

Propagación *in vitro* de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt & Rose (Cactaceae), especie con protección especial

In vitro propagation of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt & Rose (Cactaceae), species with special protection

Martha Monzerrath Orozco-Sifuentes^{1*}, Leticia Escobedo-Bocardo¹, Humberto Reyes-Valdés¹, Alejandra Torres-Tapia², Ana María-Ochoa¹

¹Departamento de Fitomejoramiento, ²Centro y Desarrollo en Tecnología de Semillas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coah., México. Tel. [844] 411 02 96 al 98. E-mail: monze82@yahoo.com.mx (*Autor responsable).

RESUMEN

La familia Cactaceae es una de las más diversas en México, sus peculiares formas y su gran capacidad de adaptación en zonas áridas han sido motivo de fascinación de coleccionistas nacionales y extranjeros. Aunque un gran número de especies se encuentran incluidas en listados de protección especial, la constante presión de colecta con fines de comercio ilegal no ha cesado, dañando seriamente a las poblaciones, y destruyendo completamente su hábitat. *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose, considerada una especie muy bella, está catalogada como especie con protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010, a pesar de esto su saqueo y comercialización ilegal es una realidad. Es necesario propagarla eficientemente y asegurar su conservación. Una opción para ello es la micropropagación, la cual permite generar muchas plántulas a partir de un solo ejemplar. El objetivo de esta investigación fue evaluar la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal al medio basal Murashige y Skoog para eficientar la propagación *in vitro* de *E. micromeris*. Se aplicaron tres hormonas vegetales: ácido indolacético (AIA), Kinetina (KIN) y ácido giberélico (AG), así como la interacción entre ellas, formando cuatro tratamientos más el testigo. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y seis repeticiones. Las vitroplantas se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas durante 30, 60 y 90 d. Al término de cada periodo se evaluaron el número de brotes, diámetro, altura, peso fresco y seco de vitroplantas y porcentaje de rendimiento. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y se realizó comparación de medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos basados en KIN aumentaron ($p < 0.05$) el diámetro, altura y peso, pero sólo la interacción KIN-AIA promovió la formación de brotes, por lo que se consideró como el mejor tratamiento.

Palabras clave: Cactáceas, *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose, micropropagación, hormonas.

ABSTRACT

The Cactaceae family is considered one of the most diverse of Mexico. Its peculiar shapes and high adaptability in arid areas have been a source of fascination for domestic and foreign collectors. Although a large number of species are included in lists of special protection, the constant pressure of collection for purposes of illegal trade has continued, seriously damaging populations, and completely destroying their habitat. The cactus *Epithelantha micromeris* considered a very beautiful species is listed as a species with special protection according to NOM-059-SEMARNAT-2010, despite this its looting and illegal marketing is a reality, so it is necessary to propagate it efficiently and ensure its conservation. One option for this is the micropropagation technique, which can generate all desired seedlings from a single copy. The objective of this research was to evaluate the addition of plant growth regulators to basal media Murashige & Skoog to make more efficient the *in vitro* propagation. Three plant hormones were applied: indol acetic acid (IAA), kinetin (KIN), gibberellic acid (GA) and the interaction between them forming four treatments. A completely randomized design with six replicates was used. The vitroplants were kept under controlled environmental conditions for 30, 60 and 90 d. After each period the number of shoots, diameter, height, fresh and dry weight and percent yield were evaluated. The data were subjected to analysis of variance and differences between means as determined by a Tukey test ($p < 0.05$). KIN-based treatments had significant effects on diameter, height and weight, but only KIN-IAA interaction promoted shoot formation, regarded as the best treatment.

Key words: Cacti, *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose, micropropagation, hormones.

Recibido: Mayo 2013 • Aprobado: Julio 2014.

INTRODUCCIÓN

México alberga la mayor concentración de cactáceas a nivel mundial (Hernández, 1994). Esta familia ocupa el quinto lugar en diversidad con un alto grado de endemismo a nivel genérico (73%) y específico (78%). La mayor parte de las especies se encuentran ampliamente distribuidas en zonas áridas y semiáridas del país, principalmente en el Desierto Chihuahuense (zona comprendida entre Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí).

Las cactáceas han estado presentes en la cultura mexicana desde tiempos prehispánicos, y desde entonces ya formaban parte de la alimentación (ej. el nopal). Han permanecido hasta nuestros días, y sus usos son muy diversos: es muy común observarlas delimitando terrenos o como recurso natural en la fijación del suelo (ej. los órganos), como fuente de sustancias de interés farmacológico (ej. peyote) y cosmético (ej. el nopal), son ampliamente utilizadas en la elaboración de dulces (ej. biznaga), además, forman parte del escudo nacional mexicano, y por su peculiar anatomía se usan como plantas de ornato (*Cephalocereus senilis*, *Epithelantha micromeris* etc.) (Bravo, 1978).

La familia Cactaceae es uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. Sus poblaciones han sido gravemente afectadas por factores como el crecimiento de la mancha urbana, la conversión del terreno para uso agrícola y, sobre todo, por el saqueo desmedido de las plantas con fines de comercio ilegal, lo que ha ocasionado que la familia completa se encuentre incluida en la lista de protección especial nacional de la NOM-059-SEMARNAT-2010, con 272 especies incluidas (SEMARNAT, 2010) y en listas internacionales: la UICN, con 65 especies y la CITES con 41 especies sólo en apéndice I (Jiménez, 2011; Alánis, 2008; Arias *et al.*, 2005).

La biznaga *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose es considerada una especie muy bella, y según Benítez (2002) se encuentra entre las especies de cactáceas más vendidas por Internet. A esta cactácea se le conoce comúnmente como botón o biznaga blanca chilona, es una planta pequeña globosa que llega a medir hasta 6 cm de diámetro, forma macollos con más de 20 miembros, su tallo está compuesto por filas de pequeños tubérculos que dan origen a areolas, las que están cubiertas de lana blanca y de las cuales emergen espinas blancas y curvadas hacia el tallo. Su flor es rosa pálido con

vetas blancas y sus frutos son cilíndricos color rojo brillante, con semillas negras de aproximadamente 2 mm de largo. Es común del Desierto Chihuahuense, principalmente desde el sur de Texas hasta el Sur de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas (Flores, 2005). Actualmente se encuentra enlistada como especie con protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010. Su propagación es por medio de semilla; sin embargo es insuficiente para cubrir la demanda, debido a sus bajas tasas de germinación y su lento crecimiento.

La metodología de cultivo *in vitro* ofrece una alternativa eficiente en la propagación de *E. micromeris*, no solo por la velocidad con la que es capaz de generar una planta completa, sino por la cantidad de ejemplares que se pueden obtener en un mismo periodo. Esta técnica consiste en cultivar células, tejidos u órganos (explante) en medios nutritivos adecuados, bajo condiciones de asepsia y en condiciones ambientales controladas, generando así una o varias plantas. El medio basal que generalmente es utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual contiene macro y micronutrientes, vitaminas y carbohidratos que promueven el crecimiento de la planta, no obstante la adición de algunos reguladores de crecimiento vegetal pueden ayudar a eficientar el proceso.

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal al medio basal Murashige y Skoog para eficientar la propagación *in vitro* de *E. micromeris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah., México.

Material vegetal

Se seleccionaron brotes de *E. micromeris*, provenientes de semillas germinadas *in vitro*, de aproximadamente 1 cm de alto con aspecto y tamaño uniforme. Se colocaron cuatro brotes por frasco y se consideró a cada frasco como una repetición.

Medio de cultivo

Se utilizó como medio basal MS al 100% complementado con mio-inositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), piridoxina-HCl (0.5 mg L⁻¹), tiamina-HCl (0.4 mg L⁻¹), glicina (2 mg L⁻¹), sacarosa (30 g) y agar (9 g). Al medio basal se añadieron los regulado-

res de crecimiento: ácido indolacético (AIA), Kinetina (KIN) y ácido giberélico (AG).

Tratamientos

Se evaluaron cinco tratamientos, incluyendo un testigo sin reguladores de crecimiento: T1 = (Testigo); T2 = KIN (1 mg L⁻¹); T3 = KIN (1 mg L⁻¹) + AIA (1 mg L⁻¹); T4 = KIN (1 mg L⁻¹) + AIA (0.5 mg L⁻¹) + AG (1 mg L⁻¹) y T5 = KIN (1 mg L⁻¹) + AIA (1 mg L⁻¹) + AG (1 mg L⁻¹).

Condiciones de cultivo

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7. Las soluciones se vaciaron en frascos de vidrio, 20 mL en cada uno y se esterilizaron a 120 °C durante 15 min. Las vitroplantas se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de fotoperiodo (16 horas luz) y temperatura (26 °C) durante 30, 60 y 90 d.

VARIABLES EVALUADAS

El medio de cultivo se renovó cada 30 d, y en cada ocasión se evaluó el diámetro, la altura, y peso fresco y seco de planta, así como el rendimiento en peso. También se registró la forma, número de brotes y formación de raíz.

Porcentaje de rendimiento

Se determinó por medio de la fórmula $\% \text{ rend} = 100 \times \frac{\text{peso seco}}{\text{peso fresco}}$, para detectar diferencias en la producción de biomasa a partir de la aplicación de los tratamientos. El peso fresco se obtuvo pesando las vitroplantas en balanza analítica al término de cada periodo, y el peso seco después de someterlas a un proceso de liofilización por 24 h (peso por repetición, cada una consta de cuatro vitroplantas).

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y seis repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a una ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.00.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos con KIN sola y la interacción KIN-AIA provocaron mayor ($p < 0.05$) diámetro de las vitroplantas a los 60 y 90 d, mientras que la interacción KIN-AIA-AG y la KIN sola, aumentaron la altura a los 30, 60 y 90 d. Para el resto de las variables sólo hubo diferencias ($p < 0.05$) a los 90 d: la KIN y la interacción

KIN-AIA-AG generaron vitroplantas con el mayor peso fresco, mientras que ningún tratamiento superó al testigo en peso seco y porcentaje de rendimiento (Cuadro 1).

Forma de las vitroplantas

Las vitroplantas de *E. micromeris* presentaron diferencias en la forma, altura, presencia de raíz y número de brotes (Figura 1).

El testigo y los tratamientos con KIN y KIN-AIA conservaron la forma original globosa de *E. micromeris*, mientras que los basados en la interacción KIN-AIA-AG presentaron formas alargadas o cónicas, características observadas por Navarro y Demeneghi (2007) en *Mammillaria pectinifera* al someterla a diferentes concentraciones de Agromil-plus (Citocinina-giberelina-auxina), éste ocasionó variación en la altura de las plántulas y cambios en cuanto a la forma, la coloración y número de espinas. En nuestro estudio, el comportamiento fue similar, ya que las vitroplantas obtenidas con los tres reguladores de crecimiento (T4 y T5), también son las de mayor altura, durante los tres periodos de evaluación, presentando cambios en la coloración y sobre todo en la forma, lo que puede indicar que esta combinación de reguladores de crecimiento no es para la propagación *in vitro* de esta especie.

Formación de brotes

El T3, basado en la combinación de KIN y AIA no sólo formó vitroplantas de buena calidad en cuanto a forma y altura, sino que además fue el único que promovió la formación de brotes con una media máxima de ocho brotes por explante (Figura 1).

Esta respuesta coincide con Johnson y Emino (1979) y Echenique *et al.* (2004) que afirman que la existencia de un balance favorable entre auxinas y citocininas es particular para la inducción de brotes para cada especie. Por su parte, Malda *et al.* (1999) señalan que, en distintas especies de cactáceas, concentraciones altas de citocininas y bajas de auxinas inducen la brotación. Velázquez y Soltero (2001) manejando una concentración alta de 2-isopentiladenina (2iP) (4.0 mg L⁻¹) y una baja de ácido naftalenacético (0.2 mg L⁻¹) obtuvieron una media de 14 brotes por explante en vitroplantas de *E. micromeris*. Es importante tomar en cuenta que en ambos casos la mejor respuesta se obtuvo con tratamientos combinados, en nuestro caso específico con KIN-AIA, donde se manejó la misma concentración para ambos reguladores.

Cuadro 1. Variables evaluadas a los 30, 60 y 90 d en la propagación in vitro de *Epithelantha micromeris* en medio basal Murashige y Skoog, enriquecido con reguladores de crecimiento vegetal a diferentes concentraciones.

Variable	Edad de Vitroplanta (d)	T1	T2	T3	T4	T5
Diámetro (cm)	30	0.75 a	0.76 a	0.78 a	0.78 a	0.70 a
	60	0.80 abc	0.85 ab	0.89 a	0.71 c	0.72 bc
	90	0.86 abc	0.98 a	0.93 ab	0.78 c	0.83 bc
Altura (cm)	30	1.40 b	1.38 b	1.40 b	1.62 a	1.65 a
	60	1.54 c	1.76 abc	1.61 bc	2.03 a	1.89 ab
	90	1.91 ab	2.35 a	1.64 b	2.24 a	2.01 ab
Peso fresco (g)	30	3.02 a	2.62 a	2.35 a	3.31 a	3.23 a
	60	3.54 a	5.34 a	4.22 a	4.11 a	4.00 a
	90	4.17 b	6.54 a	4.11 b	5.03 ab	3.45 b
Peso seco (g)	30	0.11 a	0.13 a	0.10 a	0.12 a	0.11 a
	60	0.18 a	0.24 a	0.20 a	0.20 a	0.18 a
	90	0.41 a	0.46 a	0.40 ab	0.33 bc	0.28 c
Rendimiento (%)	30	3.81 a	4.93 a	4.40 a	3.58 a	3.33 a
	60	5.43 a	4.50 a	4.82 a	4.96 a	4.61 a
	90	9.83 a	7.07 b	9.75 a	6.54 b	8.05 b

Valores con la misma letra entre columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con una $(p < 0.05)$. T1= testigo, T2= KIN (1mg L⁻¹), T3= KIN 1mg L⁻¹+ AIA (1mg L⁻¹), T4= KIN (1mg L⁻¹) + AIA (0.5mg L⁻¹) + AG (1mg L⁻¹), T5 = KIN 1mg L⁻¹+ AIA (1mg L⁻¹)+ AG (1mg L⁻¹).

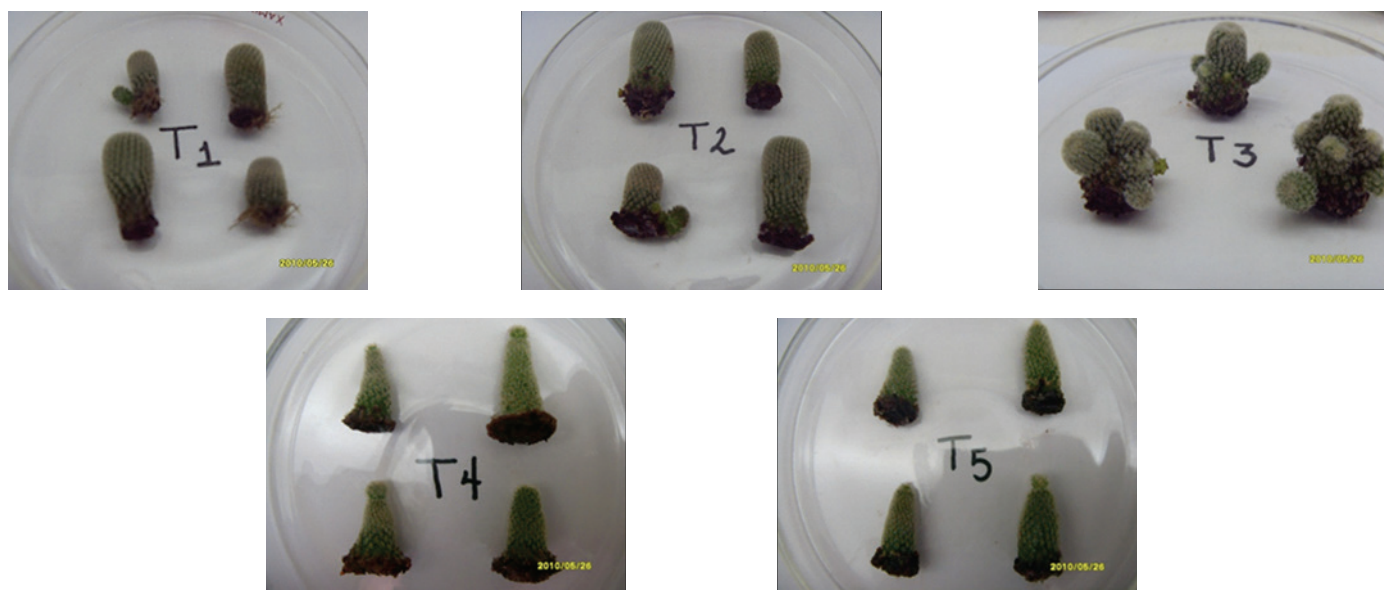


Figura 1. Vitroplantas de *E. micromeris* a los 90 d de tratamiento. T1= Sin reguladores, T2= KIN 1 mg L⁻¹, T3= KIN 1 mg L⁻¹ + AIA 1 mg L⁻¹, T4= KIN 1 mg L⁻¹ + AIA 0.5 mg L⁻¹ + AG 1 mg L⁻¹, T5 = KIN 1 mg L⁻¹ + AIA 1 mg L⁻¹ + AG 1 mg L⁻¹.

El tratamiento con KIN sola permitió obtener vitroplantas de buena forma y altura, y favoreció el crecimiento, pero no promovió la formación de brotes; Mauseth y Halperin (1975) mencionan que cuando el explante contiene areolas y es expuesto a concentraciones apropiadas de citocininas, los meristemos axilares se activan produciendo brotes. Velázquez y Soltero (2001) exponen que las fuentes de citocininas (KIN y 2iP) presentan efectos altamente significativos sobre la producción de brotes en *E. micromeris*, obteniendo una media máxima de 17 brotes por explante utilizando concentraciones de 8 mg L⁻¹ de KIN, concentración relativamente alta en comparación con la utilizada en el T2 (1 mg L⁻¹), lo que podría explicar la ausencia de brotes. Sin embargo, algunos resultados reportados por Flores *et al.* (2011) mencionan una media de 6.4 brotes al utilizar concentraciones de 1 mg L⁻¹ de KIN en *E. micromeris* cultivada *in vitro*, resultado contrastante con el obtenido; una posible explicación a lo anterior puede estar dirigida a los criterios asumidos a la hora de elegir los explantes, así como a aspectos relacionados con las concentraciones hormonales endógenas.

Formación de raíces

El testigo fue el único tratamiento que formó raíces; Clayton *et al.* (1990) y Choreño *et al.* (2002) mencionan que es común la generación de raíces de forma espontánea en cactáceas en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, mientras que, Velázquez y Soltero (2001) reportan que en medios adicionados con AIA, la producción de raíces en *E. micromeris* fue de escasa a nula, y dedujeron que este regulador es inhibitorio para la producción de raíces en esta especie. Ambos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo, ya que no hubo formación de raíces en los tratamientos con reguladores de crecimiento (T3, T4 y T5).

CONCLUSIÓN

El tratamiento con kinetina y ácido indolacético aumenta el diámetro de las vitroplantas; sin embargo, la kinetina sola aumenta la altura, peso fresco y seco, y mantiene la forma original globosa de *E. micromeris* a los 90 d de tratamiento. El testigo y la kinetina (1mg L⁻¹) más ácido indolacético (1mg L⁻¹) aumentan el porcentaje de rendimiento. El testigo, la kinetina sola y la kinetina (1mg L⁻¹) más ácido indolacético (1mg L⁻¹) generan vitroplantas de buena calidad en diámetro, altura y peso, además, este último tratamiento promueve la formación de brotes

en *E. micromeris*, característica de vital importancia en un proceso de micropropagación, y por lo cual se considera como el mejor de los tratamientos probados en este trabajo.

LITERATURA CITADA

- ALANÍS-FLORES, G.J. y C.G. Velasco-Macías. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el Noreste de México. *Ciencia UANL* 11(1): 5-11.
- ARIAS, S., U. Guzmán, M.C. Mandujano, M. Soto G. y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción I. *Cact. Suc. Mex.* 50(4): 101-124.
- BENÍTEZ, H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la citas. *Conabio. Biodiversitas* 40: 8-11.
- BRAVO-HOLLIS, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 743 pp.
- CHOREÑO-TAPIA, J.M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areólas. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 8(2): 183-196.
- CLAYTON, P.W., J.F. Hubstenberger and G.C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the Cactacea subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 115(2): 337-343.
- ECHENIQUE, V., C. Rubinstein y L. Mroginski. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina, 448 pp.
- FLORES, A. 2005. Guía de Cactáceas del Estado de Coahuila. Instituto Coahuilense de Ecología. Gobierno del Estado de Coahuila. 105 pp.
- FLORES, P.M.G. 2011. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* Engelman para la Generación de Brotes. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah., México, 62 pp.
- HERNÁNDEZ, H.M. y H. Godínez A. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mex.* 26: 33-52.
- JIMÉNEZ, S.C.L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Rev. Digital Universitaria* 12(1): 3-23.
- JOHNSON, J.L. and E.R. Emino. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cact. Succ. J.* 51: 275-277.
- MALDA, G., R. Backhaus y C. Martin. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell Tiss. Org.* 58: 1-9.
- MAUSETH, J.D. and W. Halperin. 1975. Hormonal Control of Organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62(8): 869-877.
- MURASHIGE, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

NAVARRO, M.C. y A.P. Demeneghi. 2007. Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. *Zonas Áridas* 11(1): 233-239.

SEMARNAT, 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, exclu-

sión o cambio - Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección, México.

VELÁZQUEZ-ENCISO, L.E. y R. Soltero-Quintana. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.). Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cact. Suc. Mex.* 46(3): 56-62.