zeolites, Brockport, New York. 477-490 pp.
- Andrade, R. M.; Ayala, H. J. J.; Alia, T. I.; Rodríguez, M. H.; Acosta, D. C. M. y López, M. V. 2008. Efecto de promotores de la germinación y sustratos en el desarrollo de plántulas de papayo. *Rev. Fac. Agron.* (25):617-635.
- Ansorena, M. J. 1994. Sustratos: propiedades y caracterización. Mundi Prensa. Madrid, España. 172 p.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. In: Gío, A. R. y López, O. E. (eds.) *Diversidad Biológica en México*. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Vol. Esp. (XLIV):109-115.
- Bunt, A. C. 1988. Media and mixes for container-grown plants. In: a manual on the preparation and use of growing media for pot plants. Hyman, U. (ed.). London. 309 p.
- Carmona, M. P.; Foroughbakhch, P. R.; Flores, V. A.; Alvarado, V. M. A. y Guzmán, L. M. A. 2008. Flora cactológica y especies asociadas en el área natural protegida Sierra corral de los bandidos, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. (79):307-323.
- Enríquez, P. E.; Suzán, A. H. y Malda, B. G. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. *Agrociencia*. 38:375-381.
- Gislerød, H. R. 1997. Effect of aeration on rooting and growth of roses. *Acta Hort.* (450):113-122.
- González, Z. L. y Orozco, S. A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*, *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (58):15-30.
- Guzmán, U.; Arias, S. y Dávila, P. 2007. Catálogo de cactáceas mexicanas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 1ª reimpresión. D. F., México. 315 p.
- Hunt, D. 1999. CITES Cactaceae checklist. 2nd edition. Kew: Royal Botanic Gardens. Kew. 315p.
- Izquierdo, H.; Quiñones, Y.; Disotuar, R. y Pedroso, D. 2002. Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). *Cultivos Tropicales*. 23(3):63-69.
- Manzo, R. S. 2010. Propagación in vitro de *Mammillaria Coahuilensis* var. *coahuilensis* Boedeker (Moran) y *Echinocereus plathyacanthus* Link y Otto, a partir de semilla para su conservación. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 62 pp.
- Martínez, H. M. J.; Alonso, L. A.; Osorio, A. F.; Gallardo, L. F.; López, M. H. y Mata, R. M. 2006. Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. *Interciencia*. 31(8):616-619.
- Molina, M. L. G.; Sagastume, M. H. A. y Suchini, F. A. E. 2005. Conservación *in vitro* de cinco especies de cactáceas en peligro de extinción de Guatemala, distribuidas en los Departamentos de el Progreso y Zacapa. ICTA. 60 pp.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. (15):473-479.
- Norma Oficial Mexicana. (NOM-059-SEMARNAT-2001). 2003. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. D. F., México.
- Reyes, S. J.; Gutiérrez, de la R. A. y Sevilla, B. J. 2001. Producción de cactáceas y suculentas mexicanas. Cuadernos de comunicación sindical. Núm. 63. 23 pp.
- Sánchez, S. J.; Flores, J. y Martínez, G. E. 2006. Efecto del tamaño de semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. *Interciencia*. 31(5):371-375.
- Santos, A. H.; Velasco, C. M. y Alanís, F. G. 2004. Propagación de cactáceas y suculentas. In: Foroughbakhch, R.; Torres, C. T. y Alvarado, V. M. 2004. Tópicos selectos de Botánica, 1ª Jornada de Actividades Botánicas Dra. María Ana Garza Barrientos. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 119-160 pp.
- SPSS Inc. 2006. SPSS for Windows, version 15.0 Inc., Chicago, USA.
- Thorpe, T. A. 1981. Plant tissue culture: methods and applications in agriculture. Academic Press. New York, USA. 379 p.

- Trejo, L. y Garza, M. 1993. Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de *Mammillaria heyderi* Muchl. en 4 sustratos. BIOTAM. 5(3):19-24.
- Urbina, S. E.; Baca, C. G.; Núñez, E. R.; Colinas, L. M.; Tijerina, C. L. y Tirado, T. J. 2006. Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} y diferente granulometría. Agrociencia. (40):419-429.
- Velázco, M. C. G. 2009. Flora del estado de Nuevo León, México: diversidad y análisis espacio-temporal. UANL. 299 pp.
- Venable, D. L. y Pake, C. E. 1999. Population ecology of desert plants. In: ecology of desert plants. Robichaux R. H. (ed.). The University of Arizona Press. USA. 115-142 pp.
- Zar, J. H. 2010. Biostatistical analysis. 5^{ta} ediction. Pearson Prentice-Hall. Upper Saddle River, N. J. 944 pp.