

Influencia del Ca²⁺, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Echinocactus parryi* (Engelm)

Influence of Ca²⁺, pH, agar and plant growth regulators in the *in vitro* propagation of *Echinocactus parryi* (Engelm)

Dolores Adilene García-González¹ , María del Socorro Santos-Díaz² ,
Juan Pedro Flores-Margez¹  y Pedro Osuna-Ávila^{1,‡} 

¹ Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Av. Henry Dunant 4016. 32310 Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

[‡]Autor para correspondencia (posuna@uacj.mx)

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Manuel Nava 6. 78210 San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

RESUMEN

Echinocactus parryi, es una especie amenazada y endémica del municipio de Juárez, Chihuahua, México que presenta importantes limitantes para su propagación. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento, concentración de calcio (Ca²⁺), pH del medio y concentración de gelificante en la respuesta morfogénica de *E. parryi*. Las semillas se germinaron en medio de Murashige y Skoog (MS) al 25% de la concentración de sus sales (¼ MS). Los epicotilos se cultivaron en posición invertida en medios con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) (0-10 mg L⁻¹), ácido indol-3-acético (AIA) (0-0.5 mg L⁻¹), pH 5.7 y 8, Ca²⁺ (13.2 μM y 26.4 μM) y agar (7 y 10 g L⁻¹). La mayor formación de brotes (2.9 brotes por explante) se obtuvo en medio MS con 2 mg L⁻¹ de BAP combinado con AIA 0.5 mg L⁻¹, 13.2 μM de Ca²⁺, pH 8 y 7 g L⁻¹ de agar a los 120 días. Los brotes generados se transfirieron a medio MS con ácido 2,3,5 tri-iodobenzoico (TIBA) (0, 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹) para inducir la formación de raíz. El mayor enraizamiento (70.5%) se obtuvo en medio con 0.5 mg L⁻¹ de TIBA. La sobrevivencia de las plantas fue del 58% a los 5 meses. Este es el primer reporte que describe la regeneración *in vitro* de *E. parryi* y constituye un avance importante para su propagación y conservación.

Palabras clave: *cactácea*, brotes, BAP, AIA, TIBA.

SUMMARY

Echinocactus parryi is a threatened and endemic species of the municipality of Juárez, Chihuahua, Mexico that presents important limitations for its propagation. The objective of this study was to evaluate the effect of growth regulators, calcium concentration (Ca²⁺), environmental pH and gelling concentration in the morphogenetic response of *E. parryi*. The seeds were germinated in Murashige and Skoog (MS) medium at 25% of the concentration of their salts (¼ MS). Epicotyls were cultured in an inverted position in media with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) (0-10 mg L⁻¹), indole-3-acetic acid (AIA) (0-0.5 mg L⁻¹), pH 5.7 and 8, Ca²⁺ (13.2 μM and 26.4 μM) and agar (7 and 10 g L⁻¹). The highest sprout formation (2.9 sprouts per explant) was obtained in MS medium with 2 mg L⁻¹ of BAP combined with 0.5 mg L⁻¹ of AIA, 13.2 μM of Ca²⁺, pH 8, and 7 g L⁻¹ of agar, at 120 days of culture. The sprouts were transferred to MS medium with 2,3,5 tri-iodobenzoic acid (TIBA) (0, 0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) to induce root formation. The highest rooting (70.5%) was obtained in medium with 0.5 mg L⁻¹ of TIBA. The survival of the plants was 58% at 5 months. This is the first report that describes the *in vitro* regeneration of *E. parryi* and constitutes an important advance for its propagation and conservation.

Index words: *cacti*, sprouts, BAP, IAA, TIBA.

Cita recomendada:

García-González, D. A., M. del S. Santos-Díaz, J. P. Flores-Margez y P. Osuna-Ávila. 2020. Influencia del Ca²⁺, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Echinocactus parryi* (Engelm). Terra Latinoamericana 38: 489-498.
DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.734>

Recibido: 05 de febrero de 2020.

Acceptado: 21 de mayo de 2020.

Publicado en Terra Latinoamericana 38: 489-498.

INTRODUCCIÓN

Echinocactus parryi es una cactácea endémica del municipio de Juárez, Chihuahua, México. Su hábitat ha sido seriamente afectado por el crecimiento urbano, las actividades agrícolas-ganaderas, mineras y la colecta ilegal. Ello ha ocasionado una importante reducción de las poblaciones naturales, por lo que actualmente se considera como especie amenazada (SEMARNAT, 2010). La propagación tradicional de *E. parryi* presenta restricciones debido a que las semillas tienen barreras físicas y químicas que reducen el porcentaje de germinación. Es bien documentado que el desarrollo de las cactáceas es muy lento, por lo que, el establecimiento de las poblaciones en su ecosistema natural o por métodos de propagación tradicional no son viables (Osuna *et al.*, 2009). Es urgente la búsqueda de alternativas de propagación de la planta madre para su rescate y conservación.

Una técnica con gran potencial para la preservación y multiplicación de especies amenazadas es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Indacochea *et al.*, 2018). Esta metodología permite obtener un alto número de clones en corto tiempo (Ramírez y Salazar, 2016) y en condiciones de luz y temperatura controladas (Emek, 2018). Algunos componentes del medio de cultivo se han modificado obteniendo diferentes resultados. Se ha reportado que el usar el calcio en el medio de cultivo en concentraciones elevadas tiene un efecto en evitar la formación de callo (White y Broadley, 2003) o bien disminuir su inducción cuando se aplica al doble de su concentración de Ca^{2+} (Mirabbasi y Hosseinpour, 2014). Sin embargo, si es utilizado en exceso puede reducir el potencial del explante para la formación de nuevos brotes, ya que endurece las paredes celulares disminuyendo su flexibilidad (Wyn-Jones y Lunt, 1967). Modificar el pH en el medio de cultivo favorece la formación de brotes (Yaacob *et al.*, 2014) y manipular altas concentraciones de agar afecta el potencial hídrico del medio para minimizar la formación de callo (Scholten y Pierik, 1998).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento, Ca^{2+} , pH del medio de cultivo y concentración de agar en la micropropagación de *E. parryi*. Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte que describe el cultivo *in vitro* de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Asepsia y Germinación de Semillas

E. parryi, crece en un suelo regosol (IUSS-WRB, 2015) con pH de 8, conductividad eléctrica de 0.45 dS m^{-1} a una profundidad de 0 a 15 cm (Figura 1). Las semillas se colectaron al Sur del municipio de Juárez en el mes de Julio de 2017. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de biotecnología vegetal ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas, en Ciudad Juárez, Chihuahua. Las semillas fueron colocadas en bolsas de papel y almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso. Se esterilizaron 1200 semillas utilizando cloro comercial al 50% en agitación constante por 30 min. Posteriormente se mantuvieron en agua destilada estéril durante 24 h. Se removió el 50% de la testa usando pinzas y bisturí en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Como grupo control, se utilizaron semillas sin escarificar, esterilizadas bajo las mismas condiciones. La germinación se evaluó cada 48 h durante 15 días.

Las semillas escarificadas, se colocaron en medio comercial de Murashige y Skoog (1962) (Caisson Laboratories®) con vitaminas y minerales al 25%,



Figura 1. *Echinocactus parryi* creciendo en su ecosistema natural y es considerada una especie endémica y amenazada en el municipio de Juárez, Chihuahua, México. Foto tomada por Pedro Osuna-Ávila.

Figure 1. *Echinocactus parryi* growing in its natural ecosystem and is considered an endemic and threatened species in municipality of Juárez, Chihuahua, Mexico. Photo taken by Pedro Osuna-Ávila.

adicionado con 7 g L⁻¹ de agar y 30 g L⁻¹ de azúcar morena; el pH se ajustó a 5.7±0.1 con KOH 1N. Las semillas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 25±2 °C. Se consideró como germinación positiva cuando fue visible la emergencia de la radícula.

Inducción de Brotes

Para la inducción de nuevos brotes, se utilizaron plántulas de 40 días de cultivo *in vitro* con una altura de 8 a 12 mm a las cuales se les removió la raíz. Se usó el medio MS completo, conteniendo 30 g L⁻¹ de sacarosa (Caisson Laboratories®).

Efecto del Ca²⁺, agar y pH en la inducción de brotes.

Se utilizaron valores normales y modificados de Ca²⁺, pH y agar del medio de cultivo MS. En el Cuadro 1 se muestran las combinaciones usadas y las claves para cada una de las condiciones del medio de cultivo. La clave presenta los valores del medio de cultivo control (sin modificaciones).

Interacción entre el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de *E. parryi*. Se evaluó el efecto de diferentes dosis de 6-bencilaminopurina BAP (0, 2, 4, 6, 8, y 10 mg L⁻¹) sola o combinada con ácido indol-3-acético (AIA) (0 y 0.5 mg L⁻¹) (Caisson Laboratories®) Ca²⁺, agar y pH en las condiciones descritas anteriormente. El Cuadro 2 muestra las combinaciones probadas.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave

(Terlab®) a 121 °C durante 30 min y se vaciaron en frascos Gerber® de 100 mL conteniendo 25 mL del medio. Se colocaron cuatro explantes por frasco en posición invertida (la parte apical en contacto con el medio). Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad). La formación de brotes nuevos se evaluó a los 120 días de cultivo y la presencia de callo se registró en porcentaje.

Rizogénesis y Aclimatación a Condiciones de Invernadero

Para inducir la formación de raíz, los brotes obtenidos se colocaron en medio MS adicionado con 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹ de ácido 2,3,5 tri-iodobenzoico (TIBA). La formación de raíz se evaluó a los 30 días de cultivo.

Los brotes enraizados de aproximadamente 3 cm se extrajeron de los frascos Gerber y se lavaron con agua corriente para eliminar el medio de cultivo de sus raíces. Posteriormente, se transfirieron a vasos de unicel (354.9 mL) que contenían una mezcla de suelo del hábitat de *E. parryi* (arena) y de sustrato comercial de maceta (Premier®) en proporción 2:1. Las plantas se cubrieron con vaso de plástico (295.7 mL) transparente durante una semana para facilitar su aclimatación y se colocaron en invernadero. Transcurrida la semana, se retiró el domo y se continuó regando; después de cinco meses se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas.

Cuadro 1. Formación de brotes y porcentaje de callo obtenidos en los explantes de *E. parryi* durante la interacción entre Ca²⁺, agar y pH del medio de cultivo a los 120 días.

Table 1. Sprouts formation and callus percentage in explants of *E. parryi* during the interaction among Ca²⁺, agar and pH in the culture medium at 120 days.

Clave	Tratamiento	n	No. Brotes	% Callo
	Medio de cultivo			
1	Ca ²⁺ 13.2 µM, pH 5.7 y agar 7 g L ⁻¹	96	0.76± 1.16 a [†]	24ab
2	Ca ²⁺ 26.4 µM, pH 5.7 y agar 7 g L ⁻¹	96	0.54± 1.15 ab	41a
3	Ca ²⁺ 13.2 µM, pH 5.7 y agar 10 g L ⁻¹	96	0.24± 0.94 b	24ab
4	Ca ²⁺ 26.4 µM, pH 5.7 y agar 10 g L ⁻¹	96	0.22 ± 0.73 b	23ab
5	Ca ²⁺ 13.2 µM, pH 8.0 y agar 7 g L ⁻¹	96	0.14 ± 0.75 b	37a
6	Ca ²⁺ 26.4 µM, pH 8.0 y agar 7 g L ⁻¹	96	0.09 ± 0.76 b	12b
7	Ca ²⁺ 13.2 µM, pH 8.0 y agar 10 g L ⁻¹	96	0.05 ± 0.55 c	6b
8	Ca ²⁺ 26.4 µM, pH 8.0 y agar 10 g L ⁻¹	96	0.04 ± 0.53 c	33a

[†] Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey * ($P < 0.05$).

[†] Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey test * ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Triple interacción entre el medio de cultivo, concentración de BAP y AIA para la inducción de brotes y formación de callo en *E. parryi* a los 120 días de cultivo *in vitro*.

Table 2. Triple interaction among culture medium, BAP and IAA concentrations for sprout induction and callus formation in *E. parryi* at 120 days of *in vitro* culture.

Tratamientos					Tratamientos				
Medio de cultivo	BAP	AIA	No. Brotes	% Callo	Medio de cultivo	BAP	AIA	No. Brotes	% Callo
1	0	0	0cc [†]	0g	5	0	0	0c	1df
1	0	0.5	0.13±0.12b	0g	5	0	0.5	0c	12.5f
1	2	0	1.5±0.42ab	25ef	5	2	0	0c	0g
1	2	0.5	1.63±0.96ab	0g	5	2	0.5	2.9±2.3a [†]	12.5f
1	4	0	0c	0g	5	4	0	0c	0g
1	4	0.5	0.63±0.32b	25ef	5	4	0.5	0c	0g
1	6	0	0c	0g	5	6	0	0c	37.5def
1	6	0.5	0c	37def	5	6	0.5	0c	62.5cd
1	8	0	1.75±0.41ab	87.5ab	5	8	0	0c	0.75bc
1	8	0.5	0c	0g	5	8	0.5	0c	37.5def
1	10	0	1.63±0.56b	75bc	5	10	0	0c	100a [†]
1	10	0.5	0.63±0.42b	25ef	5	10	0.5	0c	37.5def
2	0	0	0c	0g	6	0	0	0c	0g
2	0	0.5	0c	37.5def	6	0	0.5	0c	50de
2	2	0	0.63±0.26b	25ef	6	2	0	0c	12.5f
2	2	0.5	0	50de	6	2	0.5	0c	25ef
2	4	0	0.5±0.37b	25ef	6	4	0	0c	0g
2	4	0.5	0c	50de	6	4	0.5	0.5±0.49b	12.5f
2	6	0	0c	50de	6	6	0	0.13±0.12b	37.5def
2	6	0.5	0c	25ef	6	6	0.5	0c	12.5
2	8	0	0.63±0.49b	75bc	6	8	0	0c	0g
2	8	0.5	0.25±0.24	25ef	6	8	0.5	0.13±0.12b	0g
2	10	0	0.38±0.5b	37.5def	6	10	0	0c	0g
2	10	0.5	0.75±0.49ab	75bc	6	10	0.5	0c	0g
3	0	0	0c	0g	7	0	0	0c	0g
3	0	0.5	0c	62cd	7	0	0.5	0c	12.5f
3	2	0	0.38±0.37b	50de	7	2	0	0c	12.5f
3	2	0.5	0c	0g	7	2	0.5	0c	0g
3	4	0	0c	12.5f	7	4	0	0c	0g
3	4	0.5	0c	0g	7	4	0.5	0.25±0.24b	25ef
3	6	0	1.0±0.56ab	50de	7	6	0	0c	12.5f
3	6	0.5	0c	25ef	7	6	0.5	0c	12.5f
3	8	0	0c	25ef	7	8	0	0c	0g
3	8	0.5	0c	12.5f	7	8	0.5	0c	0g
3	10	0	0.5±0.49b	37.5def	7	10	0	0.25±0.24b	12.5f
3	10	0.5	0c	12.5f	7	10	0.5	0c	0g
4	0	0	0c	50de	8	0	0	0c	37.5def
4	0	0.5	0.88±0.44ab	50de	8	0	0.5	0c	0g
4	2	0	0.13±0.12b	50de	8	2	0	0c	37.5def

Cuadro 2. Triple interacción entre el medio de cultivo, concentración de BAP y AIA para la inducción de brotes y formación de callo en *E. parryi* a los 120 días de cultivo *in vitro*. (Continuación).**Table 2. Triple interaction among culture medium, BAP and IAA concentrations for sprout induction and callus formation in *E. parryi* at 120 days of *in vitro* culture.** (Continuation).

Tratamientos					Tratamientos				
Medio de cultivo	BAP	AIA	No. Brotes	% Callo	Medio de cultivo	BAP	AIA	No. Brotes	% Callo
4	2	0.5	0.38±0.37b [†]	0g	8	2	0.5	0c [†]	62.5cd
4	4	0	0c	50de	8	4	0	0c	0g
4	4	0.5	0c	0g	8	4	0.5	0.5±0.49b	25ef
4	6	0	0c	50de	8	6	0	0c	62.5cd
4	6	0.5	0c	0g	8	6	0.5	0c	25ef
4	8	0	0c	0	8	8	0	0c	0g
4	8	0.5	0.13±0.12b	0	8	8	0.5	0c	25ef
4	10	0	0.13±0.12b	0g	8	10	0	0c	62.5cd
4	10	0.5	0c	25ef	8	10	0.5	0c	62.5cd

[†] Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

[†] Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey test ($P < 0.05$).

Análisis Estadístico

Para evaluar la regeneración de brotes nuevos, se realizó un análisis de varianza con arreglo factorial completamente al azar. Factor A: medio de cultivo con tres niveles pH, concentración de Ca^{2+} y agar, factor B: BAP con 5 niveles 0, 2, 4, 6, 8, y 10 mg L^{-1} y el factor C: AIA con dos niveles: 0 y 0.5 mg L^{-1} . Se probaron 96 tratamientos con ocho repeticiones para cada uno, originado un total de 768 explantes. Las comparaciones de medias de tratamientos se realizaron a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia $P \leq 0.05$ y el programa estadístico SPSS versión 25.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de Semillas

El protocolo de asepsia empleado fue eficiente obteniéndose 90% de semillas asépticas. La germinación de las semillas escarificadas inició al segundo día y a los 15 días alcanzo un máximo de 65% de germinación (Figura 2). Las semillas sin escarificar presentaron indicios de germinación hasta el día 30 (datos no mostrados). Estos resultados indican que el proceso de germinación en *E. parryi* se aceleró 15 veces al remover el 50% de la testa de la semilla, muy probablemente debido a la rápida entrada de agua y

oxígeno al embrión. En la propagación de cactáceas los porcentajes de germinación pueden ser muy variables dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la germinación de *Pelecypora acelliformis* fue del 50% (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), en *Hylocereus monacanthus* del 60% (Montiel-Frausto *et al.*, 2016), en *Mammillaria hernandezii* del 97%, (Lázaro-Castellanos *et al.*, 2018) y en *Mammillaria rhodantha* del 99% (Ramírez-González *et al.*, 2019).

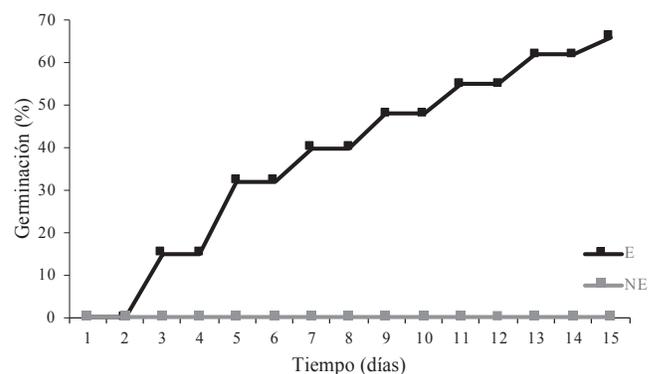


Figura 2. Porcentaje de germinación por día de semillas escarificadas (E) y no escarificadas (NE) a los 15 días de cultivo *in vitro*.

Figure 2. Germination percentage per day of scarified (E) and non-scarified (NE) seeds at 15 days of *in vitro* culture.

Inducción de Brotes

Efecto del Ca^{2+} , agar y pH en la inducción de brotes.

En este trabajo se observó que el cambio en las concentraciones de Ca^{2+} , agar, y pH no incrementaron de forma significativa la formación de brotes, pero si influyeron en la formación de callo. En el medio 2, se presentó el mayor porcentaje de callo con 41%, mientras que el medio 7, presentó el porcentaje más bajo con 6%. Estos resultados indican que el aumentar la concentración de Ca^{2+} del medio de cultivo, no disminuye la formación de callo. Sin embargo, al aumentar el pH y la concentración de agar, la formación de callo disminuye considerablemente (Cuadro 1). El callo se considera indeseable ya que deforma el tejido diferenciado evitando la proliferación de brotes y aumenta la probabilidad de que se genere variación genética (Clayton *et al.*, 1990; Chamorro *et al.*, 2007). El Ca^{2+} se ha reportado con múltiples usos y funciones, como ser un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Teardo *et al.*, 2017). El uso de altas concentraciones de Ca^{2+} en el medio de cultivo, permite que la pared celular se vuelva más rígida evitando que se rompa y se forme callo (Wyn-Jones y Lunt, 1967; Hazarika, 2006). El doble de la concentración de Ca^{2+} en medios de cultivo, se ha usado para mejorar la calidad y número de brotes en olmo (Mirabbasi y Hosseinpour, 2014) y en las cactáceas *Astrophytum myrostigma* y *Ferocactus glauscecens* (Santos-Díaz *et al.*, 2001; Santos-Díaz, 2005). Estas bondades reportadas del calcio no coinciden en fortalecer la pared celular y evitar la formación de callos en *E. parryi*. En contraste, concentraciones altas de agar influyó en minimizar la presencia de callo en *E. parryi*, tal como lo afirmaron Scholten y Pierik, (1998); López-Escamilla *et al.* (2016). Ellos indicaron que las altas dosis de agar, disminuyó el potencial hídrico del medio y redujo la disponibilidad de agua hacia los explantes evitando la hiperhidratación que pudiera deformar el tejido e inducir la formación de callo.

Interacción entre el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de *E. parryi*. Las auxinas y citocininas controlan el crecimiento, y afectan sinérgicamente la división celular y la regeneración *in vitro* (Arab *et al.*, 2014; Faisal *et al.*, 2018). Al evaluar la interacción del medio de cultivo con BAP y AIA, se observó en el medio de cultivo 5, adicionado con 2 mg L⁻¹ BAP y

0.5 mg L⁻¹ AIA, la mayor formación de brotes con un promedio de 2.9 por explante y un bajo porcentaje de callo (12.5%). Las altas concentraciones de BAP con o sin AIA no favorecieron la brotación (Cuadro 2).

Los resultados indican que se logró triplicar el número de brotes de buena calidad en comparación con la propagación tradicional. En la Figura 3, se muestra el aspecto de brotes bien definidos en comparación con aquellos que generan callo. Si bien, hay especies de cactáceas en las que el número de brotes es mayor como *Turbincarpus pseudomacrolele laussori* con 13.6 brotes por explante (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2012), 22.4 brotes por explante en la especie *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Soria-Campos *et al.*, 2013) o 24 brotes por explante en *Selenicereus grandiflorus* (Fontes *et al.*, 2010), existen otras en las que el número de brotes es similar al obtenido en *E. parryi*. Por ejemplo, 3.3 brotes por explante en *Pelecypora acelliformis* (Giusti *et al.*, 2002), 2.5 *Melocactus glauscens* (Torres-Silva *et al.*, 2018) o incluso menor, 1.4 en la especie *Mammillaria matildae* (García-Rubio y Malda-Barrera, 2010). Las diferencias en la respuesta parecen deberse a que cada especie requiere un balance adecuado de auxinas y citocininas para promover el correcto crecimiento y diferenciación celular (Machado y Prioli, 1996; Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

Rizogénesis y Aclimatación a Condiciones de Invernadero

Para el enraizamiento de brotes generados *in vitro* suele usarse medio de cultivo sin y con reguladores de crecimiento. Por ejemplo, solo con MS se obtuvo 63% de enraizamiento en *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002), 95% en *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) y 98% en *Micranthocereus flaviflorus* (Civatti *et al.*, 2017). También se ha reportado el uso de auxinas para favorecer la formación de raíz como en *Pelecypora aselliformis* 89% con 1 mg L⁻¹ de ácido indolacético (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *Turbincarpus ysabelae* 96% con 0.5 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (De la Rosa-Carrillo *et al.*, 2012) y *Nopalxochia ackermannii* 94.21% con 0.5 mg L⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (Deng *et al.*, 2018). Sin embargo, en medios de cultivo sin y con auxinas no fue posible inducir la formación de raíz en los brotes regenerados de *E. parryi*, debido a la formación de callo (datos no mostrados).

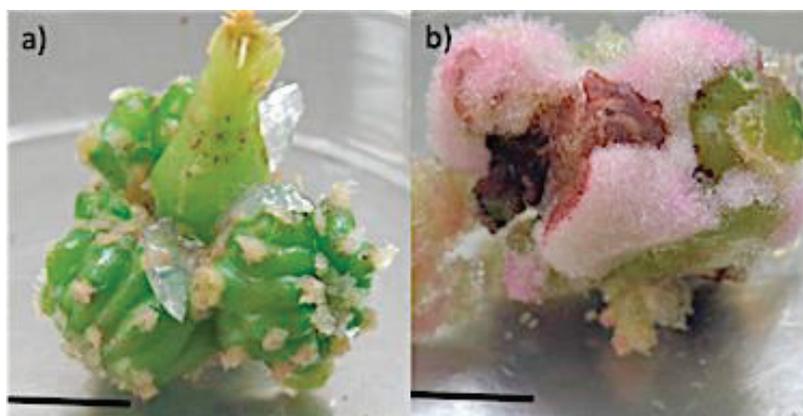


Figura 3. Aspecto de brotes de la triple interacción de *E. parryi* sin o con formación de callo a los 120 días de cultivo *in vitro*. a) Brotes bien definidos obtenidos en el medio de cultivo 5 con 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de AIA y b) Brotes deformados por la abundante presencia de callo generado con el medio de cultivo 2 con 8 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de AIA. Las barras representan 2 cm.

Figure 3. Appearance of *E. parryi* sprouts with or without callus formation at 120 days of *in vitro* culture. a) Well-defined sprouts obtained in culture medium 5 with 2 mg L⁻¹ of BAP and 0.5 mg L⁻¹ of AIA. b) Sprouts deformed by the abundant presence of callus in culture medium 2 with 8 mg L⁻¹ of BAP and 0.5 mg L⁻¹ of AIA. Bar scales are 2 cm.

Se ha descrito que el uso del TIBA, un inhibidor del transporte polar de auxinas, puede reducir la formación de callo en brotes generados *in vitro* (Hemmati *et al.*, 2017). Por ello, para inducir la formación de raíz se probaron diferentes concentraciones de TIBA. Se observó la formación de raíz en todas las concentraciones probadas obteniéndose el mayor enraizamiento (91%) con 0.5 mg L⁻¹ de TIBA (Cuadro 3). La Figura 4a muestra el aspecto de los brotes enraizados. El TIBA es un retardante del crecimiento, que evitó la frecuente formación de masa celular en esta etapa de enraizamiento. El TIBA al ser utilizado en bajas concentraciones, en la especie *Trichosanthes dioica*, promovió mejores resultados de enraizamiento que en los medios libres de reguladores de crecimiento (Singh *et al.*, 2015). Probablemente *E. parryi* presenta una alta concentración de auxinas endógenas y el TIBA permitió regular su transporte desde los brotes hacia la raíz.

La adaptación de las plantas generadas a condiciones externas es un paso determinante para que el método de propagación clonal sea efectivo (Soria-Campos *et al.*, 2013). La supervivencia de las plantas a condiciones de invernadero de *E. parryi*, fue de 58% después de cinco meses (Figura 4b). Estos resultados son similares

a los obtenidos en otras especies de cactáceas como, *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thuberti* con 86% de sobrevivencia en promedio (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) y *Micranthocereus polyanthus* con 67% (Civatti *et al.*, 2017).

Para incrementar el número de brotes y raíces podrían probarse otros reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones. Se sugiere analizar el contenido

Cuadro 3. Porcentaje de enraizamiento en brotes de *E. parryi* a los 30 días de cultivo *in vitro*.

Table 3. Rooting percentage in sprouts of *E. parryi* at 30 days of *in vitro* culture.

TIBA	No. Brotes	Enraizamiento
mg L ⁻¹		%
0	12	41.5b [†]
0.5	12	91a
1	12	83a
2	12	33b

[†] Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey * ($P < 0.05$).

[†] Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey test * ($P < 0.05$).

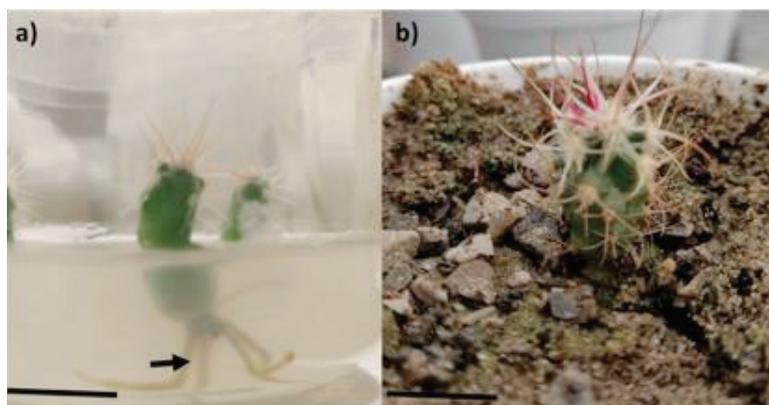


Figura 4. Enraizamiento de brotes de *E. parryi* y aspecto de una planta cultivada en condiciones de invernadero. a) Formación de raíz en medio MS adicionado con 0.5 mg L^{-1} de TIBA a los 30 días de cultivo *in vitro*. b) Planta en sustrato de arena y suelo de maceta (2:1) después de 5 meses en condiciones de invernadero. La barra representa 2 cm.

Figure 4. Rooting of sprouts of *E. parryi* and appearance of a plant grown under greenhouse conditions. a) Root formation in MS medium added with 0.5 mg L^{-1} of TIBA at 30 days of *in vitro* culture. b) Plant in sand substrate and potted soil (2:1) after 5 months under greenhouse conditions. Bar is 2 cm.

endógeno de hormonas del explante inicial para definir si este factor puede ser el responsable de la alta tasa de formación de callo, tanto en la etapa de multiplicación de brotes como en la inducción de raíces. Explorar el contenido de minerales y otras sustancias químicas, para encontrar el balance óptimo de los reguladores de crecimiento, es recomendable. La regeneración *in vitro* de *E. parryi* constituye un avance importante no solo para su propagación y conservación, sino para facilitar estudios en fisiología, bioquímica, biología celular y molecular en condiciones axénicas. De acuerdo con la literatura consultada, este es el primer trabajo que describe el protocolo para la micropropagación de *E. parryi*, el cual podrá contribuir a su conservación y evitar su riesgo de extinción.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que la modificación del pH 8, concentración de agar y Ca^{2+} , no promovieron un incremento en el número de brotes. Sin embargo, al combinarlos con los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3-acético (AIA) fue posible triplicar la formación de brotes bien definidos. Al aumentar el pH y la concentración de agar, la formación de callo disminuyó considerablemente.

Se logró un eficiente enraizamiento al usar 2,3,5 triiodobenzoico (TIBA), ya que eliminó la presencia del callo en el explante. La supervivencia de las plantas en condiciones de invernadero fue del 58%.

LITERATURA CITADA

- Arab, M. M., A. Yadollahi, A. Shojaeiyan, S. Shokri, and S. M. Ghojah. 2014. Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative rootstock. *J. Gen. Eng. Biotechnol.* 12: 81-87. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.10.001>.
- Chamorro, A. H., S. L. Martínez, J. C. Fernández y T. Mosquera. 2007. Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue. *Agron. Colomb.* 25: 47-53.
- Civatti, L. M., M. N. Guimaraes Marchi, and M. C. Bellintani. 2017. Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. *Afr. J. Biotechnol.* 16: 749-762. doi: <https://doi.org/10.5897%2Fajb2016.15901>.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger, G. C. Phillips, and S. A. Butler-Nance. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 337-343. doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.115.2.337>.
- Deng, Q., Q. Deng, Y. Wang, S. Liu, Y. Liu, Q. Yang, and L. Liu. 2018. *In vitro* micropropagation of *Nopalxochia ackermannii* Kunth. In: IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 199(2) 022010. doi: 10.1088/1755-1315/199/2/022010.

- De la Rosa-Carrillo, M. L., M. S. Domínguez-Rosales, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbincarpus*. *Interciencia* 37: 114-120.
- Emek, Y. 2018. Researches on *in vitro* germination and seedling development of medicinal endemic *Nepeta viscida* Boiss. Belonging Lamiaceae family. *Fresenius Environ. Bull.* 27: 8119-8127.
- Faisal, M., N. Ahmad, M. Anis, A. A. Alatar, and A. A. Qahtan. 2018. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi J. Biol. Sci.* 25: 273-277. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.009>.
- Fontes, P., A. Sato, and M. A. Esquibel. 2010. 6-benziladenine (BA) and giberelic acid (GA 3) effects on *in vitro* development of *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose (Cactaceae). *Plant Cell Cult. Micropropag.* 6: 76-82.
- García-Rubio, O. and G. Malda-Barrera. 2010. Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *HortScience* 45: 934-938. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.6.934>.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci. Hortic.* 95: 319-332. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00031-6).
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108: 105-120. doi: 10.1016/j.scienta.2006.01.038.
- Hemmati, M., H. Hemmati, C. Conroy, and T. Xing. 2017. Knockout of *ATMKK1* reduces *Arabidopsis* response to 2,3,5-triiodobenzoic acid in leaves. *J. Plant Develop.* 24: 23-31.
- IUSS Working Group WRB (International Union of Soil Sciences-World Reference Base for Soil Resources). 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014. Update 2015 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome. <http://www.fao.org/3/i3794en/I3794en.pdf> (Consulta: enero 15, 2020).
- Indacochea, B., J. Parrales, A. Hernández, C. Castro, M. Vera, A. Zhindón y J. Gabriel. 2018. Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agron. Costarricense* 42: 63-89. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>.
- Lázaro-Castellanos, J. O., M. Mata-Rosas, D. González, S. Arias, and F. Rechon. 2018. *In vitro* propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 54: 518-529. doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9908-z>.
- Lema-Ruminska, J. and D. Kulus. 2014. Micropropagation of Cacti-a Review. *Haseltonia* 19: 46-63. doi: <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>.
- López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera y C. Loaiza-Alanís. 2016. Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link Et Otto (Cactaceae). *Polibotánica* 42: 153-166. doi: <http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.42.8>.
- Machado, M. F. and J. Prioli. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus mill* (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 199-203. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02822766>.
- Mirabbasi, S. M. and B. Hosseinpour. 2014. Prevention of shoot tip necrosis, hyperhydricity and callus production associated with *in vitro* shoot culture of *Ulmus glabra*. *J. Novel Appl. Sci.* 3: 683-689.
- Montiel-Frausto, L. B., J. R. Enríquez Del Valle y A. Cisneros. 2016. Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biotechnol. Veg.* 16: 113-123.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Osuna, P., B. Corral, J. P. Flores, M. Valenzuela, A. Castañeda y S. Sánchez. 2009. Obtención del explante para iniciar un protocolo de micropropagación de *Echinocactus parryi*, una cactácea en peligro de extinción en Chihuahua. *Cienc. Front.* 7: 87-95.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa, and E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the sonoran desert. *HortScience* 37: 693-696. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.37.4.693>.
- Pérez-Molphe-Balch, E. y C. A. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 73-78. doi: <https://doi.org/10.1079/IVP2001248>.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, and M. de L. de La Rosa-Carrillo. 2012. *In Vitro* conservation of *Turbincarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *Haseltonia* 17: 51-57. doi: <https://doi.org/10.2985/1070-0048-17.1.6>.
- Ramírez-González, G., J. L. Rodríguez-De la O., J. Martínez-Solís y M. T. Colinas-León. 2019. Germinación y crecimiento *ex vitro* e *in vitro* de cinco especies de cactáceas del género *Mammillaria*. *Polibotánica* 48: 99-110. doi: <http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.48.8>.
- Ramírez-Malagón, R. y E. Salazar-Solís. 2016. Propagación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. *Acta Univ.* 26: 78-82. doi: <https://doi.org/10.15174/au.2016.1540>.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12: 139-143.
- Santos-Díaz, M. S., J. M. Martín del Campo-Macias, A. Arredondo-Gómez y M. L. Santos-Díaz. 2001. Efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfológica de *Astrophytum myrostigma* (Cactacea). *Rev. Fitotec. Mex.* 24: 133-138.
- Santos-Díaz, M. S. 2005. Micropropagación de *Ferocactus glaucescens* Britton & Rose, cactácea mexicana de valor ornamental. *Boletín Infor. SLCCS* 2: 6-8.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. 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. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=517309 (Consulta: diciembre 20, 2019).

- Scholten, H. J. and R. L. M. Pierik. 1998. Agar as a gelling agent: Chemical and physical analysis. *Plant Cell Rep.* 17: 230-235. doi: <https://doi.org/10.1007/s002990050384>.
- Singh, H., S. Kumar, and B. D. Singh. 2015. *In vitro* conservation of pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) germplasm through slow-growth shoot cultures: Effect of flurprimidol and triiodobenzoic acid. *Sci. Hortic.* 182: 41-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.009>.
- Soria-Campos, D., A. L. López-Escamilla y L. P. Olguín-Santos. 2013. Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas.* 16: 121-128.
- Teardo, E., L. Cassaretto, S. Wagner, E. Formentin, S. Behera, S. De Bortoli, V. Larosa, P. Fuchs, F. Lo Schlavo, A. Raffaello, R. Rizzuto, A. Costa, M. Schwarzlander e I. Szabo. 2017. Physiological characterization of a plant mitochondrial Calcium uniporter *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol.* 173: 1355-1370. doi: [10.1104/pp.16.01359](https://doi.org/10.1104/pp.16.01359).
- Torres-Silva, G., S. V. Resende, A. Lima-Brito, H. B. Bezerra, J. R. F. De Santana, and A. S. Schnadelbach. 2018. *In vitro* shoot production, morphological alterations and genetic instability of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. *South Afr. J. Bot.* 115: 100-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.001>.
- Yaacob, J., N. Mahmad, R. Mat Taha, N. Mohamed, A. I. Mad, and A. Saleh. 2014. Optimization of culture conditions (sucrose, pH, and photoperiod for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*). *Sci. World J.* doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/262710>.
- White, P. J. and M. R. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511. doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>.
- Wyn-Jones, R. G. and O. R. Lunt. 1967. The function of calcium in plants. *Bot. Rev.* 33: 407-426. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02858743>.