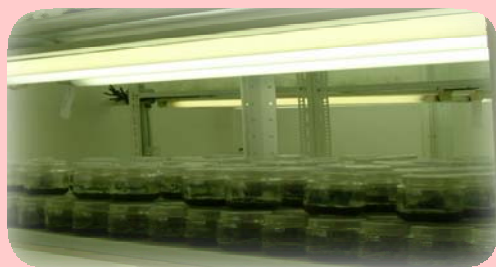


MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose  
CACTÁCEA ORNAMENTAL DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE

Eulalia Edith VILLAVICENCIO GUTIÉRREZ, Areli GONZÁLEZ CORTES, Miguel A. CARRANZA PÉREZ, Alberto ARREDONDO GÓMEZ.



Centro de Investigación Regional del Noreste  
Campo Experimental Saltillo  
Saltillo, Coahuila. Noviembre de 2012  
Folleto Técnico MX-0-310602-36-03-15-09-51  
ISBN: 978-607-425-923-0



GOBIERNO  
FEDERAL

SAGARPA

**inifap**  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**SNICS**<sup>®</sup>

**SINAREFI**  
Sistema Nacional de Recursos Forestales  
Institución de Investigación y Apoyo  
Agropecuario



Vivir Mejor

**Secretaría de Agricultura, Ganadería,  
Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación**

**Lic. Francisco Javier Mayorga Castañeda**  
Secretario

**M. Sc. Mariano Ruiz-Funes Macedo**  
Subsecretario de Agricultura

**Ing. Ignacio Rivera Rodríguez**  
Subsecretario de Desarrollo Rural

**Ing. Ernesto Fernández Arias**  
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

**M. Sc. Jesús Antonio Berúmen Preciado**  
Oficial Mayor

**Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias**

**Dr. Pedro Brajcich Gallegos**  
Director General

**Dr. Salvador Fernández Rivera**  
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

**M. Sc. Arturo Cruz Vázquez**  
Coordinador de Planeación y Desarrollo

**Lic. Marcial A. García Morteo**  
Coordinador de Administración y Sistemas

**Centro de Investigación Regional del Noreste**

**Dr. Sebastián Acosta Núñez**  
Director Regional

**Dr. Jorge Elizondo Barrón**  
Director de Investigación, Innovación y Vinculación

**Dr. Isidro Humberto Almeyda León**  
Director de Planeación y Desarrollo

**Dr. José Luis Cornejo Enciso**  
Director de Administración

**Dr. David Sánchez Aspeytia**  
Jefe de operación del Campo Experimental en Saltillo

**Micropropagación y producción de  
*Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C.  
Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental  
del Desierto Chihuahuense**

**Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez<sup>1</sup>  
Areli González Cortes<sup>2</sup>  
Miguel A. Carranza Pérez<sup>3</sup>  
Alberto Arredondo Gómez<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Investigador del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

<sup>2</sup> Integrante de la Red Cactáceas del SINAREFI

<sup>3</sup> Profesor-Investigador del Depto. Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

<sup>4</sup> ex-investigador del Campo Experimental San Luis. CIRNE-INIFAP.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina  
Delegación Coyoacán, C. P. 04010 México D. F. Teléfono (55) 3871-8700

**“Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris*  
(Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental del  
Desierto Chihuahuense”**

ISBN: 978-607-425-923-0

Clave: INIFAP/CIRNE/F-99  
Primera Edición 2012

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación,  
ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico,  
mecánico, fotocopiado, por registro u otros métodos, sin el permiso previo  
y por escrito a la Institución.

## INDICE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Planta de "Biznaga blanca chilona" <i>Epithelantha micromeris</i>	3
2	Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de la biznaga blanca chilona ( <i>Epithelantha micromeris</i> ) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).	15
3	Protocolo para el establecimiento de semillas de cactáceas en un cultivo aséptico. a) Envolver las semillas en sacos de tela. b) Lavar con agua estéril y detergente. c) Lavar con una solución de etanol al 70 % por 5 min. d) Lavar con hipoclorito de sodio al 20 % + Tween al 20 % por 5 min. e) Enjuagar con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar. f) Eliminación del saco de tela. g) Colocar en caja petri para su secado en la Campana de Flujo Laminar y establecer las semillas en tubo o frasco con 5 y 15 mL de medio respectivamente.	17
4	Velocidad de germinación de <i>E. micromeris</i> en diferentes medios de cultivo MBG (T1= MS 50X; T2= MS 50X+8.65 $\mu$ M de AG <sub>3</sub> ; T3= 0.6% agar y 87.64 mM de sacarosa; T4= 0.6% agar + 87.64 mM de sacarosa + 8.65 $\mu$ M de AG <sub>3</sub> ).	20
5	Brotos obtenidos en la etapa de multiplicación de <i>E. micromeris</i> .	23
6	Brotos subcultivados en la etapa de multiplicación de <i>E. micromeris</i>	25
7	Efecto de <i>Azospirillum</i> sp. en el proceso rizogénico de <i>E. micromeris</i> en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.	27
8	Esquema de la micropropagación de <i>Epithelantha micromeris</i> .	30

## INDICE CUADROS

Cuadro		Pag.
1	Clasificación taxonómica de <i>Epithelantha micromeris</i> (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose	7
2	Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Epithelantha micromeris</i> .	11
3	Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de <i>Epithelantha micromeris</i> utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.	16
4	Tasa de multiplicación de <i>E. micromeris</i> .	22
5	Requerimientos de biofertilizante durante la micropropagación <i>in vitro</i> de plántulas de <i>E. micromeris</i> .	26
6	Influencia de <i>Azospirillum</i> sp. en el incremento de altura de tallo, longitud de raíz y número de raíces de <i>E. micromeris</i> durante la cuarta semana de micropropagación.	26

# CONTENIDO

Introducción .....	1
Características de las cactáceas.....	3
Características del género <i>Epithelantha</i> .....	5
Descripción morfológica de <i>Epithelantha micromeris</i> (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose.....	5
Basionimio.....	7
Sinónimos.....	7
Nombre Común .....	7
Importancia de las cactáceas en la horticultura ornamental .....	7
Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) en cactáceas .....	8
Protocolo para la micropropagación de la biznaga blanca chilona ( <i>Epithelantha micromeris</i> ).....	9
Medio Nutritivo Base .....	10
Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo .....	11
Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	12
Etapa 1. Establecimiento del inóculo en un cultivo aséptico .....	12
Semillas como fuente de inóculo .....	14
Germinación <i>in vitro</i> de <i>Epithelantha micromeris</i> .....	16
Porcentaje de germinación (PG).....	16
Velocidad de emergencia (VE).....	17
Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes (MIB).....	18
Inducción de brotes. (IB).....	19
Altura de brotes (A) .....	21
Etapa 3 enraizamiento <i>in vitro</i> .....	23
Preparación de la concentración .....	24
Incremento en altura del tallo (IAT) .....	24
Número de raíces (NR) .....	25
Longitud de raíces (LR).....	25
Etapa 4 Aclimatación .....	26
Manejo de las vitroplantas .....	26
Sobrevivencia.....	27
Conclusiones .....	29
Literatura citada .....	29

# Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental del Desierto Chihuahuense

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez<sup>1</sup>

Areli González Cortes<sup>2</sup>

Miguel A. Carranza Pérez<sup>3</sup>

Alberto Arredondo Gómez<sup>4</sup>

## Introducción

*Epithelantha micromeris*, es una cactácea, que por su morfología y aspecto es apreciada por coleccionistas expertos y/o aficionados nacionales y extranjeros, quienes la utilizan como planta de ornato. Es una especie que se distribuye en el Desierto Chihuahuense desde el oeste de Texas y Nuevo México en Estados Unidos de América hasta el norte de México (Coahuila, Chihuahua, Nuevo León y San Luis Potosí) presentando en nuestro país variantes endémicas.

Son plantas que presentan un tamaño pequeño, de 6 cm de diámetro, tallo simple o cespitoso, con espinas pectinadas radiales agrupadas en aréolas, con flores diurnas pequeñas de 25 mm de longitud de color rosa pálido, con atractivos frutos rojos que contrastan con el aspecto gris cenizo de la planta. Por la rareza que presentan estos cactus globosos han sido considerados por los productores de plantas de ornato y viveristas como un producto ornamental con demanda en el mercado nacional e internacional (Leszczyńska, 1991). De acuerdo a las categorías de riesgo establecidas por la NOM-059-2010 (SEMARNAT, 2010), es una especie amenazada de extinción y está clasificada también en el apéndice II del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (CITES, 1990).

---

<sup>1</sup>M. C. Investigadora del Programa Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales. Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

<sup>2</sup>M.C. Integrante de la Red Cactáceas del SINAREFI

<sup>3</sup>Biol. Profesor-Investigador del Depto. Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

<sup>4</sup>Biol. ex-investigador del Campo Experimental San Luis. CIRNE-INIFAP

Una especie se considera amenazada cuando algunas de sus poblaciones pueden llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, si se siguen presentando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, como el deterioro o modificación de su hábitat, lo que puede disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones. Esta categoría coincide parcialmente con la categoría de vulnerable considerada en la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

La ecoregión donde se distribuyen y habitan las cactáceas presenta un alto grado de degradación, por lo que se ha hecho necesario implementar un programa de manejo y conservación *ex situ* enfocado a la reproducción de especies con problemas de sobrevivencia y baja regeneración como es el caso de *E. micromeris*, cactácea que en su hábitat natural presenta un lento crecimiento necesitándose de varios años para que una planta alcance su tamaño adulto y pueda reproducirse. Por el estatus de riesgo en el que se encuentra esta especie, así como sus variantes es necesario desarrollar técnicas de conservación *ex situ* mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como una opción para multiplicar este germoplasma que cuenta con pocos individuos en poblaciones naturales (Figura 1).



Figura 1. Planta de "Biznaga blanca chilona" *Epithelantha micromeris*



La conservación *ex situ* es el medio mas significativo y generalizado para conservar los recursos fitogenéticos, en este tipo de conservación el banco de genes se mantiene en instalaciones conocidas, como refrigeradores, en cultivos de multiplicación *in vitro* y en bancos de germoplasma en campo (CRGAA, 2011).

Este tipo de conservación puede aplicarse no solo para *E. micromeris*, sino también para aquellos taxones que se encuentran en el Apéndice I y II de CITES (Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (41 taxones), en la Nom-059 SEMARNAT (2010) (255 taxones) y en el libro rojo de la IUCN (65 taxones) (CITES, 1990 y 1994; Bárcenas, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Villavicencio *et al.*, 2010).

Considerando el estatus de riesgo y las condiciones naturales que presentan las poblaciones naturales de *E. micromeris* en esta publicación se describe el proceso de micropropagación desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, de acuerdo con las etapas señaladas por Murashige (1974), Dixon (1985) y Moebius-Goldammer *et al.*, (2003) que van desde el establecimiento del explante, multiplicación de inóculos *in vitro* hasta la aclimatación de las plantas en invernadero.

### **Características de las cactáceas**

En México la familia de las cactáceas está representada por 67 géneros con alrededor de 625 especies, lo que la constituye como un grupo importante de la flora nativa de nuestro país. Dentro de esta familia se encuentran plantas con valor evolutivo, ecológico, histórico, cultural y económico incuestionable (Bravo, 1991a; Bárcenas, 2006).

De las especies de cactáceas mexicanas se estima que más del 35% están clasificadas en diversos grados de riesgo, ya sea amenazadas, en protección especial o en peligro de extinción, lo que significa que estamos acabando con nuestros recursos genéticos, sin tener una idea precisa de la utilidad que representan para la humanidad (Aldete *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Villavicencio *et al.*, 2010)

Una región rica en diversidad de cactáceas se localiza en el Desierto Chihuahuense, en la que se distribuyen 25 géneros con aproximadamente 148 especies (Guzmán *et al.*, 2007). A pesar de que esta área ecológica cuenta con una gran riqueza cactológica y se considera como el núcleo de concentración y diversidad genética más importante del Continente Americano, muchas de estas especies se encuentran en la Nom-059 SEMARNAT 2010 como amenazadas o en peligro de extinción, al igual que las orquídeas y cicadáceas (SEMARNAT, 2010).

Los cactus son plantas de origen americano que evolucionaron de plantas herbáceas, trepadoras, tropicales cercanas a las *Pereskia*. Las plantas de la familia *Cactaceae* están adaptadas para sobrevivir en climas áridos, debido a que tienen una cutícula rica en ceras que les sirve para prevenir la pérdida de agua y sus hojas han sido reducidas a espinas (Newland *et al.*, 1980; Montañón *et al.*, 1993; Hernández y Godínez, 1994).

Estas especies presentan un tallo carnoso que puede crecer en forma de órgano, globular, cilíndrico y candelabro. La diferencia entre las cactáceas y las plantas  $C_3$  y  $C_4$  es que presentan un tipo de metabolismo conocido como Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (MAC), que les permite sobrevivir en ambientes secos. Este tipo de plantas son de crecimiento lento, lo que las obliga a desarrollar grandes tejidos de reserva, donde almacenan durante el día moléculas llenas de energía química y por la noche producen ácido málico como resultado de la fijación de  $CO_2$  atmosférico. Para guardar estos ácidos nocturnos, las plantas son forzadas a formar tejido no fotosintético que les permite guardar agua (Bravo y Scheinvar, 1995; Ordóñez, 2003; Mauseth, 2004; Nobel y Barrera, 2004).

En el tallo se distribuyen meristemos laterales frecuentemente latentes compuestos por dos yemas, que producen espinas y otras que producen brotes axilares o yemas florales (Buxbaum, 2000).

Las areolas son órganos muy característicos en las cactáceas, que se les considera como yemas. En estas estructuras se forman hojas reducidas, flores, nuevos tallos, espigas, gloquídeas, cerdas y pelos en algunos casos raíces adventicias. Al centro de las areolas en casi todas las especies existe

un meristemo de crecimiento integrado por dos porciones, la abaxial o extrema, que forma las espinas y la adaxial que origina las flores (Barthlott, 1979; Nobel, 1998).

Las espinas particularmente son hojas modificadas y conforman los órganos más característicos de las cactáceas. En ocasiones faltan como lo son en *Lophophora*, *Aztekium* y *Epiphyllum* entre otros (Anderson, 2001; Hunt et al., 2006).

### **Características del género *Epithelantha***

El nombre de *Epithelantha* deriva del griego *epi*, sobre, *thele*, pezón y *anthos*, flores, haciendo referencia a que las flores nacen en la punta de los tubérculos. Este género inicialmente se relacionó con el género *Mammillaria* pero después se demostró que existen diferencias entre las areolas de ambos géneros (CONABIO, 1998).

De este género se consideran unas 28 especies que se distribuyen desde Estados Unidos hasta el norte de México (Bravo y Sánchez, 1991a; Hunt, 2006).

### **Descripción morfológica de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose**

**Plantas** pequeñas, simples o algo cespitosas. **Tallo** globoso, subgloboso o cortamente ovoideo, de 4 a 5 y hasta 8 cm de altura por 2.5 a 6 cm de diámetro, cubierto por espinas; ápice hundido y recubierto por un mechón de espinas erguidas. **Tubérculos** dispuestos en 21 y 34 series espiraladas, cónico-cilíndricos, de 1.5 mm de longitud y 3 mm de altura, ocultos por las espinas. **Aréolas** pequeñas, alargadas, dimorfas, la florífera adyacente a la espinífera, situadas en el ápice de los tubérculos, cuando jóvenes con lana blanquecina. **Espinas** 13 a 28 y hasta 40 dispuestas en 1, 2 o 3 series, según la edad de la planta, generalmente todas son radiales, de 5 a 8 mm de longitud, en ciertas variedades hay algunas interiores que han sido consideradas como centrales; todas son aciculares, barbeladas, glandulosas, blancas, o con tintes amarillentos, de color rosa castaño rojizo, pectinadas, horizontalmente radiadas, ascendentes; en las aréolas apicales las externas son más largas y erectas, y se agrupan formando un pincel; es frecuente que

con el tiempo las espinas se rompan más o menos a la mitad. **Flores** brotando de la aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes cercanos al ápice del tallo, muy pequeñas, infundibuliformes, abriéndose poco, de 3 a 5 mm de longitud y 3 a 6 mm de diámetro emergiendo muy poco entre la lana y las espinas del ápice del tallo; pericarpelo algo claviforme, desprovisto de escamas; segmentos exteriores de perianto 3 a 5, hiperbólicos, de 1 a 2 mm de longitud y 20 mm de anchura, con el ápice redondeado y el margen irregularmente dentado, de color rosa pálido con la línea media más oscura; segmentos interiores del perianto cerca de 5, casi obdeltoides, de 1 a 2.5 mm de longitud, de color rosa pálido; estambres 10 a 15, de color amarillo claro; estilo amarillento; lóbulos del estigma 3 a 4, amarillentos. **Fruto** claviforme, generalmente largo y angosto, de 3 a 12 mm de longitud y 1.5 a 5 mm de diámetro, sin escamas, rojo, sin conservar adheridos los restos secos del perianto. **Semillas** angostamente ovoides, de 1.5 a 2 mm de longitud, 1 mm de ancho y 0.8 mm de espesor; hilo largo, oblicuo, amplio y hundido; micrópilo en la porción aguda de las semillas; testa finamente reticulada; perisperma escaso; embrión corto, con los cotiledones apenas distinguibles (Bravo y Sánchez, 1991b; Hunt, 2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose

<b>REINO</b>	Plantae
<b>DIVISIÓN</b>	Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida Brongn.
<b>SUBCLASE</b>	Caryophyllidae Takht.
<b>ORDEN</b>	Caryophyllales Benth. & Hook. F.
<b>FAMILIA</b>	CACTACEAE Juss.
<b>GÉNERO</b>	<i>Epithelantha</i> F.A.C. Weber ex Britt. & Rose
<b>ESPECIE</b>	<i>micromeris</i> (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose

**Basionimio:**

*Mammillaria micromeris* Engelm., Proc. Amer. Acad. Arts 3: 260-261. 1856.

**Sinónimos:**

*Cephalomammillaria micromeris* (Engelm.) Fric, Zivot v Prirode 29: 9 1925

*Cactus micromeris* (Engelm.) Kuntze, Revis. Gen. Pl. 1:260. 1891.

**Nombre Común:** Biznaga blanca chilona, nido de golondrina y cactus de botón.

**Importancia de las cactáceas en la horticultura ornamental**

El comercio mundial de cactáceas ornamentales, genera un ingreso superior a los cuatro mil millones de dólares anuales. En México la producción es menor, generando anualmente un millón de plantas que representan un ingreso aproximado de 1.5 millones de dólares. Sin embargo, para las especies de los géneros; *Epithelantha*, *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphantha*, *Disocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus* y *Turbinicarpus* la producción de plantas no supera el 5% de dicho volumen, por lo que es necesario atender este nicho de mercado nacional e internacional (Villavicencio *et al.*, 2010).

Por lo peculiar de sus flores, formas, hábitos de crecimiento, tipo y forma de espinas así como su resistencia a la falta de agua hace de las cactáceas un grupo muy demandado en horticultura ornamental mundial.

La fascinación que existe por las cactáceas como plantas de ornato es una de las razones por la cual se les considera como uno de los grupos más amenazados de la flora mexicana (Glass, 1998; Espinosa *et al.*, 2003).

Los cactus ornamentales son plantas de sol que se comercializan con propósitos decorativos como plantas de maceta de interior o exterior; sin embargo, en viveros o invernaderos de plantas ornamentales donde se requiere de una propagación intensiva, es necesario que las especies de dominio público y sus variantes como es el caso de *E. micromeris* conserven sus caracteres morfológicos (forma de la planta, tamaño, color de la flor,

textura de los tubérculos, presentación de espinas, color de la pubescencia, etc.) para que la producción de plantas mantenga sus características de distinción, homogeneidad y estabilidad en forma continua durante el tiempo de su propagación tal como lo establece la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales) y los lineamientos del SNICS (Sistema Nacional Certificación de Semillas) (SNICS, 2001; Aboites y Martínez , 2005; UPOV, 2009).

### **Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) en cactáceas**

Los primeros estudios de cultivo *in vitro* en cactáceas fueron realizados por Minocha y Mehra (1974), quienes intentaron generar brotes adventicios de *Mammillaria woodsii* mediante la formación de callo a partir de yemas, plántulas y partes florales, sin obtener resultados positivos. Posteriormente, Mauseth y Halperin (1975) y Mauseth (1976), evaluaron el control hormonal durante la diferenciación, demostrando que los brotes adventicios de *Opuntia polyacantha* podían desarrollarse y crecer hasta formar una plántula. Por otra parte Clayton *et al.*, (1990) y Dabekaussen *et al.*, (1991) estudiaron los factores que afectan la activación de areolas en diferentes especies de esta familia botánica. En 2005 se logró la micropropagación en ocho especies y subespecies del género *Turbinicarpus* mediante el cultivo de yemas axilares en letargo (Dávila *et al.*, 2005). Los factores que inciden en la activación de areolas han sido reportados por Vyskot y Jara (1984), De La Rosa-Ibarra *et al.*, (1994), Giusti *et al.*, (2002) y Moebius-Goldammer *et al.*, (2003). Todos ellos han encontrado diferencias en la eficiencia del método de micropropagación, la cual se expresa en el número de brotes por explante.

Para la micropropagación de cactáceas se pueden usar como explantes yemas axilares contenidas en las areolas o mamilas procedentes de plantas de vivero (Vyskot y Jara, 1984; Escobar, 1985; Mohamed, 2002), campo (Clayton *et al.*, 1990) o de plántulas germinadas *in vitro* (Mata *et al.*, 2001; Olvera, 2008; Villavicencio *et al.*, 2009). Esta es una forma rápida de obtener plantas en cantidades suficientes para la producción intensiva de plantas de ornato de *E. micromeris* como se hace para otras especies ornamentales como las orquídeas, cuna de moisés (*Spathiphyllum*) y helechos (Sagawa and Kunisaki, 1990).

Dada la importancia ecológica y económica que tiene la especie *E. micromeris* como recurso fitogenético para las zonas semiáridas del Desierto Chihuahuense y para el sector ornamental, el cultivo de tejidos vegetales es un método de clonación que puede resultar eficiente, por lo que se desarrolló el presente protocolo de micropropagación, en el que se incluye la adición de un biofertilizante (*Azospirillum* sp.) en la etapa de enraizamiento *in vitro*. De este modo la micropropagación se ha convertido en una opción para multiplicar rápidamente variedades o especies que cuentan con pocos individuos o que tienen dificultades para propagarse por métodos convencionales, siendo una vía factible en cactáceas. Mediante el CTV se puede satisfacer la demanda de plantas, haciendo que la extinción de las que ahora se encuentran catalogadas como amenazadas sea menor, contribuyendo de este modo con el rescate y conservación de este recurso fitogenético.

La aplicación de la micropropagación tiene ventajas sobre los sistemas convencionales de propagación; sin embargo, es importante mencionar que estas ventajas dependen fuertemente de la infraestructura con que se cuente, del valor agregado que tenga en el mercado la especie que desea propagar, el nivel de producción que pretenda generarse y de factores inherentes al método como; la condición fitosanitaria de las plantas donadoras de inóculos o explantes (presencia de alguna enfermedad), la edad fisiológica (juvenil, maduro), deficiencias nutricionales, tamaño y tipo de tejido seleccionado como explante, los constituyentes del medio de cultivo, las condiciones de incubación, la interacción entre factores fisicoquímicos y eficiencia en el número de brotes generados/explante (Escobar, 1985; Villalobos y Thorpe, 1985).

### **Protocolo para la micropropagación de la biznaga blanca chilona (*Epithelantha micromeris*)**

Para la micropropagación de esta especie se consideraron las diferentes etapas descritas por Murashige (1974), Pierik (1987) y Moebius-Goldammer *et al.*, (2003), mismas que fueron evaluadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. La primera etapa es la de establecimiento, en donde las semillas se

desinfectan y germinan en un cultivo aséptico *in vitro* para obtener vitroplántulas asépticas. La segunda etapa es la de multiplicación, en donde se promueve la inducción de brotes a partir de explantes tomados de segmentos de epicotilos. La tercera es el enraizamiento, en donde se promueve la elongación de los brotes y la inducción de raíces para conformar una vitroplanta completa. La última etapa es la aclimatación, que se realiza *in vivo* en donde las nuevas plantas, se someten a un proceso de adaptación en invernadero.

Esta nueva forma de producción ofrece a los productores una nueva opción rentable para impulsar el desarrollo productivo ornamental en la región.

### Medio Nutritivo Base

El medio de cultivo que se utilizó en la micropropagación de *E. micromeris* es el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se complementa con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos, dependiendo de la etapa que se seleccione, ya sea el establecimiento el inóculo *in vitro*, multiplicación y enraizamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de *Epithelantha micromeris*.

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio
		Mg·L <sup>-1</sup>
<b>Macroelementos</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.40	1650
KNO <sub>3</sub>	101.11	1900
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.48	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	170
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	236.15	332
<b>Microelementos</b>		
IK	166.01	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	228.00	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.54	8.6



(cont...)

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio
		Mg·L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	239.93	0.025
<b>Quelatos</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	372.24	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.28	27.8
<b>Vitaminas</b>		
Acido Nicotínico	123.10	1
Piridoxina	205.60	1
Tiamina	337.30	4
Myoinositol	180.20	100
<b>Aminoácidos</b>		
Glicina	75.07	2.5
Acido nicotíco	238.30	12.5
<b>Medio de Cultivo</b>		
Sacarosa	342.30	30 g·L <sup>-1</sup>
Agar		6.0 g·L <sup>-1</sup>

### Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo

- 1) Pesar y disolver la cantidad de sacarosa en un vaso de precipitado que contenga la cuarta parte del volumen de agua destilada que se desea preparar de medio (Figura 2a).
- 2) Añadir el volumen correcto de cada una de las soluciones de microelementos, macroelementos quelatos, vitaminas, aminoácidos y la cantidad de fitohormonas que se requieran mezclar (Cuadro2, Figura 2b).
- 3) Mezclar estos componentes y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio (Figura 2c).

- 4) Introducir el electrodo del potenciómetro en la muestra, esperar que el aparato tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajarlo agregar algunas gotas de HCl 1N y para subirlo aplicar algunas gotas de NaOH (Figura 2d y e).
- 5) Colocar el medio en una parrilla para calentar y agregar el agar, mezclar hasta diluirlo, antes de ebullición.
- 6) Vaciar el medio en los recipientes, ya sean frascos, tubos o envases, tapar los recipientes y esterilizar por 20 minutos en autoclave, considerando una temperatura de 120 °C y 4 libras de presión (Figura 2f y g).
- 7) Ya esterilizados, los recipientes se colocan en un lugar limpio (Figura 2f).

## **Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales**

### **Etapa 1. Establecimiento del inóculo en un cultivo aséptico**

En esta etapa se establece *in vitro* un explante estéril en un medio de cultivo aséptico. Es la etapa más crítica y de gran importancia en el proceso de regeneración, porque en esta interactúan diferentes factores que determinan su éxito, como la contaminación endógena o exógena causada por bacterias y hongos (Hubstenberger *et al.*, 1992; Papafotiou *et al.*, 2001). Este efecto puede evitarse si se realiza una buena desinfección con agentes desinfectantes, los cuales no deben ser tóxicos, ya que estos pueden inhibir la germinación o, la brotación de yemas.

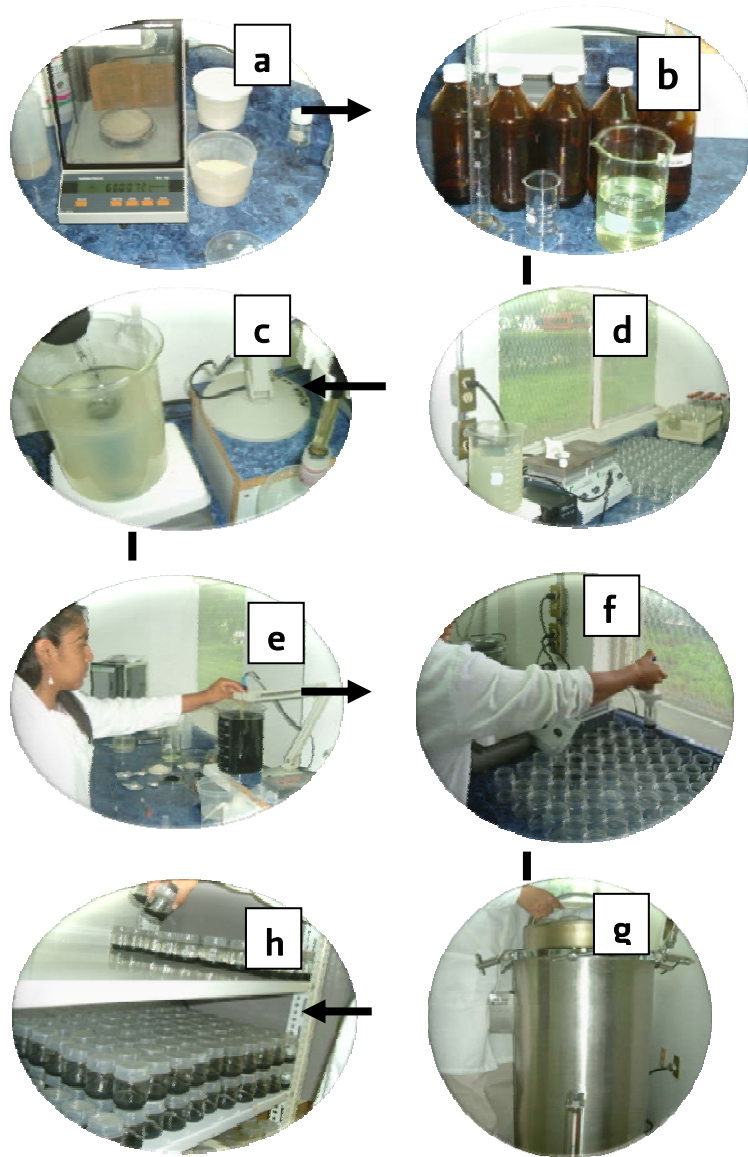


Figura 2. Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de la biznaga blanca chilona (*Epithelantha micromeris*) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).

### **Semillas como fuente de inóculo**

Preferentemente se utilizan semillas de cosecha reciente. Estructuralmente las semillas de *E. micromeris* están formadas por un embrión, material de reserva y tejidos de protección. Estos tegumentos forman una cubierta cerosa protectora llamada testa que es impermeable al paso del agua. Como ocurre con todas las especies de propagación sexual, la germinación de cactáceas consiste en la reanudación del crecimiento del embrión, el cual ha permanecido en estado latente (Araya *et al.*, 2000; De La Rosa y García, 1994; Hernández y Godínez, 1994 y Ordoñez, 2003).

Para la desinfección de las semillas de *E. micromeris* se requiere considerar el tiempo de inmersión y concentración de agentes desinfectantes, de acuerdo al siguiente protocolo (Cuadro 3 y Figura 3).

Cuadro 3. Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de *Epithelantha micromeris* utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

<b>PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN</b>
-Lavar con agua estéril y detergente líquido por 5 min. -Sumergir en alcohol 70 % por 6 min. -Sumergir en Hipoclorito de sodio al 100 % (6% concentración comercial) por 5 min más unas gotas de Tween 20 al 20 %. -Enjuagar cinco veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. -Sembrar las semillas en tubo o frasco con 5 y 15 mL de medio respectivamente.

(Villavicencio *et al.*, 2009).

La técnica de desinfección de las semillas permite obtener una eficiencia en el establecimiento *in vitro* del 99%. Esto equivale a obtener 1 tubo contaminado por bacterias u hongos por cada 100 tubos establecidos.

El protocolo de desinfección es satisfactorio porque elimina partículas de polvo y microorganismos, sin provocar un daño en la consistencia de la testa y necrosis del micrópilo, lo que puede llegar a impedir la emergencia de la radícula y en caso extremo matar al embrión.



Figura 3.- Protocolo para el establecimiento de semillas de cactáceas en un cultivo aséptico. a) Envolver las semillas en sacos de tela. b) Lavar con agua estéril y detergente. c) Lavar con una solución de etanol al 70 % por 5 min. d) Lavar con hipoclorito de sodio al 20 % + Tween al 20 % por 5 min. e) Enjuagar con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar. f) Eliminación del saco de tela. g) Colocar en caja petri para su secado en la Campana de Flujo Laminar y establecer las semillas en tubo o frasco con 5 y 15 mL de medio respectivamente.

El tiempo de inmersión utilizado, así como la concentración de hipoclorito de sodio, etanol y el uso de agua destilada estéril favorecen el proceso de desinfección de estas semillas, por lo que ambos factores tienen que considerarse en este proceso, como también han sido referidos por Mauseth (1979), Hernández y Godínez (1994) y Villegas (1996) (Figura 3).

### **Germinación *in vitro* de *Epithelantha micromeris***

Después de desinfectar las semillas de esta especie, se promueve su germinación *in vitro*, utilizando un medio base para la germinación (MBG) adicionado con el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% o elaborado con 6% agar + 3% de sacarosa, ambos tipo de medio se combinaron con o sin aplicación de ácido giberélico ( $AG_3$ ) como promotor de la germinación, aplicando una concentración de  $8.65 \mu M$  de  $AG_3$  por litro de medio de cultivo. De este modo se evaluaron en la germinación *in vitro* cuatro tipos de medio MBG; T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%; T2= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% +  $8.65 \mu M$  de  $AG_3$ ; T3= MBG adicionado con 6% agar + 3% de sacarosa; T4= MBG adicionado con 6% de agar + 3% de sacarosa +  $8.65 \mu M$  de  $AG_3$ .

Las semillas de *E. micromeris* se colocan en tubos de ensaye, con un volumen de 5 mL de medio base para la germinación (MBG) respectivo. Durante 42 días se registro cada semana el porcentaje de germinación (PG) y la velocidad de emergencia (VE), con el fin de evaluar la influencia que tienen los nutrientes y las fitohormonas ( $AG_3$ ) en el proceso de germinación *in vitro*.

**Porcentaje de germinación (PG).** En condiciones *in vitro* las semillas de *E. micromeris* requieren de un MBG compuesto por las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% (T1) para promover las tres fases de la germinación (Absorción de agua, transformaciones metabólicas-hidratación de enzimas y emergencia de radícula y posteriormente de la plúmula), obteniendo un PG máximo del 60%, porcentaje que supera a su homólogo con adición de  $AG_3$  (T2= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% +  $8.65 \mu M$  de  $AG_3$ ), lo que muestra que esta especie no requiere de giberelinas para promover la emergencia de las vitroplantas.

Cuando se compara el efecto del medio MBG T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%), con el medio MBG sin sales nutritivas con y sin  $AG_3$  (T3 y T4), se muestra que en estos últimos el PG es menor (37%), en cambio con el MBG T1 se duplica la emergencia de las vitroplántas.

Estos resultados muestran que la combinación de ambientes controlados (temperatura de 26 °C y un fotoperíodo de 16 h luz) junto con un MBG favorecen la germinación *in vitro* de esta especie, que estructuralmente está conformada por semillas con testa delgada que sólo requieren de condiciones ambientales favorables (humedad, temperatura, luz y aireación) para promover su germinación, debido a que existe una fuerte relación entre la ultraestructura de la semilla y el proceso germinativo (Besnier, 1989; Buxbaum, 2000). Por lo que los componentes del medio de cultivo son importantes, para que la cubierta de la semilla se rompa y emerja una nueva vitroplántula, como lo refieren (Malda *et al.*, 1999; Kauth *et al.*, 2006 y Dutra *et al.*, 2008).

La reducción de la fuerza iónica del medio de cultivo al bajar la concentración de las sales al 50% se ha realizado en otras cactáceas (*Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton et Rose, para favorecer el metabolismo celular de la semilla, activar el crecimiento del embrión y el proceso enzimático de los tegumentos, por lo que el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% utilizado en la germinación de la biznaga blanca chilona, nido de golondrina o cactus de botón como se le conoce a la especie *E. micromeris* resulto un medio de cultivo efectivo.

**Velocidad de emergencia (VE).**- De los diferentes medios evaluados en la germinación, se determinó que el MBG (T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%) registra desde los primeros siete días de incubación una mayor VE, esta tendencia se mantiene hasta los 42 días de la evaluación, mostrando que los nutrimentos de este medio favorecen el proceso de germinación y la emergencia de las vitroplantas.

El ácido giberélico como promotor de la germinación no tuvo un efecto significativo en la VE tanto en el MBG T2= MS 50X+8.65  $\mu$ M de  $AG_3$  y el

medio T4= MBG adicionado con 6% de agar+ 3% de sacarosa + 8.65  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ , mostrando que desde los primeros 14 días de incubación el  $\text{AG}_3$  exógeno no influye significativamente en la VE, a diferencia de las semillas establecidas en el T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, en donde los niveles endógenos de  $\text{AG}_3$  de las semillas permiten activar los procesos enzimáticos (Figura 4).

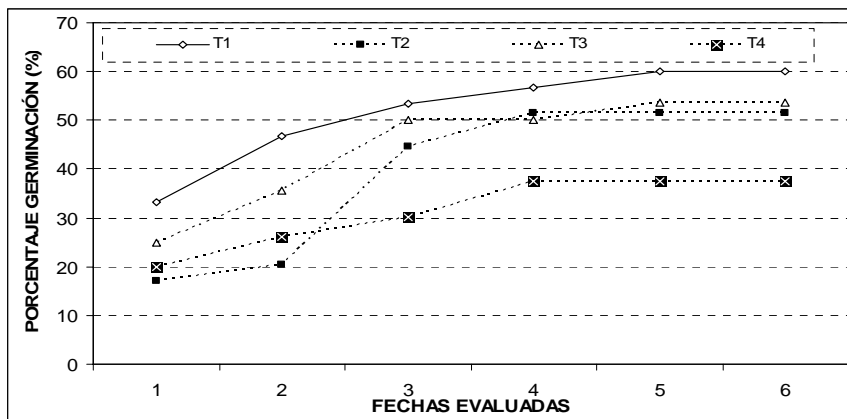


Figura 4. Velocidad de germinación de *E. micromeris* en diferentes medios de cultivo MBG (T1= MS 50X; T2= MS 50X+8.65  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ ; T3= 0.6% agar y 87.64 mM de sacarosa; T4= 0.6% agar + 87.64 mM de sacarosa + 8.65  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ ).

La VE de *E. micromeris* es más corta que la registrada para otras especies de cactáceas como las del género *Ariocarpus*, pero más larga si se compara con semillas de hortalizas (cilantro, tomate), así como de algunas especies forestales (*P. cembroides*).

El mismo efecto también se ha reportado con *Melocastus caesius* H. L. Wendl., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Britton et Rose y otras especies de *Mammillaria*, en donde las giberelinas no promueven la germinación (Araya et al., 2000; Rojas, 2008).

## Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes (MIB)

En esta etapa se utiliza un medio para la inducción de brotes (MIB) elaborado con los componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con una relación citocinina-auxina 10:1 en diferentes niveles de concentración. En el MIB se pueden utilizar dos tipos de citocininas: 6-



bencil aminopurina (BA) y cinetina (Kin). Estas se evaluaron en diferentes niveles de concentración; (T1=0.5, T2=0.7, T3=0.9, T4=1.1, T5=2.2, T6=3.3, T7=4.4, T8=0.7, T9=1.1, T10=2.2 y T11=3.3 mM de BA) y (T12=0.5, T13=1.2, T14=2.3, T15=3.5 y T16=4.6 de mM de Kin), combinadas con su proporción correspondiente de auxina; índole-3-butyric acid (AIB) y 1-naphthaleneacetic acid (ANA), (T1=0.04, T2=0.06, T3=0.81, T4=1.03, T5=2.07, T6=3.1, T7=4.13, T12=0.41, T13=1.03, T14=2.07, T15=3.31 y T16=4.13  $\times 10^{-1}$   $\mu$ M de AIB), (T8=0.15, T9=0.25, T10=0.5 y T11=0.75  $\times 10^{-1}$   $\mu$ M de ANA). De este modo se evaluaron dieciséis tratamientos en el MIB incluyendo un tratamiento sin fitohormonas (T0).

En el MIB con el tratamiento de fitohormonas respectivo se establecieron segmentos de epicotilo como explante obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*, estos explantes se colocaron en frascos Gerber® de 70 mL de capacidad, con un volumen de 20 mL de medio de cultivo e incubaron a una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , considerando un fotoperíodo de 16 h luz.

Los explantes se incubaron por ocho semanas, tiempo requerido para obtener brotes de las yemas axilares. El número de brotes (NB) de cada explante se cuantificaron previo al siguiente subcultivo, determinando también la altura (A) de los mismos en milímetros (mm).

**Inducción de brotes. (IB).** Al analizar los tratamientos en la prueba de medias ( $P \leq 0.05$ ) como efectos independientes se determinó que la interacción Kin-AIB en relación 10:1, tiene un efecto positivo en la multiplicación *in vitro*, siendo el MIB adicionado con el tratamiento T13= 1.2 mM de KIN + 1.03  $\mu$ M de AIB y T16= 4.6 mM de KIN + 4.133  $\mu$ M de AIB los que generan la mayor tasa de multiplicación hasta de 15 brotes/explante. Este volumen de producción es significativo para la regeneración de esta especie.

El MIB con la interacción BA-AIB o BA-ANA tiene un efecto menor en la inducción de brotes que el MIB con la interacción Kin-AIB, generando en promedio hasta 12 brotes/explante, independientemente de la auxina que se utilice. Este efecto se obtiene con la combinación del MIB adicionado

con el tratamiento T4= 1.1 mM de BA + 1.03  $\mu$ M de AIB ó con el T9= 1.1 mM de BA + 0.5  $\mu$ M de ANA, lo que muestra que la concentración citocinina-auxina en relación 10:1 es positiva para la inducción de brotes; aunque su efecto depende del tipo de fitohormona que se utilice.

Al aplicar al MIB la citocinina en concentración de 1.1 y 2.2 mM de BA se obtiene el mismo efecto, independientemente de la combinación de auxina que se utilice, siendo los tratamientos T4 y T9 así como el T5 y T10 estadísticamente iguales, generando en promedio 12 y 10 brotes/explante respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tasa de multiplicación de *E. micromeris*.

Tratamientos	Concentración				NB	A(mm)
	mM		$\mu$ M			
	BA	KIN	AIB	ANA		
0	0	0	0	0	1.22 f	2.15g
1	0.5		0.04		10.44 bc	4.46 c
2	0.7		0.06		10.82 abc	5.97 b
3	0.9		0.81		5.83 de	7.35 a
4	1.1		1.03		11.24 abc	3.44 d
5	2.2		2.07		10.17 bc	2.81 ef
6	3.3		3.1		7.27 cde	2.15 g
7	4.4		4.13		7.89 cd	2.44 fg
8	0.7			0.15	10.26 bc	5.62 b
9	1.1			0.25	12.50 ab	2.35 fg
10	2.2			0.5	10.33 bc	2.78 ef
11	3.3			0.75	11.33 abc	2.75 f
12		0.5	0.41		3.54 ef	4.87bc
13		1.2	1.03		14.81 a	3.43 d
14		2.3	2.07		13.00 ab	3.35 de
15		3.5	3.31		5.83 de	3.04 de
16		4.6	4.13		14.78 a	3.25 de
				DMS	1.23	1.1
				r <sup>2</sup>	0.63	0.43
				CV	11.46	19.66
				Media	9.48	3.75

Valores con la misma letra dentro de columna no difieren significativamente (Tukey P 0.05).

NB= Número de brotes; A=Altura

Un efecto opuesto se obtuvo con el MIB sin fitohormonas el que registró una baja regeneración de brotes (1.2 brotes/explante), lo que muestra que los explantes de *E. micromeris* cuentan con la totipotencia para inducir esta respuesta morfogénicas; sin embargo, esta tasa de multiplicaron no es eficiente en cuanto a volumen de producción (Cuadro 4).

Estos resultados muestran que la interacción citocinina-auxina es efectiva en la organogénesis directa como también se ha encontrado con

otras especies de cactáceas mexicanas, como lo refieren Mata *et al.*, (2001) y Pérez *et al.*, (2002) y, quienes utilizaron de 8.8 a 13.31 mM de BA + 0-2.6  $\mu$ M de ANA en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para multiplicar una especie del género *Epithelantha*.

**Altura de brotes (A).**- Cuando se aplica al MIB la misma concentración 10:1 de bencil aminopurina (BA) en interacción con AIB o ANA como en los tratamientos T2=0.7 mM de BA + 0.06  $\mu$ M de AIB y T8=0.7 mM de BA + 0.15  $\mu$ M de ANA se obtiene la misma cantidad de brotes (10 brotes/explante) con una altura de (6 mm) este tamaño es mayor a la altura de los brotes obtenidos con los tratamientos T13 y T16 en donde se generó el mayor número de brotes (15 brotes/explante), con la diferencia que estos fueron de menor tamaño (3 mm). Con el tratamiento T3= 0.9 mM de BA + 0.81  $\mu$ M de AIB se obtiene la mayor altura de brotes (7.3 mm); sin embargo, en número de brotes es bajo (6 brotes/explante).

Estos resultados muestran que la interacción citocinina-auxina es efectiva en la organogénesis directa de esta especie y que tiene influencia tanto en el número como en la altura de los brotes (Cuadro 4 y Figura 5).



Figura 5. Brotes obtenidos en la etapa de multiplicación de *E. micromeris*.

Este efecto es similar al reportado por Velázquez y Soltero (2001), quienes encontraron que las fuentes de citocinina (Kinetina y ZIP) presentaron efectos altamente significativos sobre la producción de brotes de *Epithelantha micromeris* var. *micromeris*. Así mismo Corneanu *et al.*, y

Dabekausen *et al.*, (1991), mencionan que la citocinina BAP es un componente esencial para la activación de areolas, lo que permite llevar a cabo la micropropagación de *Sulcarebutia alba* y *Mammillaria*.

En la etapa de multiplicación de *E. micromeris* (Engelm.) el control hormonal influye en la diferenciación del explante como lo refiere Mauseth (1976; 1979), mostrando que la regeneración de brotes *in vitro* de esta cactácea es posible a partir de yemas axilares como también ha sido reportado para otras especies de cactáceas por Choreño *et al.*, (2002) en *Cephalocereus seniles* y Thomas y Hamerska (2010) en *Mammillaria albicoma*.

La multiplicación *in vitro* de *E. micromeris* (Engelm.) está influenciada por un MIB adicionado con fitohormonas. Con un MIB adicionado con 0.7 mM de BA + 0.06 µM de AIB (T2) o con 1.2 mM de KIN + 1.03 µM de AIB (T13) se puede obtener una tasa de multiplicación exponencial de 1:11:11:11 hasta 1:15:15:15. Este volumen de producción es significativo para la regeneración de esta especie y permite incrementar rápidamente el número de plantas en comparación con el método tradicional de propagación, por lo que se puede utilizar para la micropropagación de esta especie. Esta tasa de multiplicación supera a la registrada en otras especies de cactáceas mexicanas como *Mammillaria voburnensis* Scheer y *Mammillaria elongata* DC. (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002; Ordoñez, 2003).

Los brotes obtenidos posteriormente se subcultivan en medio fresco MS, en envases de polipropileno con capacidad de 500 mL y con un volumen de 50 mL pero sin fitohormonas (Figura 6).

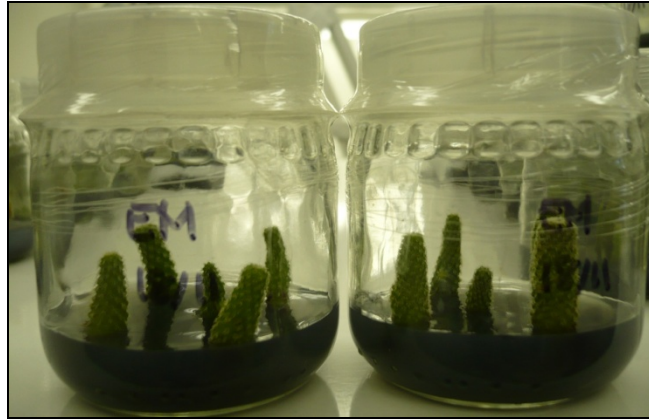


Figura 6. Brotes subcultivados en la etapa de multiplicación de *E. micromeris*

### Etapa 3 enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia pues el objetivo es producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que les permitan sobrevivir a las condiciones de trasplante a suelo (Ramírez, 2008; Villavicencio *et al.*, 2006b; Carletti *et al.*, 2003). En esta etapa se pretende mejorar el proceso de enraizamiento al aplicar un biofertilizante con ingrediente activo de *Azospirillum* sp., para la formación del sistema radicular y su desarrollo para lograr su aclimatación al hacer la transferencia de las vitroplantas a condiciones de vivero o invernadero.

En esta etapa se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% adicionado con *Azospirillum* sp. en tres niveles de concentración. T1=0.7x10<sup>6</sup> UFC/ ml<sup>-1</sup>, T2=1.5x10<sup>6</sup> UFC/ ml<sup>-1</sup>, T3=3x10<sup>6</sup>UFC/ ml<sup>-1</sup>. Evaluando en total tres tratamientos, incluyendo un control sin la aplicación de la cepa de *Azospirillum* sp. (Testigo).

Estas concentraciones se aplicaron a los envases de polipropileno con los brotes de *E. micromeris*, obtenidos en la etapa anterior e incubaron durante ocho semanas, a una temperatura de 26 ± 1°C, considerando un fotoperíodo de 16 h luz, evaluado al final del proceso el incremento en la altura del tallo (IAT), número (NR) y longitud radicular (LR) en centímetros (cm).

## Preparación de la concentración

Este biofertilizante se puede aplicar en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o su equivalente en gramos/litro.

Para obtener la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la cepa de *Azospirillum* sp. que se requiere pesar el biofertilizante y diluirlo en agua destilada estéril. Este se aplica a los envases con agar a las dos semanas después de realizado el subcultivo de los brotes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Requerimientos de biofertilizante durante la micropropagación *in vitro* de plántulas de *E. micromeris*.

	Concentración*	Aplicaciones/ Semana ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
		1	2
T1	$0.7 \times 10^6$ UFC/ $\text{mL}^{-1}$	1.4	2.9
T2	$1.5 \times 10^6$ UFC/ $\text{mL}^{-1}$	2.9	5.8
T3	$3.0 \times 10^6$ UFC/ $\text{mL}^{-1}$	5.8	11.6

\*Concentración calculada utilizando un biofertilizante que contenga 500 millones de bacterias de *Azospirillum*/g

**Incremento en altura del tallo (IAT).**-Con el tratamiento T2= MS (1962) al 50% +  $1.5 \times 10^6$  UFC/ $\text{ml}^{-1}$  y T3= MS (1962) al 50% +  $3.0 \times 10^6$  UFC/ $\text{ml}^{-1}$  se obtuvo un efecto positivo en el IAT generando al final del proceso de enraizamiento plantas con altura de 2 y 3 cm, mostrando que la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) aumenta la altura del tallo, a diferencia del testigo sin la inoculación de la cepa, en donde el IAT resultó menor a 1.4 cm (Cuadro 6).

Cuadro 6. Influencia de *Azospirillum* sp. en el incremento de altura de tallo, longitud de raíz y número de raíces de *E. micromeris* durante la cuarta semana de micropropagación.

TRATAMIENTOS	IAT	LR	NR
	(cm)	(cm)	
Testigo	1.41 c	1.63 c	4 c
T1	1.9 c	1.90 b	7 b
T2	3.1 a	2.30 a	9 a
T3	2.65 b	1.90 b	8 ab
DMS	0.22	0.41	0.41

Medias con letras iguales entre columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

IAT = incremento en altura de tallo; NR = número de raíces; LR = longitud de raíz; Testigo= Medio de cultivo sin inoculación. T1=  $0.7 \times 10^6$  /  $\text{ml}^{-1}$  UFC, T2=  $1.5 \times 10^6$  /  $\text{ml}^{-1}$  UFC, T3=  $3.0 \times 10^6$  UFC/  $\text{ml}^{-1}$ . DMS = Diferencia mínima significativa.

**Número de raíces (NR).**- El tratamiento T2= MS (1962) al 50% +  $1.5 \times 10^6$  UFC/ml<sup>-1</sup> y T3= MS (1962) al 50% +  $3.0 \times 10^6$  UFC/ml<sup>-1</sup> fueron estadísticamente iguales generando al final del proceso el mayor NR (8.5 raíces/planta), a diferencia del testigo del que se obtuvo la mitad de este número (4 raíces/planta). Estos resultados muestran que las mayores concentraciones del biofertilizante de *Azospirillum* sp. promueven un efecto simbiótico entre la planta y la bacteria (Cuadro 7).

Con estos resultados se muestran que *E. micromeris* requiere de una concentración  $1.5 \times 10^6$  UFC/ ml<sup>-1</sup>, para promover el efecto rizogénico, lo mismo ocurre al aplicar la misma concentración en el enraizamiento *ex vitro*, de *Turbinicarpus knuthianus* generando un total de 6 raíces/planta (Villavicencio *et al.*, 2011).

**Longitud de raíces (LR).**- Con el tratamiento T2= MS (1962) al 50% +  $1.5 \times 10^6$  UFC/ml<sup>-1</sup> se generó al final del proceso la mayor LR (2.3 mm); a diferencia de los tratamientos T1 y T3 que fueron estadísticamente iguales, registrando una LR de 1.9 cm en promedio (Cuadro 7 y Figura 7).

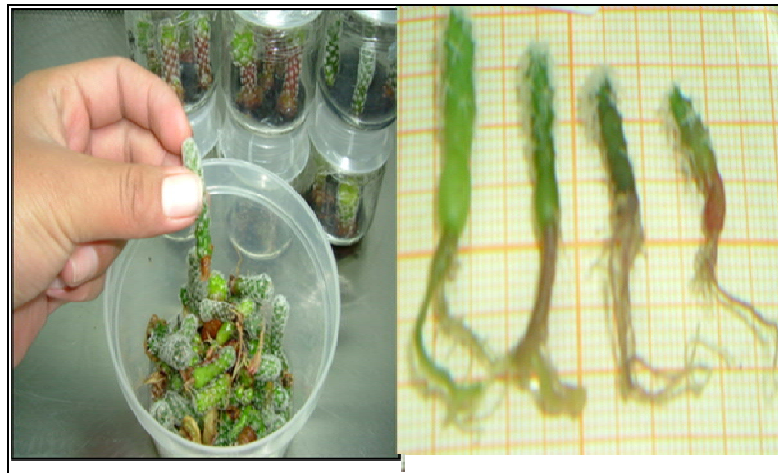


Figura 7. Efecto de *Azospirillum* sp. en el proceso rizogénico de *E. micromeris* en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

Los resultados obtenidos en el enraizamiento *in vitro* de *E. micromeris* muestran que la simbiosis entre la planta y la bacteria favorecen la

producción de hormonas de crecimiento, cambios morfológicos y fisiológicos en estas plantas, mismas que a su vez promueven, en menor tiempo, el desarrollo de raíces con mayor crecimiento, como lo refieren Puentes y Bashan, (1993) y Burdman *et al.*, (2000).

El efecto rizogénico de la cepa *Azospirillum* sp. inoculada en una concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC L<sup>-1</sup> de es similar al reportado para otras especies como *P. pringlei* en donde la inoculación de la cepa incrementó el peso fresco de la planta hasta un 60% y la longitud de las raíces en un 100%. Para el caso de *E. micromeris* se determinó que la bacteria invadió el sistema radical del cactus, durante las seis semanas de incubación, considerando este tiempo como el período para el enraizamiento *in vitro* para esta especie.

#### **Etapa 4 Aclimatación**

##### **Manejo de las vitroplantas**

Se recomienda que las vitroplantas se laven cuidadosamente para eliminar restos de agar en la raíz, si es posible es necesario clasificarlas por tamaño. Estas plantas se sumergen en una solución fungicida (Benomyl) con el fin de proveerlas de defensas contra los microorganismos patógenos comunes del suelo al que serán trasplantadas. Se recomienda mantener una humedad relativa alta (80 – 90 %) durante la primera y segunda semana de aclimatación, posteriormente espaciar los riegos y proporcionar más luz, para promover un crecimiento autotrófico.

Esta es la etapa crítica de la micropropagación, porque se requiere pasar de las condiciones herótrofas del cultivo *in vitro* a la condición autótrofa *in vivo*, es decir el trasplante a suelo en donde se requiere asegurar el mayor número de plantas como producto terminado con alta calidad fitosanitaria. En la etapa de aclimatación es donde existe mayor demanda hídrica que puede ocasionar un estrés hídrico, por tal razón es importante considerar el ambiente y sustrato en que se trasplanten.

Para la aclimatación de *E. micromeris* se utilizó un sustrato estéril a base de corteza de coco y agrolita en relación 1:2. Las plántulas se trasplantaron en este sustrato aplicando riegos cada tercer día durante las dos primeras



semanas, logrando la aclimatación de las plántulas a los 40 días siguientes (Figura 8).

**Sobrevivencia.**- Las plantas enraizadas *in vitro* de cada tratamiento fueron aclimatadas en el sustrato descrito existiendo diferencias significativas en la sobrevivencia. Las plantas que fueron inoculadas con la cepa T2 registraron en la aclimatación un porcentaje de supervivencia superior al 91 %, a diferencia de las plantas que fueron enraizadas *in vitro* con el tratamiento T1 y T3, las cuales que registraron un 82% de sobrevivencia, el porcentaje mas bajo se obtuvo con las plantas sin la aplicación de la cepa *in vitro* (72 %).

Esto muestra que la etapa de endurecimiento o aclimatación de *E. micromeris*, depende de las etapas anteriores de la micropropagación porque en el cultivo *in vitro* se promueve una respuesta morfogénica, mientras que en la aclimatación se reconstruyen y desarrollan los procesos adaptativos de la planta como lignificación de las cubiertas cuticulares, activación de estomas y órganos fotosintéticos para que éstas plantas puedan tener un desarrollo autónomo, como también lo refieren Pacovsky, (1985) y Puente y Bashan, (1993) les permita controlar la transpiración y activar su aparato fotosintético generando sus propios carbohidratos.

De este modo el protocolo de micropropagación y aclimatación de *E. micromeris*, muestra que pueden producirse vitroplantas de esta especie y que estas se pueden adaptar a las condiciones hetero-mixotróficas a las que están expuestas durante este proceso, requiriéndose de ocho meses para la obtención de vitroplantas y plantas aclimatadas en invernadero (Figura 8).

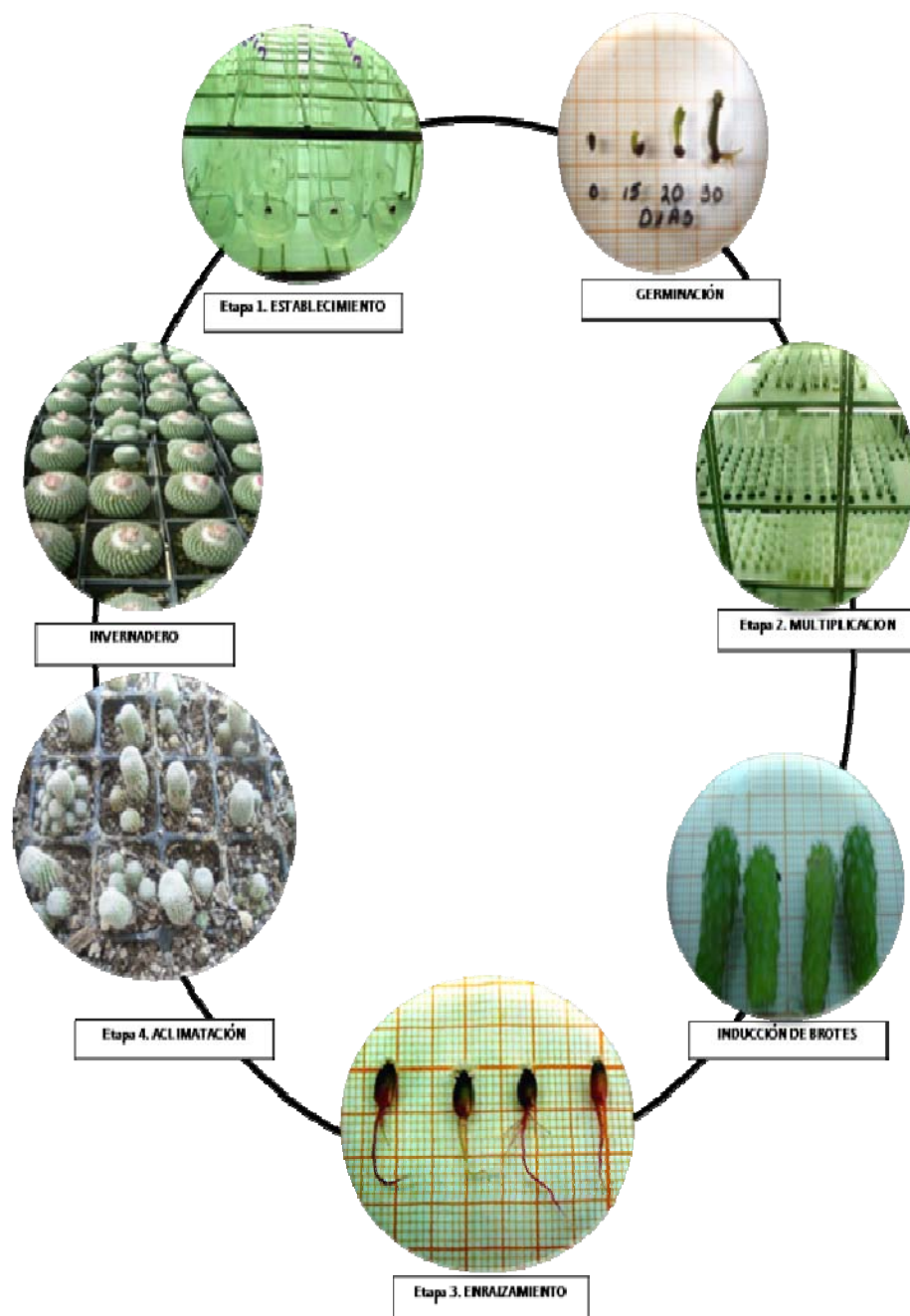


Figura 8. Esquema de la micropropagación de *Epithelantha micromeris*.

## Conclusiones

La micropropagación es un método factible para regenerar especies en estatus de riesgo como la Biznaga blanca chilona, nido de golondrina o cactus de botón como se le conoce a la especie *Epithelantha micromeris*.

Este protocolo involucra cuatro etapas (Establecimiento, Multiplicación, Enraizamiento y Aclimatación), en las cuales se pueden producir vitroplantas de esta cactácea de tamaño uniforme y con buena calidad fitosanitaria, que en conjunto implican un período de ocho meses para la obtención de vitroplantas y plantas aclimatadas en invernadero.

Mediante el cultivo de tejidos vegetales y el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal como las rizobacterias se pueden optimizar los procesos biológicos en especies de importancia ecológica y económica.

Esta tecnología puede aplicarse en laboratorios e invernaderos comerciales con registro dedicados a la producción de plantas de ornato que se localizan en Coahuila, Morelos, Jalisco, Estado de México, San Luis Potosí y Nuevo León.

## Literatura citada

- Aboites M., G. y F. Martínez G. 2005. La propiedad intelectual de variedades vegetales en México. Revista Agrociencia. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 39(2):237-245
- Anderson, E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland, Oregon. 776 p.
- Araya E., L. Gómez, N. Hidalgo y R. Valverde. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminatay*) Agronomía Costarricense 24(1): 75-80.
- Aldete, M., J. da Fonseca, M. Magali V. da Silva W. y A. Celso C. 2006. El Estado del Arte de los Recursos Genéticos en las Américas: Conservación, Caracterización y Utilización del Procitropicos con el apoyo de la Secretaría Técnica de FORAGRO en el Área Tecnología e Innovación de la Dirección de Liderazgo Técnico y Gestión del Conocimiento del IICA y desarrollado en el ámbito de las Líneas de Acción del FORAGRO: Desarrollo de la Agenda Regional de Investigación y Desarrollo Tecnológico y Temas Prioritarios del Foro, respectivamente 61p. (Disponible En:

- [www.iica.int/foragro/cd\\_prior/ Docs / RecFitog](http://www.iica.int/foragro/cd_prior/Docs/RecFitog). (Consulta: 13 de noviembre de 2010).
- Bárcenas, L., T. R. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. In: Biodiversitas 68: Certificación de cactáceas mexicanas amenazadas en apoyo a la conservación de cactáceas desérticas. 11-15 pp.
- Barthlott, W. 1979. Cacti. Stanley Thornes (Publishers). 249 p.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas Biología y Tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 637p.
- Bravo-Hollis H., y H. Sánchez-Mejorada. 1991a. Las cactáceas de México. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 404p.
- Bravo-Hollis H., y H. Sánchez-Mejorada. 1991b. Las cactáceas de México. Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 743p.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. México. Fondo de Cultura Económica. 233 p.
- Britton, N. L. and J. N. Rose. 1963. The cactaceae. Description and illustrations of plants of the cactus family. Vols. I y II: 3-8, Vols. III y IV: Devor Publications. New York. pp:181-185.
- Burdman S., Y. Okon and E. Jurkevitch. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Critical Reviews in Microbiol., 26: 91-110.
- Buxbaum, F. 2000. Morphology of cacti Section III. Fruits an seed. Abbey Garden Press. Pasadena. U. S. A.
- Carletti S. M., E. Rodríguez C. A. y E. Llorente B. 2003. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la micropropagación de plantas. In: Microbiología Agrícola. Albanesi, A., Anriquez, A., Luna, S., Kunst, C. y Ledesma, R. (Editores). Un aporte de la investigación Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Ciudad Santiago del Estero. Argentina. 119-129 pp.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. Phillips C. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 115(2):337-343.
- CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 157-288pp.

- CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 1990. Apéndices I y II and III to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. U.S. Fish and Wildlife Service. U.S. Department of the Interior. Washington, D. C. 25pp.
- CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 1994. Resolution Conference 9.19. Guidelines for the registration of nurseries exporting artificially propagated specimens of Appendix I species, adopted by the Ninth Meeting of the Conference of Parties to the Convention on International Trade in Endangered Species, Fort Lauderdale, Fl. 30p.
- Choreño T., J. M., R. González H., T. Terrazas-Salgado., L. Hernández A. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. Revista Chapingo. Serie Horticultura 8 (2): 183 - 196 p.
- Corneanu, M. M., G. C. Corneanu and S. N. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. *In: Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Abs. No. A3-66:99.
- CRGAA, 2011. Segundo informe del estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo. ISBN978-92-5-306534-9. FAO. Roma, Italia 372p.
- Dabekaussen, M. A. A.; R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba*. Rausch. Hor. Sci., 46:283-294.
- Dávila, F. C. A., De La Rosa, C. M. L., Pérez, M. B. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41: 540-545.
- De La Rosa, I. M., García H. 1994. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. *Phyton-Int. J. Exp. Bot.* 56: 147-150.
- Dixon, R.A. 1985. Plant cell culture: a practical approach. IRL Press. at Oxford University. Press. 236 p.
- Dutra D., R. Timothy J., P. J. Kauth, L. Scott S., M. E. Kane and L. Richardson 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened

- terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 94: 11–21.
- Escobar H., A., 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 80 p.
- Espinosa, A., González, H. Mejía, J. 2003. Plantas nativas de México con potencial ornamental. La comercialización de plantas en peligro de extinción. Universidad Autónoma Chapingo. AMEHOAC (Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental, A.C) 2160. 297p.
- Glass, C. E. 1998. Guía para la identificación de Cactáceas amenazadas de México. Ed. Cante. México D. F. 137p.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci. Hort.*, 95(4): 319-332.
- Guzmán, U., A. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM., CONABIO. ISBN 970-9000-20-9. México, D. F. 315 p.
- Hernández, H. M. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Herbario Nacional. Instituto de Biología, UNAM. [http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta.26\(33-52\).pdf](http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta.26(33-52).pdf). (2 Mayo 2009).
- Hubstenberger J. F. P., W. Clayton and G. Phillips C. 1992. Micropropagation of Cacti (Cactaceae). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 20. High-Tech and Micropropagation IV. Y P S Bajaj (EdS). Springer-Verlag, Berlin. 49pp.
- Hunt, D. 2006. *The New Cactus Lexicon. Descriptions & Illustrations of The Cactus Family*. Compiles and edited by members or the International Cactaceae Systematic Group. England. Editorial. 899p.
- Kauth J. P., A. Wagner V. and E. Michael Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 85(1): 91-102.
- Leszczyńska, H. 1991. Potencial genético ornamental de la tierra mexicana. *Manual de Horticultura Ornamental*. Vol. 5. FALTAN PAG
- Malda, G., H. Suzan, R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci. Hort.*, 81(1):71-87.

- Mata, R. M., Monroy-De La Rosa, M., Goldammer, K.M., Chávez-Ávila, V.M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *in vitro Cellular and Devl. Biology-Plant*, 37: 400-404.
- Mauseth, D. J. and W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polycantha* Cactaceae. *Amer. J. Bot.*, 62(8): 869-877.
- Mauseth, D. J. 1976. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems *In: Opuntia polycantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.*, 63 (10): 1295-1301.
- Mauseth, D. J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. and Succ. J.*, 51: 186-187.
- Mauseth D., J. 2004. Th estructure of phtoshynthetic succulent stems in plants other than cacti. *J. Plant. Sci.*, 165 (1): 1-9.
- Minocha, C. S. and P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria profilera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.*, 61 (2):168-173.
- Mohamed, Y. Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose), *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 38(5):427.
- Moebius-Goldammer K., M. Goldammer, R. Mata M., V. Chávez M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cellular and Devl. Biology-Plant*, 39(4): 388-393.
- Montaño M., C.; F. Vega V. y H. Nolasco S. 1993. Aspectos ecológicos y económicos de las cactáceas mexicanas. *Cact. Suc. Mex.* XXXVIII. No. 4: 89-92.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- Newland, C.; K. S. Ives; G. E. Joseph; M. Mittleman, R. E. Foster; C. Scannell; W. R. Feldman; F. S. Crosswhite and C. Hansen. 1980. Propagation techniques for desert plants. *Desert Plants*, 2 (4): 205-217.
- Nobel, P. S. 1998. *Los Incomparables Agaves y Cactus*. Ed. Trillas. México. 211 p.

- Nobel, P. S. and E. de la Barrera. 2004. CO<sub>2</sub> uptake by the hemiephyphytic cactus, *Hylocereus undatos*. *Ann. Appl. Biol.*, 144(1):1-8.
- Olvera C., C., 2005. Germinación de las especies *Mammillaria glassii* (Foster), *Mammillaria grusonii* (Ruenge) y *Mammillaria pottsii* (scheer ex Salm-Dyck), del estado de Coahuila, mediante la técnica de escarificado y siembra en medio MS y cajas petri. Tesis de licenciatura. U. A. A. N. Saltillo, Coahuila. México. 47 p.
- Ordoñez M., M. A. 2003. Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae) Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 70 p.
- Pacovsky, R. S., E. A. Paul and G. J. Bethlenfalvay. 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 85:145-148.
- Papafotiou M., G. Balotis N., T. Panayiota L. and J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65:163-167.
- Pelah D., R. Kaushik A., Y. Mizrahi and Y. Sitrit. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 81-84.
- Pérez, M. B., E. Dávila F. and C. A. 2002. *In vitro* propagation of *Peleciphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 38(1):73.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. 54-82pp.
- Puente, M. E. and Bashan, Y. 1993. Effect of inoculation with *A. brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*, 15:49-60.
- Ramírez C., E. 2008. Germinación *in Vitro* de dos especies de cactáceas de los géneros *Mammillaria* y *Turbinicarpus*, en estatus de riesgo. Tesis de Licenciatura. U. A. A. N. Saltillo, Coahuila, México. 60 p.
- Rojas, A. M., 2008. Efecto del ácido giberélico en la germinación de cuatro especies del género *Mammillaria* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Bol. Soc. Latin. Carib, Cact. Suc.*, 5(1), 21-23
- Sagawa, Y. and J. T. Kunisaki. 1990. Micropropagation of floriculture crops. *In: P.V. ammirato, D.A. Evans, W.R. Shar and Y. P. S. Baja (eds)*



- Handbook of plant cell culture. Ornamental species. McGraw-Hill New York. Vol., 5: 32-39
- Seeni, S. and A. Gnanam. 1980. Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant *Chamaecereus sylvestrii* (Cactaceae). *Physiol. Plant.*, 49:465-472.
- SEMARNAT. NOM-059-ECOL-2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Normativo II. [http://www.ine.gob.mx/ueajeic/publicaciones/normas/rec\\_nat/no\\_059\\_a2g.html](http://www.ine.gob.mx/ueajeic/publicaciones/normas/rec_nat/no_059_a2g.html). (20/Agosto/2010).
- SNICS (Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas), 2001. Solicitudes de título de obtentor. México página web [www.sagar.gob.mx/snics](http://www.sagar.gob.mx/snics) (5/Diciembre/2010).
- Tomas P. W., y M. Hamerska. 2010. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 87:27-32
- UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). 2009. Documento TGP/13/1 "Orientaciones para nuevos tipos y especies". Ginebra, Suiza. 14 p.
- Velázquez E., L. E. y R. Soltero Q. 2001. Micropropagación de *Ephithelantha micromeris* Engelm. Weber ex Britton et Rose. *Cactaceas y Suculentas Mex.* XLVI (3):56 -62
- Villalobos A., V. y M. Thorpe. 1985. La micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados, *En: Fundamentos y Aplicaciones del cultivo de tejidos en la Agricultura.* W. Roca CIAT. Colombia. 67-85pp.
- Villavicencio G., E. E., J. J. López G., O. U. Martínez B. y A. Cano P 2006a. Micropropagación de cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción del Desierto Chihuahuense. Sistema Nacional de recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Red. Ornamentales en el marco del X Congreso Nacional y III Internacional de Horticultura Ornamental. AMEHOAC-SNICS-UAEM. Uruapan Mich. México. pp. 44-55
- Villavicencio G., E. E., A. Cano P., I. H. Almeyda L. y M. A. Arellano G. 2006b. Nueva técnica para la producción comercial del bonete o birrete de obispo (*Astrophytum myriostigma* Lem.) Cactácea ornamental del Desierto Chihuahuense. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto para productores Núm. 12. ISBN 970-43-0118-9 Coahuila, México. 10 p.

- Villavicencio G., E. E., A. Cano P. y A. Juárez S. 2009. Micropropagación producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del Desierto Chihuahuense. Campo Experimental Saltillo. INIFAP-CIRNE. Folleto Técnico Núm 39. ISBN 978-607-425-130-2 Coahuila, México. 42 p.
- Villavicencio G., E. E., A. Arredondo G., M. A. Carranza P., O. Mares A., S. Comparan S., A. González C. 2010. Cactáceas ornamentales del Desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. Libro técnico No. 2 ISBN: 978-607-425-473-0 Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, Saltillo Coahuila, México, 345 p.
- Villavicencio G., E. E. 2011. Tecnología para la micropropagación y producción *in vitro* de cactáceas ornamentales amenazadas de extinción. Ficha Tecnológica de Transferencia. Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, Saltillo Coahuila, México, (inédito). P. 13
- Villegas M., A. 1996. Desinfección y establecimiento *in vitro* del explante. Laboratorio de Biotecnología Especialidad Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México 5 p.
- Vyskot B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hort. Sci., 59(3): 449-452.
- Yassen-Mohamed, Y., S. Barringer A., W. Splittstoesser E., and R. J. Schnell. 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. Plant Cell Tiss. Organ Culture., 42:117-119.



Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

### Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria, Centros de Investigación Regional y Campos Experimentales



- Sede de Centro de Investigación Regional
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
- Campo Experimental

# **Comité Editorial del CIRNE**

## **Presidente**

Jorge Elizondo Barrón

## **Secretario**

Hipólito Castillo Tovar

## **Vocales**

Luis Mario Torres Espinosa

Jesús Loera Gallardo

Raúl Rodríguez Guerra

Antonio Palemón Terán Vargas

Isidro Humberto Almeyda León

Rubén Darío Garza Cedillo

## **REVISIÓN TÉCNICA**

María del Socorro Carmen Santos Díaz  
Profesor Investigador FCQ-CIEP-UASLP

## **FOTOGRAFÍAS**

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez

## **DISEÑO Y FORMACIÓN**

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez  
Areli González Cortes

## **CÓDIGO INIFAP**

MX-0-310602-36-03-15-09-51

La presente publicación se terminó de imprimir el mes de Noviembre de 2012  
en Impresos Garcer, Calle Abasolo No 1012 Zona Centro C.P. 25000, Saltillo, Coah.  
Tel./fax (844) 4102380

Su tiraje consta de 500 ejemplares

Campo Experimental Saltillo

**Dr. David Sánchez Aspeytia**  
Jefe de Operación del Campo Experimental en Coahuila

**C.P. Rocío del Carmen Núñez García**  
Jefe Administrativo

<b><u>Investigador</u></b>	<b><u>Programa de Investigación</u></b>
M.C. Oscar U. Martínez Burciaga	Agrometeorología y Modelaje
M.C. Pedro Hernández Rojas	Carne de Rumiantes
M.C. Carlos Ríos Quiroz	Carne de Rumiantes
Dr. Juan M. Covarrubias Ramírez	Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal
M.C. Emigdio Morales Olais	Frutales
Dr. José Antonio Vázquez Ramos	Frutales
Dr. Víctor Manuel Parga Torres	Hortalizas
Dr. David Sánchez Aspeytia	Hortalizas
M.C. Marco R. Carrasco Arandia	Incendios Forestales
M.C. Antonio Cano Pineda	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. David Castillo Quiroz	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. Mariano Narcia Velasco	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
M.C. E. Edith Villavicencio Gutiérrez	Manejo Forestal Sustentable y Servicios Ambientales
Ing. Eutimio de J. Cuéllar Villarreal	Pastizales y cultivos forrajeros
Dr. Francisco Castillo Reyes	Ornamentales
M.C. Juan David Sánchez Chaparro	Ornamentales
M.C. Luis Mario Torres Espinosa	Sanidad Forestal y Agrícola
M.C. Audberto Reyes Rosas	Trigo y avena

## **Gobierno del Estado de Coahuila**

Lic. Rubén Moreira Valdés  
Gobernador Constitucional del Estado

Ing. Noé F. Garza Flores  
Secretario de Desarrollo Rural

Ing. Arnoldo Martínez Cano  
Subsecretario de Agropecuario

Ing. Luis D. Rodríguez Alanís  
Director de Agricultura

M. V. Z. Cuauhtémoc Gutiérrez Villarreal  
Director de Ganadería

M.C. Eglantina Canales Gutiérrez  
Secretario de Medio Ambiente

## **Delegación Estatal de SAGARPA**

C.P. Luís Gurza Jaidar  
Delegado en Coahuila

Ing. Jorge Alberto Flores Berrueto  
Subdelegado Agropecuario

Lic. Reynold Maltos Romo  
Subdelegado de Planeación

C.P. Juan Antonio Gómez Baho  
Subdelegado de Administración

## **Comité del SINAREFI**

Dr. José Arnulfo del Toro Morales  
Director General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico SAGARPA

Ing. Enriqueta Molina Macías  
Director SNICS

M. C. Rosalinda González Santos  
Coordinador SINAREFI



Vivir Mejor

[www.gobiernofederal.gob.mx](http://www.gobiernofederal.gob.mx)

[www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

[www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)



**inifap**

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias