

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

## MICROPROPAGATION OF *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose, ORNAMENTAL CACTUS AND PHYTOGENETIC RESOURCE OF THE CHIHUAHUA DESERT

Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez<sup>1</sup>, Areli González Cortés<sup>2</sup> y Miguel Agustín Carranza Pérez<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se desarrolló un protocolo para la micropropagación de *Epithelantha micromeris*, cactácea en estatus de riesgo, que comprende cuatro etapas: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación, a fin de obtener plantas con tamaño uniforme en cantidad suficiente y con buena calidad fitosanitaria. El método de propagación presentado es eficiente respecto al tradicional y constituye una nueva tecnología de producción cuya aplicación es factible en el sistema-producto ornamental, bajo el esquema de laboratorio-invernadero. Las semillas de *E. micromeris* son quiescentes y pueden establecerse *in vitro* en el medio MS a 50%, en el cual registra un PG máximo de 60%, que supera a su homólogo adicionado con fitohormonas (AG<sub>3</sub>); esto significa que el taxón no requiere promotores para germinar. La inducción de brotes se logró mediante segmentos de epicotilo, como explantes, en medio de cultivo MS con diferentes tratamientos. Se determinó que el tipo y la concentración de fitohormona influyen en la tasa de multiplicación, pues se formaron hasta 15 brotes por explante; la cinetina (KIN) en interacción 10:1 con AIB en baja concentración es la promotora de ese efecto. Durante el enraizamiento *in vitro* se observó que la aplicación de  $1.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Azospirillum brasilense* tiene un efecto positivo en el proceso rizogénico: se originaron hasta nueve raíces por planta, con 2.3 cm de longitud. A partir de esta metodología es posible regenerar especies en estatus de riesgo de importancia ecológica para el Desierto Chihuahuense y optimizar los procesos biológicos para la producción de plantas de ornato.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*, cinetina, *Epithelantha micromeris*(Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose, fitohormonas, medio Murashige y Skoog, micropropagación.

### ABSTRACT

A protocol which comprises four stages was made for the micropropagation of *Epithelantha micromeris*, a cactus in risk status, in order to obtain a good number of plants in a healthy phytosanitary condition, with uniform size to attain a successful acclimatization. The proposed propagation method is efficient compared to the traditional one. It is a new production technology which is feasible to apply in the ornamental product-system, under the scheme of laboratory-greenhouse. The seeds of this species are quiescent and can be established *in vitro* on a 50% MS medium in which it can get a maximum of 60% PG, which surpasses its counterpart supplemented with phytohormones (GA<sub>3</sub>); this means that the species does not need promoters for germination. The induction of shoots was obtained from epicotyl segments as explants in MS medium with different treatments. It was determined that the type and concentration of phytohormone has an influence upon the multiplication rate, generating up to 15 shoots per explant; kinetin (KIN) in interaction with AIB 10:1 in low concentration is the promoter of this effect. During the *in vitro* rooting it was observed that the application of  $1.5 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> of *Azospirillum brasilense* has a positive effect on the rhizogenic process, generating up to 9 roots 2.3 cm long by plant. This methodology regenerates species in risk status of ecological importance for the Chihuahuan Desert and improves biological processes for the production of ornamental plants.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, kinetine, *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose, phytohormones, Murashige and Skoog medium, micropropagation.

Fecha de recepción: 16 de abril de 2012

Fecha de aceptación: 7 de octubre de 2012

<sup>1</sup> Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP. Correo-e: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

<sup>2</sup> Centro de Capacitación de Tecnología de Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

<sup>3</sup> Departamento de Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

## INTRODUCCIÓN

*Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose es una cactácea apreciada por coleccionistas nacionales y extranjeros por su morfología como planta de ornato. Se distribuye en el Desierto Chihuahuense, desde el oeste de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos de América, hasta el norte de México en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León y San Luis Potosí, en donde están presentes variantes endémicas.

Las plantas de esta especie son pequeñas, de 6 cm de diámetro, con tallo simple o cespitoso; espinas pectinadas, radiales, agrupadas en aréolas; flores diurnas, de 25 mm de longitud, color rosa pálido, y atractivos frutos rojos que contrastan con el aspecto gris cenizo de todo el organismo (Hunt *et al.*, 2006). A causa de su rareza, estos cactus globosos son valorados por los productores de plantas ornamentales y viveristas como un producto con demanda en los mercados nacional e internacional (Leszczyńska, 1990).

De acuerdo a las categorías de riesgo establecidas en la NOM-059 -SEMARNAT- 2010 es una especie amenazada de extinción (SEMARNAT, 2010), y también está clasificada en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (CITES, 1990).

Dado que *E. micromeris* es de crecimiento lento en su hábitat natural, se necesitan varios años para que una planta alcance su tamaño adulto y pueda reproducirse; además, por el estatus de riesgo en el que está clasificada es preciso determinar estrategias para su conservación y la de sus variedades *ex situ*.

Esta modalidad es el medio más significativo y generalizado para preservar los recursos fitogenéticos (CRGAA, 2011). Se basa en custodiar el material biológico vivo en bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro* y colecciones de plantas (en campo, viveros o jardines botánicos). Los dos primeros constituyen uno de los métodos más convenientes para mantener vigente el germoplasma, ya que permiten almacenar una gran variabilidad genética de forma económica y práctica; sin embargo, en especies como *E. micromeris*, cuyas poblaciones naturales son escasas y su porcentaje de germinación es bajo por factores ecológicos, es necesario implementar procedimientos como el cultivo de tejidos vegetales (CTV) para lograr este fin (Villavicencio *et al.*, 2006).

El CTV *in vitro* o micropropagación parte del fundamento de la totipotencialidad de las células vegetales; es decir, por medio de explantes es posible desarrollar plantas normales y completas (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

Los estudios iniciales de cultivo *in vitro* en cactáceas las realizaron Minocha y Mehra (1974), quienes intentaron, sin éxito, generar brotes adventicios de *Mammillaria woodsii* R. T. Craig; ellos consiguieron la formación de callo a partir de yemas, plántulas y partes florales. Posteriormente, Mauseth y Halperin (1975) y

## INTRODUCTION

*Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose is an appreciated cactus by national and foreign collectors from its morphology as ornamental plant. It grows in the Chihuahuan Desert, from west Texas and Nuevo Mexico in the United States of America up to the north of Mexico, in the states of Coahuila, Chihuahua, Nuevo León and San Luis Potosí, where several variations can be found.

The plants of this species are small, 6 cm in diameter, with a simple or cespitose stem; pectinated, radial thorns grouped into areoles; day flowers, 25 mm long, pale pink and attractive red fruits that contrast with the ash grey look of the whole organism (Hunt *et al.*, 2006). As these balloon-like cacti are very rare, they are highly appreciated by ornamental plant producers and nursery workers as it is a demanded product by the national and international markets (Leszczyńska, 1991).

According to the risk categories established in the NOM-059 -SEMARNAT- 2010 regulation, it is a species threatened of extinction (SEMARNAT, 2010), and also included in the Appendix II of The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) (CITES, 1990).

If *E. micromeris* is low growing in its natural habitat, several years are necessary for a plant to reach its adult size and become reproductive; in addition, the risk status in which it is classified, it is mandatory to determine strategies bound for its *ex situ* conservation and of their varieties.

*Ex situ* conservation is the most common and relevant way to preserve phylogenetic resources (CRGAA, 2011). It is based upon keeping the biological material into seed banks, *in vitro* culture banks and plant collections (in the field, nurseries or botanical gardens). The first two are one of the most convenient for germ plasm conservation *ex situ* since they favor the storage of a great genetic variability in a practical and economic way; however, in species like *E. micromeris*, whose natural populations and its germination, low, due to ecologic factors, it is necessary to apply conservation procedures such as plant tissue culture (CTV), in order to accomplish this ending (Villavicencio *et al.*, 2006).

Plant tissue culture (CTV) *in vitro* or micropropagation is based upon the total potential of vegetal cells; that is, by means of explants it is possible to develop normal and full plants (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

The first *in vitro* culture studies in cacti were made by Minocha and Mehra (1974), who intended, unsuccessfully, to produce adventitious shoots of *Mammillaria woodsii* R.T. Craig by forming callus from buds, seedlings and flower parts. Later, Mauseth and Halperin (1975) and Mauseth (1976) assessed hormone control during differentiation and demonstrated that the adventitious

Mauseth (1976) evaluaron el control hormonal durante la diferenciación, y demostraron que los brotes adventicios de *Opuntia polyacantha* Haw. se desarrollan y crecen hasta convertirse en plántula; por otra parte, Clayton *et al.* (1990) y Dabekaussen *et al.* (1991) analizaron los factores que inciden en la activación de las areolas en taxa de esta familia botánica. En 2005 se logró la micropropagación de ocho especies y subespecies del género *Turbinicarpus*, por medio del cultivo de yemas axilares en letargo (Dávila *et al.*, 2005). Así mismo, diversos autores han señalado los elementos que afectan la activación de areolas y han identificado discrepancias en la eficiencia de los métodos de micropropagación, que se expresan en el número de brotes por explante (Vyskot y Jara, 1984; De la Rosa y García, 1994; Giusti *et al.*, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

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) y campo (Clayton *et al.*, 1990), o de plántulas germinadas *in vitro* (Mata *et al.*, 2001; Villavicencio *et al.*, 2009).

Esta es una forma rápida de obtener individuos en cantidades suficientes para la producción intensiva de plantas de ornato, como se efectúa con orquídeas, cuna de moisés (*Spathiphyllum wallisii* Regel) y helechos (Sagawa y Kunisaki, 1990).

Por medio del CTV es posible satisfacer la demanda de plantas de *E. micromeris*, disminuir la presión que existe sobre sus poblaciones naturales y, así, contribuir a su rescate y conservación.

Dada la importancia ecológica y económica de esta cactácea en las zonas semiáridas del Desierto Chihuahuense y en el sector ornamental, se desarrolló un protocolo para su micropropagación que consideró el efecto *in vitro* del inoculante de *Azospirillum* sp., bacteria que incide en el proceso rizogénico de plantas propagadas *in vivo*, como se ha comprobado en *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., así como *in vitro*, entre las que destacan *Simmondsia chinensis* (Link) C.K. Schneid. (jojoba), *Saccharum officinarum* L. (caña de azúcar), *Solanum tuberosum* L. (papa) y *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) (Carletti *et al.*, 2003; Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Okon, 1994).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se utilizaron semillas de una colecta masal de poblaciones naturales ubicadas en los municipios Parra de la Fuente, Ramos Arizpe, General Cepeda y Viesca en el estado de Coahuila. En cada localidad se llevó a cabo una caracterización del medio físico que incluyó: altitud, precipitación, temperatura, textura del suelo, pendiente, orientación de la pendiente y vegetación asociada (Figura 1, Cuadro 1).

shoots of *Opuntia polyacantha* Haw. could develop and grow until they became a seedling; on the other hand, Clayton *et al.* (1990) and Dabekaussen *et al.* (1991) analyzed the factors that affect the activation of areoles in taxa of this botanic family. In 2005 was accomplished the micropropagation of eight species and subspecies of the *Turbinicarpus* genus, by means of the culture of axillary buds in dormancy (Dávila *et al.*, 2005). Also, several authors have highlighted the elements that influence the activation of areoles and have found differences in the efficiency of micropropagation methods, that are expressed in the number of shoots by explant (Vyskot and Jara, 1984; De la Rosa y García 1994; Giusti *et al.*, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

For cacti micropropagation, explants from axillary buds contained in areoles or tubers from nursery plants (Vyskot and Jara, 1984; Escobar, 1985; Mohamed, 2002) or from the field (Clayton *et al.*, 1990), or from seedlings germinated *in vitro* (Mata *et al.*, 2001; Villavicencio *et al.*, 2009) can be used.

This is a fast way to get plants in enough amounts for intensive production of ornamental plants, as it is regularly done with orchids, Peace lily (*Spathiphyllum wallisii* Regel) and ferns (Sagawa and Kunisaki, 1990).

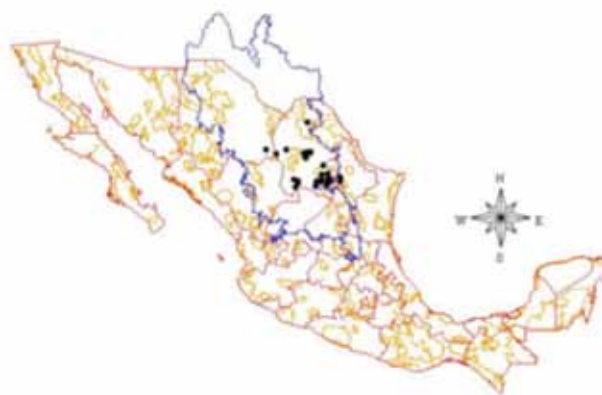
By CTV it is possible to satisfy the demand for *E. micromeris* plants, lower the pressure upon their natural populations, and therefore, help with the rescue and conservation of this phylogenetic resource.

From the ecologic and economic importance of this cactus from the semiarid zones of the Chihuahuan Desert and the ornamental sector, it was developed a protocol for its micropropagation that took into account the *in vitro* effect of *Azospirillum* sp., a bacteria involved in the rooting process of plants propagated *in vivo*, as it has been confirmed by *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L.; and *in vitro*, from which the following are outstanding: *Simmondsia chinensis* (Link) C.K. Schneid. (jojoba), *Saccharum officinarum* L. (sugar cane), *Solanum tuberosum* L. (potatoe) y *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) (Carletti *et al.*, 2003; Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Okon, 1994).

## MATERIALS AND METHODS

### Genetic material

The seeds that were used came from a massal collection of natural populations located in the municipalities of Parra de la Fuente, Ramos Arizpe, General Cepeda and Viesca in Coahuila state. In each location a description of the place was carried out, which included: altitude, precipitation, temperature, soil texture, slope, hillside and associated vegetation (Figure 1, Table 1).



**SIMBOLOGÍA**

- *Epithelantha micromeris*
- Polímero de la Ecorregión del Desierto chihuahuense

Fuente: Villavicencio *et al.* (2010).

Source: Villavicencio *et al.* (2010).

Figura 1. Distribución de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose en Coahuila, México.

Figure 1. Distribution of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose in Coahuila state, Mexico.

Cuadro 1. Principales características ecológicas de las poblaciones de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose en Coahuila, México.

Table 1. Main ecological characteristics of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose in Coahuila state, México.

| Clima                  | Precipitación (mm)                | Temperatura  | Unidad de suelo   | Textura | Altitud (m)   |
|------------------------|-----------------------------------|--|-------------------|---------|---------------|
|                        |                                   | Media anual<br>12 °C y 18 °C   | Regosol calcárico |         | 1,500 a 2,000 |
| BS <sub>1</sub> kw     |                                   | Mes más frío   |                   |         |               |
| Semiárido,<br>templado | Lluvias de verano<br>400 a 500 mm | -3 °C a 18 °C,<br>Mes más caliente mayor<br>a 22 °C.<br>Máxima<br>40 a 42 °C | Litosol           | Fina    | 1,000 a 1,500 |

Etapa 1. Establecimiento de semillas en cultivo aséptico

Se evaluó la germinación *in vitro* de *E. micromeris* mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, en el cual el factor A fueron dos tipos de medio, MBG1= MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% y MBG2= 0.6% agar + 87.64 mM de C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>. El factor B consistió en dos tratamientos sin ácido giberélico (C1= 0.0 μM de AG<sub>3</sub>) y con aplicación de ácido giberélico (C2= 8.65 μM de AG<sub>3</sub>) adicionado al medio de cultivo como promotor de la germinación.

Stage 1. Seed establishment in an aseptic culture

The *in vitro* germination of *E. micromeris* was assessed by following a completely at random experimental design with a 2 x 2 factorial arrangement, in which the A factor consisted in two medium types: MBG1= MS (Murashige and Skoog, 1962) at 50% and MBG2= 0.6% agar + 87.64 mM of C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>. The B factor consisted in two treatments, without gibberellic acid (C1= 0.0 μM de AG<sub>3</sub>) with a completely at random experimental design and a factorial arrangement, and with gibberellic acid (C2= 8.65 μM de AG<sub>3</sub>) which was added to the culture medium as a germinator promoter.

Las semillas utilizadas, procedentes de la colecta masal realizada durante 120 días, se desinfectaron de acuerdo al protocolo de Villavicencio *et al.* (2009); la unidad experimental fue de 30 semillas y tres repeticiones por tratamiento. Los datos se tomaron cada siete días en un lapso de seis semanas. Las variables consideradas fueron la velocidad (VG) y el porcentaje de germinación (PG).

## Etapa 2. Multiplicación o inducción de brotes

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con una relación citocinina-auxina 10:1 en diferentes niveles de concentración. A través de un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x8 se establecieron segmentos de epicotilo obtenido de las plántulas germinadas *in vitro* en el medio de inducción de brotes (MIB) respectivo. El factor A comprendió dos tipos de fitohormona (F): 6-bencil aminopurina (BA) con 11 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 cinetina 6-furfuril aminopurina (Kin) con 5 niveles de concentración (T12=0.5, T13=1.2, T14=2.3, T15=3.5 y T16=4.6 de mM de Kin). Ambas combinadas con su proporción correspondiente de auxina: ácido índol-3-butírico (AIB) (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 x 10<sup>-1</sup> μM de AIB) y ácido 1-naftalenacético (ANA) (T8=0.15, T9=0.25, T10=0.5 y T11=0.75 x 10<sup>-1</sup> μM de ANA). Así, el total de tratamientos incluyó a 16 en el MIB y uno sin fitohormonas (T0). La unidad experimental se fijó en tres explantes por frasco, con 10 repeticiones por tratamiento. Este ensayo se llevó a cabo ocho veces consecutivas. Cada ocho semanas, después del establecimiento previo al subcultivo se registró el número de brotes (NB) y su altura (A).

Condiciones de incubación. En el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Campo Experimental Saltillo del CIRNE-INIFAP se ejecutaron las dos primeras etapas descritas. Las semillas se colocaron en tubos de ensayo con un volumen de 5 mL de medio de cultivo; mientras que las plántulas se subcultivaron en frascos Gerber<sup>®</sup> de 70 mL, con un volumen de 25 mL de medio de cultivo para la inducción de brotes (MIB). Para los subcultivos en la etapa de multiplicación se utilizaron envases de polipropileno de 500 mL, con un volumen de 50 mL de medio de cultivo; posteriormente, se incubaron a una temperatura de 26 ± 1°C, con un fotoperiodo de 16 h luz.

## Etapa 3. Enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia, pues el objetivo de esta alternativa reproductiva es producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que les permitan sobrevivir a las condiciones de trasplante, sobre suelo. En esta etapa se pretende mejorar el proceso de enraizamiento *in vitro* mediante la aplicación de

The seeds that were used, that came from a massal collection that was carried out for 120 days, were disinfected applying the protocol of Villavicencio *et al.* (2009); the experimental unit was made up by 30 seeds and three replications per treatment. Data were taken every seven days in a six week period. The variables that were taken into account were speed (VG) and per cent of germination (PG).

## Stage 2. Shoot multiplication or induction

MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) added to a 10:1 cytokinin-auxin relation at different concentration levels. Based on a completely at random experimental design with a 2x8 factorial arrangement were established epicotyl segments from seedlings germinated *in vitro* in the shoot induction medium (MIB). The A factor included two kinds of phytohormone (F): 6-bencil aminopurine (BA) with 11 concentration levels (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 and T11=3.3 mM of BA); and kitenin 6-furfuril aminopurine (Kin) with 5 concentration levels (T12=0.5, T13=1.2, T14=2.3, T15=3.5 and T16=4.6 de mM of Kin). Both combined with its own auxin proportion: indole-3-butyric acid (AIB) (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 and T16=4.13 x 10<sup>-1</sup> μM of AIB) and 1-naphthaleneacetic acid (ANA) (T8=0.15, T9=0.25, T10=0.5 and T11=0.75 x 10<sup>-1</sup> μM of ANA). In this way, 16 treatments in MIB were studied besides one without phytohormones (T0). The experimental unit was fixed in three explants by bottle, with 10 replications per treatment. This assay was carried out for eight consecutive times. Every eight weeks, after the establishment previous to the subculture, the number of shoots (NB) and their height (A) were registered.

Incubation conditions. the first two stages were accomplished. In the laboratory of vegetal tissue culture at Saltillo Experimental Station of CIRNE-INIFAP. Seeds were put into assay tubes with 5 mL of culture medium; meanwhile, seedlings were subcultivated in 70 mL Gerber<sup>®</sup> bottles, with 25 mL of culture medium for shoot induction (MIB). For the subcultures in the multiplication stage were used 500 mL polypropylene containers with 50 mL of culture medium; later, they were incubated at 26 ± 1°C, with a 16 light hour photoperiod.

## Stage 3. *In vitro* rooting

The rooting of shoots that were reproduced *in vitro* is very important as the purpose of this propagation method is to produce plants with good physiological and morphological components that let them survive the transplant conditions in the ground. In this stage its is expected to improve the *in vitro* rooting process by the application of the biofertilizer with *Azospirillum* sp., as an active ingredient, and thus, to help these organisms in their acclimatization during their transfer to the nursery or greenhouse.

un biofertilizante con *Azospirillum* sp., como ingrediente activo, y contribuir así a su aclimatación durante su transferencia al vivero o invernadero.

Se empleó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, adicionado con *Azospirillum* sp. en tres concentraciones: T1=0.7x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, T2=1.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y T3=3x10<sup>6</sup>UFC mL<sup>-1</sup>. En total se evaluaron tres tratamientos y un testigo sin *Azospirillum* sp. Estas concentraciones se aplicaron a los envases de polipropileno con los brotes de *E. micromeris* obtenidos en la etapa anterior. Después de ocho semanas de incubación se midió el incremento de la altura del tallo (IAT), y se contabilizó el número (NR) y la longitud radicular (LR) (cm).

Dos semanas después de realizado el subcultivo de los brotes, se pesó el biofertilizante (Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Azospirillum* sp.), mismo que se diluyó en agua destilada estéril, y se añadió a los envases con agar (Cuadro 2).

The MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50% was used, to which *Azospirillum* sp was added at three concentration levels: T1=0.7x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, T2=1.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> and T3=3x10<sup>6</sup>UFC mL<sup>-1</sup>. At the end, three treatments and a control without *Azospirillum* sp. were assessed. These concentrations were applied to the polypropylene containers with the *E. micromeris* shoots obtained in the previous stage. After eight weeks of incubation, the total stem height (IAT) was measured as well as the root length (LR) (cm) and the number of roots (NR).

After two weeks of having achieved the shoot subculture, the biofertilizer of *Azospirillum* sp. from the concentration of Colony Formation Units (UFC), which was dissolved into sterile distilled water, and was added to the containers with agar (Table 2).



Cuadro 2. Requerimientos de biofertilizante durante la micropropagación *in vitro* de plántulas de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose.

Table 2. Biofertilizer requirements during the *in vitro* micropropagación of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose seedlings.

|   | Concentración*                           | Aplicaciones/ Semana (g·L <sup>-1</sup> ) |      |
|---|--|---|------|
|   |  | 1   | 2    |
| 1 | 0.7x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 1.4                                       | 2.9  |
| 2 | 1.5x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 2.9                                       | 5.8  |
| 3 | 3.0x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 5.8                                       | 11.6 |

\*Concentración calculada con 500 millones de bacterias de *Azospirillum* g<sup>-1</sup>

\* Calculated concentration of 500 million *Azospirillum* g<sup>-1</sup> bacteria.

#### Etapa 4. Aclimatación

Manejo de las vitroplantas. Estas se sacan del envase y se lavan con agua corriente para eliminar los restos de agar en la raíz; si es posible, se recomienda clasificarlas por tamaño y antes de su trasplante se sumergen en una solución fungicida (Benomyl). La aclimatación es la etapa más crítica de la micropropagación, porque es preciso cambiar de la condición heterótrofa del cultivo *in vitro* a la autótrofa *in vivo*; es decir, su trasplante al suelo donde se puede presentar estrés hídrico, y, en consecuencia, es importante considerar el ambiente y sustrato a los que se destinen.

Se utilizó un medio estéril preparado con corteza de coco y agrolita (1:2) que fue depositado en charolas de 288 cavidades; se les aplicaron riegos cada tercer día durante las dos primeras semanas. La aclimatación se realizó a los 40 días posteriores a la evaluación de la supervivencia, a una humedad relativa alta (80-90 %) en la primera y segunda semanas de establecimiento; más adelante, se espaciaron los riegos y se proporcionaron más horas luz, para promover un crecimiento autotrófico.

#### Stage 4. Acclimatization

Vitroplant handling. These plants are removed from the container and are washed with running water in order to eliminate the residues of agar from the root; if it possible, it is advised to classify them by size, and before their transplant, they are immersed into a fungicidal solution (Benomyl). Acclimatization is the most critical phase of micropropagation, because it is mandatory to change the heterotrophous condition of the *in vitro* culture to the *in vivo* autotrophous; that is, the transplantation to the ground where water stress might occur, and consequently, it is important to take into account the environment and the substrate to which they are taken.

A sterile medium prepared with coconut cortex and agrolite (1:2) was put into trays with 288 cavities; with such substrate, watering was applied every three days during the two first weeks. The acclimatization was achieved after 40 days from the survival assessment, at a high relative humidity (80-90 %) to promote an autotrophic growth.

La información de las distintas etapas de la micropropagación se examinó con el procedimiento GLM del Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 2002), a través de la prueba de comparación de medias, con una probabilidad de 95% para la selección de los tratamientos significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapa 1. Establecimiento de semillas en cultivo aséptico

Porcentaje de germinación (PG). Las semillas de *E. micromeris in vitro* requieren de un MBG compuesto por las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% (T1) a fin de promover las tres fases de la germinación: absorción de agua, transformaciones metabólicas-hidratación de enzimas y la emergencia de radícula, en primera instancia, y después de la plúmula. Se registró un PG máximo de 60%, que superó a su homólogo con adición de  $AG_3$  (T2= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50% +  $8.65 \mu\text{M}$  de  $AG_3$ ), lo cual muestra que esta especie no necesita de giberelinas para promover la emergencia de las vitroplantas (figuras 2 y 3).

The information about the different stages of micropropagation was examined by the GLM procedures of the Statistic Analysis System (SAS, 2000) by the mean comparison test, with a 95% probability for the selection of significant treatments.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Stage 1. Establishment of seeds in aseptic culture

Germination Per cent (PG). The *in vitro* seeds of *E. micromeris* demand an MBG made up by salts of the MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50% (T1) in order to promote the three germination phases: water absorption, metabolic transformations-enzyme hydration and the emergence of radicle, first and later, of the plumule). A maximum of 60% of PG was registered, which surpassed its homologues with an addition of  $AG_3$  (T2= MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50% +  $8.65 \mu\text{M}$  of  $AG_3$ ), which confirms that this species does not need gibberellins to promote the emergence of vitroplants (figures 2 and 3).



Figura 2. Establecimiento de semillas y aspecto de las plántulas de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose después de seis semanas de incubación.

Figure 2. Seed establishment and look of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose seedlings after six weeks of incubation.

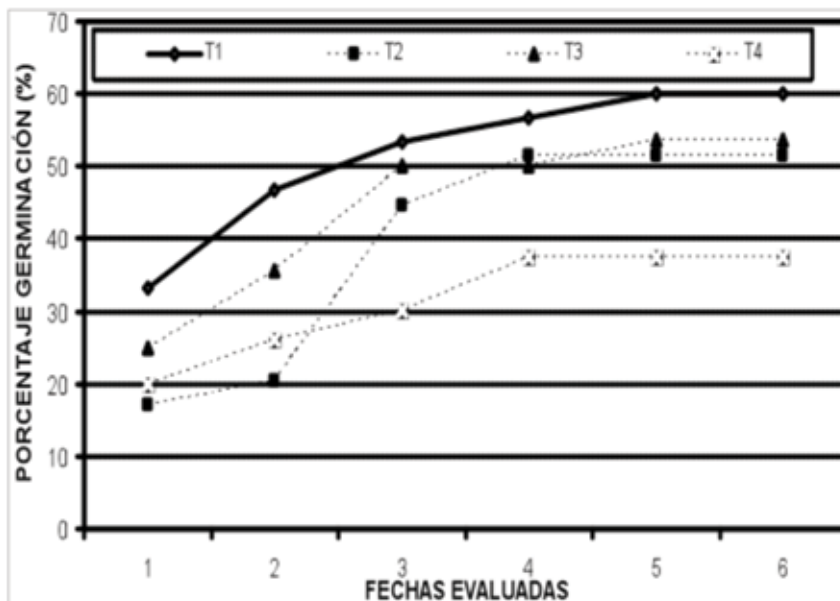


Figura 3. Velocidad de germinación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose en diferentes medios de cultivo MBG (T1= MS 50%; T2= MS 50%+8.65  $\mu$ M de  $AG_3$ ; T3= 0.6% agar y 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; T4= 0.6% agar + 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  + 8.65  $\mu$ M de  $AG_3$ ).

Figura 3. Velocidad de germinación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose en diferentes medios de cultivo MBG (T1= MS 50%; T2= MS 50%+8.65  $\mu$ M de  $AG_3$ ; T3= 0.6% agar y 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; T4= 0.6% agar + 87.64 mM de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  + 8.65  $\mu$ M de  $AG_3$ ).

Cuando se compara el efecto del medio MBG T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50% con el MBG sin sales nutritivas con y sin  $AG_3$  (T3 y T4), se muestra que en los últimos el PG es menor (37%); en cambio, respecto al MBG T1, se duplica la emergencia de las vitroplantas. Por lo tanto, los componentes del medio de cultivo son significativos 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).

Cuando disminuye la concentración de sales en el medio de cultivo al 50%, la fuerza iónica en el mismo se reduce; con ello se logra favorecer el metabolismo celular de la semilla. Así, se activa el crecimiento del embrión y el proceso enzimático en los tegumentos de diversas cactáceas: *Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton *et* Rose. De ahí que el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50% utilizado en la germinación de *E. micromeris*, resultara efectivo (Figura 2).

Velocidad de emergencia (VE). De los diferentes medios usados en la germinación se determinó que el MBG (T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50%) registra una mayor VE desde los primeros siete días de incubación. Esta tendencia se mantiene hasta los 42 días de la evaluación, lo cual indica que los nutrientes del medio favorecen el proceso de germinación y la emergencia de las vitroplantas.

When the effect of the MBG T1 medium = MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50% is compared with MBG without nutritious salts with or without  $AG_3$  (T3 and T4), in PG it is lower (37%); on the other side, in regard to MBG T1, vitroplant emergence duplicates. Therefore, the elements of the culture medium are significant for breaking the seed cover and emerge into a new vitroplant, as Malda *et al.* (1999), Kauth *et al.* (2006) and Dutra *et al.* (2008) describe.

When the concentration of salts in the culture medium at 50% lowers, its ionic force is reduced; this has made it possible to favor the cell metabolism of the seed. Thus are activated the growth of the embryo and the enzymatic process in the teguments of several cacti: *Mammillaria elongata* DC., *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran and *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton *et* Rose. Hence, the MS culture (Murashige and Skoog, 1962) at 50% that was used in the *E. micromeris* germination was effective (Figure 2).

Emergence speed (VE). Of the different media that were used in germination, it was determined that MBG (T1= MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50%) had a higher VE record since the very first seven days of incubation. This tendency keeps the same during the 42 days of assessment, which means that the nutrients of the medium favor the germination process and the emergence of vitroplants.



El ácido giberélico como promotor de la germinación no tuvo un efecto significativo en la VE del MBG T2= MS 50X+8.65  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ , ni en el medio T4= MBG adicionado con 6% de agar+ 3% de sacarosa + 8.65  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ . Desde los primeros 14 días de incubación, el  $\text{AG}_3$  exógeno no influyó significativamente en la VE, a diferencia de las semillas establecidas en el T1= medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50%, en el que los niveles endógenos de  $\text{AG}_3$  activaron los procesos enzimáticos (Figura 3).

La VE de *E. micromeris* es más corta que la reconocida para otras cactáceas, como las del género *Ariocarpus*, pero más larga que la registrada en hortalizas (cilantro, tomate) y algunas especies forestales (*Pinus cembroides* Zucc.). El mismo resultado se ha obtenido en *Melocastus caesius* H. L. Wendl., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Britton *et* Rose y otras especies de *Mammillaria*, en los cuales las giberelinas no promueven la germinación (Araya *et al.*, 2000; Rojas, 2008).

## Etapas 2. Multiplicación o inducción de brotes

En los distintos ensayos establecidos se determinó que no existen diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el tipo de fitohormonas (F) empleadas para la inducción de brotes. La cinetina (Kin) y la benzilaminopurina (BA) produjeron el mismo número de brotes (NB): 9 brotes/explante en promedio; sin embargo, se observaron variaciones en su altura (A), ya que BA generó brotes de 7 mm y cuando se utilizó Kin la altura disminuyó 15% (6 mm), como media (Cuadro 3). Al comparar este efecto con el tratamiento sin fitohormonas se comprobó que de forma endógena *E. micromeris* es capaz de originar brotes; no obstante, su regeneración es baja (1.2 brotes/explante), al igual que su altura: 1.29 mm/explante (Cuadro 3).

Cuadro 3. Influencia de las fitohormonas en el número (NB) y altura (AB) de brotes de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber *ex* Britt. & Rose en laboratorio.

Table 3. Effect of phytohormones in the number (NB) and height (AB) of shoots of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber *ex* Britt. & Rose in the laboratory.

| Fitohormona     | Número de Brotes | Altura (mm) |
|-----------------|------------------|-------------|
| Kin             | 9.41 a           | 6.29 b      |
| BA              | 9.32 a           | 7.17 a      |
| Sin fitohormona | 1.22 b           | 1.9 c       |
| DMS             | 0.29             | 0.21        |
| r <sup>2</sup>  | 0.14             | 0.28        |
| CV              | 11.46            | 25.82       |
| Media           | 6.65             | 5.12        |

Kin = Cinetina; BA = Benzilaminopurina. r<sup>2</sup>= Coeficiente de correlación múltiple; DMS= Diferencia mínima significativa; CV= Coeficiente de variación. Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

Kin = Kinetin; BA = Benzylaminopurine. r<sup>2</sup> = multiple correlation coefficient; DMS = minimum significant difference; CV = coefficient of variation. Values with the same letter within columns are not significantly different (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

The gibberellic acid as a promoter of germination had no significant effect on the VE of MBG T2= MS 50X+8.65  $\mu\text{M}$  of  $\text{AG}_3$ , or in the T4 medium = MBG added to 6% agar+ 3% sucrose + 8.65  $\mu\text{M}$  of  $\text{AG}_3$ . From the first 14 days of incubation, exogenous  $\text{AG}_3$  had no significant influence on VE, in comparison to the seeds established in the T1= MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50%, in which the endogenous levels of  $\text{AG}_3$  activated the enzymatic processes (Figure 3).

*E. micromeris* VE is shorter than that known for other cacti, as those of the *Ariocarpus* genus, but longer than those for orchards (coriander, tomato) as well as some forest species (*Pinus cembroides* Zucc.). The same result has been obtained for *Melocastus caesius* H. L. Wendl., *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Britton *et* Rose and other *Mammillaria* species, in which gibberellins do not promote germination (Araya *et al.*, 2000; Rojas, 2008).

## Stage 2. Shoot multiplication or induction

In the different established assays it was determined that there are non- significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between the kind of phytohormones (F) used for shoot induction. Kinetin (Kin) and benzylaminopurine (BA) produced the same average number of shoots (NB): 9 shoots/explant; however, variations in height (A) were observed as BA generated 7 mm shoots, and when Kin was used, height diminished 15% (6 mm tall) in average (Table 3). When this effect was compared with the treatment without phytohormones, it was proved that the endogenous form of *E. micromeris* is able to form shoots; nevertheless, their regeneration is poor (1.2 shoots/explant), as well as their height (1.29 mm/explant) (Table 3).

Inducción de brotes (IB). El análisis de los resultados correspondientes a los tratamientos con la prueba de medias ( $P \leq 0.05$ ) como efectos independientes definió que la interacción Kin-AIB en relación 10:1 favorece la multiplicación *in vitro*, de manera que el MIB adicionado con el tratamiento T13= 1.2 mM de KIN + 1.03  $\mu\text{M}$  de AIB y T16= 4.6 mM de KIN + 4.133  $\mu\text{M}$  de AIB generan la mayor tasa de multiplicación, ya que se llegan a producir hasta 15 brotes/explante, valor sobresaliente para la regeneración de la especie.

El MIB con la interacción BA-AIB o BA-ANA tuvo un impacto menor en la inducción de brotes que el MIB con la interacción Kin-AIB, con el cual se obtuvieron en promedio 12 brotes/explante, sin importar la auxina utilizada. Este resultado se logró al combinar el MIB con el tratamiento T4= 1.1 mM de BA + 1.03  $\mu\text{M}$  de AIB o con el T9= 1.1 mM de BA + 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA. Esto significa que la concentración citocinina-auxina en relación 10:1 fue positiva para la inducción de brotes, aunque su efecto dependió del tipo de fitohormona empleada (Cuadro 4).

Mediante la aplicación de la citocinina en concentración de 1.1 y 2.2 mM de BA al MIB se obtuvo la misma respuesta, con independencia de la combinación de auxina. Los tratamientos T4 y T9, así como T5 y T10 fueron estadísticamente iguales, ya que formaron 12 y 10 brotes/explante en promedio, respectivamente (Cuadro 4).

Un efecto opuesto se registró con el MIB sin fitohormonas, que mostró una baja regeneración de brotes (1.2 brotes/explante), lo cual indica que los explantes de *E. micromeris* cuentan con la totipotencia para inducir esta respuesta morfogénica; sin embargo, la tasa de multiplicación no es eficiente respecto al número de brotes (Cuadro 4).

Los resultados demuestran que la interacción citocinina-auxina es efectiva en la organogénesis directa, a semejanza de lo consignado para otras cactáceas mexicanas; como lo refieren Mata *et al.* (2001) y Pérez (1998), quienes usaron de 8.8 a 13.31 mM de BA + 0-2.6  $\mu\text{M}$  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 benzilaminopurina (BA) en interacción con AIB o ANA, como en los tratamientos T2=0.7 mM de BA + 0.06  $\mu\text{M}$  de AIB y T8=0.7 mM de BA + 0.15  $\mu\text{M}$  de ANA, se obtiene igual número de brotes (10 brotes/explante), con una altura de 6 mm, tamaño superior a la de los brotes conseguidos en los tratamientos T13 y T16, en los que se formaron la mayor cantidad de brotes (15 brotes/explante), aunque más pequeños (3 mm). Con el tratamiento T3= 0.9 mM de BA + 0.81  $\mu\text{M}$  de AIB se registraron los más grandes (7.3 mm), a pesar de que su número fue bajo (6 brotes/explante) (Cuadro 4 y Figura 4).

Shoot induction (IB). The analysis of the results of treatments by the mean test ( $P \leq 0.05$ ) as an independent effect defined that the Kin-AIB interaction in a 10:1 ratio favors *in vitro* multiplication, in such a way that the MIB added with T13 treatment= 1.2 mM of KIN + 1.03  $\mu\text{M}$  of AIB and T16= 4.6 mM of KIN + 4.133  $\mu\text{M}$  of AIB generates the greatest multiplication rate, since it produces up to 15 shoots/explant, an outstanding value for the regeneration of the species.

MIB with the BA-AIB or BA-ANA interaction had a lighter effect upon shoot induction than MIB with the Kin-AIB, with which the result was 12 shoots/explant, in spite of the auxin that was used. This was accomplished by combining MIB with T4 treatment = 1.1 mM of BA + 1.03  $\mu\text{M}$  of AIB or with the T9 treatment= 1.1 mM de BA + 0.5  $\mu\text{M}$  of ANA. This means that the cytokinin-auxin 10:1 ratio was positive for shoot induction, even though its effect depended on the type of phytohormone that was used (Table 4).

With the addition of cytokinin in 1.1 and 2.2 mM concentrations of BA to MIB the same response was obtained, regardless of the auxin combination. T4 and T9 as well as T5 and T10 were statistically the same, as in average, they formed, respectively, 12 and 10 shoots/explant (Table 4).

The opposite effect was found with MIB without phytohormone, which showed a poor shoot regeneration (1.2 shoots/explant), which means that *E. micromeris* explants possess totipotency to induce a morphogenetic response; however, the multiplication rate is not efficient in regard to the number of shoots (Table 4).

These results confirm that the cytokinin-auxin interaction is effective in direct organogenesis, which is similar to what has been reported for Mexican cacti by Mata *et al.* (2001) and Pérez (1998), who used from 8.8 to 13.31 mM of BA + 0-2.6  $\mu\text{M}$  of ANA in MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) to multiply one species of the *Epithelantha* genus.

Shoot height (A). When it is added to MIB the same concentration (10:1) of Benzylaminopurine (BA) in interaction with AIB or ANA as in T2 treatments = 0.7 mM de BA + 0.06  $\mu\text{M}$  of AIB and T8=0.7 mM de BA + 0.15  $\mu\text{M}$  of ANA, the same number of shoots is obtained (10 shoots/explant), with a height of 6 mm, which is a taller size than the height of the shoots coming from the T13 and T16 treatments, in which the greatest number of shoots were formed (15 shoots/explant), even though they are smaller (3 mm). With the T3 treatment= 0.9 mM of BA + 0.81  $\mu\text{M}$  of AIB, the largest shoots were formed (7.3 mm), even if their amount was rather low (6 brotes/explante) (Table 4 and Figure 4).

In this regard, Velázquez and Soltero (2001) informed that the sources of cytokinin (Kinetine and 2IP) had very significant effects over shoot production of *Epithelantha micromeris* var. *micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose. Corneanu *et al.* (1990) and Dabekausen *et al.* (1991) as well quote that BAP cytokinin is an essential component for areole activation,



Cuadro 4. Tasa de multiplicación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose.  
Table 4. Multiplication rate of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose.

| Tratamientos | Concentración |     |               |                | NB        | A       |
|--------------|---------------|-----|---------------|----------------|-----------|---------|
|              | mM            |     | $\mu\text{M}$ |                |           |         |
|              | BA            | KIN | AIB           | ANA            |           |         |
| 0            | 0             | 0   | 0             | 0              | 1.22 f    | 0       |
| 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 columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

NB= Número de brotes; A=Altura; BA = Benzilaminopurina; KIN = Kinetina; AIB= ácido índole-3-butírico;

ANA = ácido 1-naphthaleneacético; DMS= Diferencia mínima significativa; r<sup>2</sup>= Coeficiente de correlación múltiple;

CV= Coeficiente de variación.

Values with the same letter within columns are not significantly different (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

NB = Number of shoots; A =Height; Kin = Kinetin; BA = Benzylaminopurine; AIB = índole-3-butyric acid;

ANA = 1-naphthaleneacetic acid; DMS = minimum significant difference; r<sup>2</sup> = multiple correlation coefficient;

CV = coefficient of variation.

Al respecto, Velázquez y Soltero (2001) consignan que las fuentes de citocinina (Kinetina y 2IP) tuvieron efectos muy significativos sobre la producción de brotes de *Epithelantha micromeris* var. *micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose. Así mismo, Corneanu *et al.*, 1990 y Dabekaussen *et al.*, (1991) citan que la citocinina BAP es un componente esencial para la activación de areolas, lo que permite la micropropagación de *Sulcorebutia alba* Rausch y de *Mammillaria* spp.

En la etapa de multiplicación de *E. micromeris*, el control hormonal interviene en la diferenciación del explante; Mauseth (1976; 1979) documenta que la regeneración de brotes *in vitro* de esta cactácea es posible a partir de yemas axilares, de modo similar a lo referido para *Cephalocereus seniles* (Haw.) Pfeiff. y *Mammillaria albicoma* Boed. (Choreño *et al.*, 2002; Wyka y Hamerska, 2010).

which lets the micropropagation of *Sulcorebutia alba* Rausch and *Mammillaria* spp.

In the multiplication stage of *E. micromeris*, hormone control takes part in the differentiation of the explant; Mauseth (1976; 1979) states that the regeneration of *in vitro* shoots of this cactus is possible from axillary buds, in a similar way to what has been referred about *Cephalocereus seniles* (Haw.) Pfeiff. and *Mammillaria albicoma* Boed. (Choreño *et al.*, 2002; Wyka and Hamerska, 2010).

The MIB to which phytohormones were added affects the *in vitro* multiplication of *E. micromeris*. Therefore, when 0.7 mM of BA + 0.06  $\mu\text{M}$  of AIB (T2) or 1.2 mM of KIN + 1.03  $\mu\text{M}$  of AIB (T13) are added, multiplication becomes exponential of 1:11:11:11 up to 1:15:15:15. This production is significant for

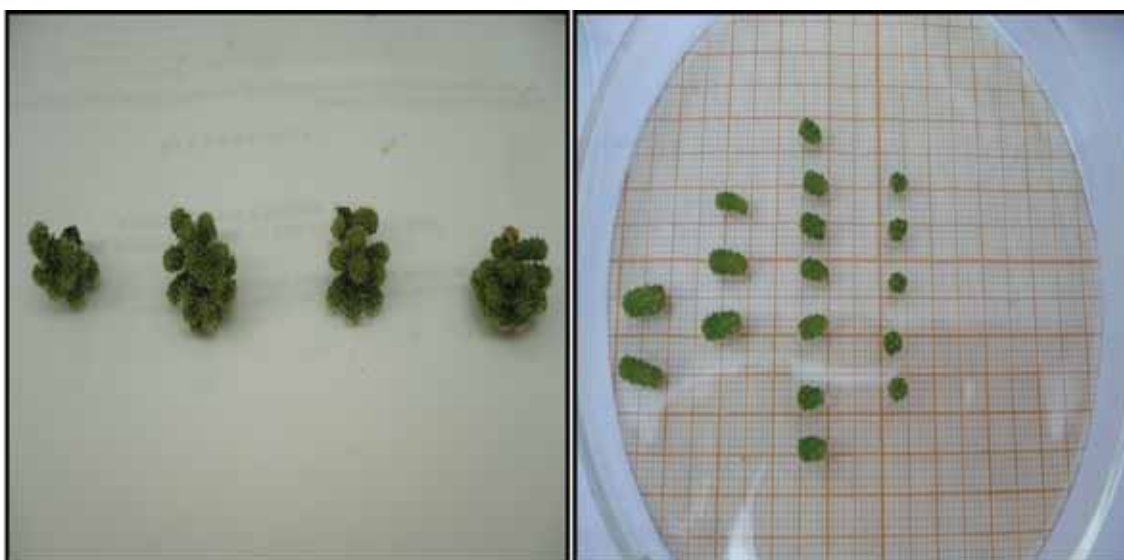


Figura 4. Brotes de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose obtenidos durante la etapa de multiplicación.

Figure 4. *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose shoots from the multiplication stage.

En la multiplicación *in vitro* de *E. micromeris* incide el MIB adicionado con fitohormonas. Así, cuando se le añaden 0.7 mM de BA + 0.06  $\mu$ M de AIB (T2) o con 1.2 mM de KIN + 1.03  $\mu$ M de AIB (T13), la tasa de multiplicación resulta ser exponencial de 1:11:11:11 hasta 1:15:15:15. Esta producción es significativa para la regeneración de la especie y permite incrementar rápidamente el número de plantas, en comparación con el método tradicional de propagación. Dicha tasa de multiplicación supera a las reconocidas para otros taxa, como *Mammillaria voburnensis* Scheer y *Mammillaria elongata* DC. (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002; Ordoñez, 2003); además, es mayor a la registrada en los géneros *Coryphantha*, *Echinocereus* (Clayton *et al.*, 1990) y en *Astrophytum myriostigma* Lem. (Villavicencio, 2009), en las cuales se consigna un valor de 1:10:10:10.

### Etapa 3. Enraizamiento *in vitro*

Incremento en altura del tallo (IAT). Con el tratamiento T2= MS al 50% + 1.5 x10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>-1</sup> y T3= MS al 50% + 3.0 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> se logró un efecto positivo en el IAT: al final del proceso de enraizamiento se generaron plantas con una altura de 2 y 3 cm, indicativo de que la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) aumentó la altura del tallo, a diferencia del testigo, sin la inoculación de la cepa, cuyo IAT resultó menor a 1.4 cm (Cuadro 5).

the regeneration of the species and lets a fast increment of the number of plants, compared to the traditional propagation method. This multiplication rate is over that acknowledged for other species such as *Mammillaria voburnensis* Scheer and *Mammillaria elongata* DC. (Papafotiou *et al.*, 2001; Pelah *et al.*, 2002; Ordoñez, 2003); also, it is higher than that recorded for the *Coryphantha* and *Echinocereus* genus (Clayton *et al.*, 1990) as well as in *Astrophytum myriostigma* Lem. (Villavicencio, 2009), in which a rate of 1:10:10:10 has been registered.

### Stage 3. *In vitro* rooting

Stem height increment (IAT). A positive effect over IAT came from the application of the T2 treatment = MS at 50% + 1.5x10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>-1</sup> and T3= MS at 50% + 3.0 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>: at the end of the rooting process, plants of 2 and 3 cm tall were formed, which means that the concentration of Colony Formation Units (UFC) increased the height of the stem, which differs from that of the control, which without the inoculation of the strain, reached an IAR under 1.4 m (Table 5).

Number of roots (NR). Treatments T2= MS at 50% + 1.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> and T3= MS a 50% + 3.0 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> were statistically the same and at the end of the process the highest NR was achieved (8.5 roots/plant), which is a different case from control, in which only 4 roots/plant were formed. Therefore, the greatest biofertilizer concentrations of *Azospirillum* sp. promote a symbiotic relation between the plant and the bacteria (Cuadro 7).

*Epithelantha micromeris* demands a 1.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> concentration to show the rhizogenic effect; the same thing happens in the *ex vitro* rooting of *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) V. John & Ríha,



Cuadro 5. Influencia de *Azospirillum brasilense* en el incremento de altura de tallo, longitud de raíz y número de raíces durante la micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose.Table 5. Effect of *Azospirillum brasilense* in the stem height increment, root length and number of roots during the micropropagation of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) A. Weber ex Britt. & Rose.

| Concentración                            | IAT    | LR     | NR   |
|--|--------|--------|------|
|  | (cm)   | (cm)   |      |
| Testigo                                  | 1.41 c | 1.63 c | 4 c  |
| 0.7x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 1.9 c  | 1.90 b | 7 b  |
| 1.5x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 3.1 a  | 2.30 a | 9 a  |
| 3.0x10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup> | 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 X 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> UFC, T2 = 1.5 X 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> UFC, T3 = 1.5 X 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. DMS = diferencia mínima significativa.

Means with the same letter among columns are not significantly different (Tukey 0.05).

IAT = stem height increment; NR = number of roots; LR = root length; Control (Testigo) = culture medium without inoculation .T1 = 0.7 X 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> UFC, T2 = 1.5 X 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> UFC, T3 = 1.5 X 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. DMS = minimum significant difference

Número de raíces (NR). Los tratamientos T2= MS al 50% + 1.5 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y T3= MS al 50% + 3.0 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> fueron estadísticamente iguales y al final del proceso se obtuvo el mayor NR (8.5 raíces/planta), caso distinto al del testigo, en el que se formaron solo 4 raíces/planta. Por lo tanto, las mayores concentraciones del biofertilizante de *Azospirillum* sp. promueven un efecto simbiótico entre la planta y la bacteria (Cuadro 7).

*Epithelantha micromeris* requiere de una concentración 1.5x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para que se presente el efecto rizogénico; lo mismo ocurre en el enraizamiento *ex vitro* de *Turbinicarpus knuthianus* (Boed.) V. John & Řiha, con un total de 6 raíces/planta formadas (Villavicencio *et al.*, 2011), y en *Capsicum chinese* Jacquin, aunque es relativamente menor a la usada en *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Canto *et al.*, 2004; Wyka y Hamerska, 2010).

Longitud de raíces (LR). La mayor LR (2.3 mm) se generó al final del proceso a partir del tratamiento T2= MS al 50% + 1.5 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>; en contraste, los tratamientos T1 y T3 fueron estadísticamente iguales con un valor de 1.9 cm, en promedio (Cuadro 5, Figura 5).

Las respuestas obtenidas en el enraizamiento *in vitro* de *E. micromeris* muestran que su simbiosis con *Azospirillum* favorecen cambios morfológicos y fisiológicos, así como la producción de hormonas de crecimiento, las cuales promueven el desarrollo de raíces con mayor longitud en menor tiempo, como lo refieren Puente y Bashan (1993) y Burdman *et al.* (2000).

El efecto rizogénico de la cepa bacteriana inoculada en una concentración de 1.5 x10<sup>6</sup> UFC L<sup>-1</sup> es similar a la usada en *Pinus pringlei* Shaw, en la que se consiguió un incremento del peso fresco de la planta hasta de 60% y la longitud de las raíces de 100%.

with a total number of 6 formed roots/plant (Villavicencio *et al.*, 2011) as well as in *Capsicum chinese* Jacquin, even though it is rather small that that used in *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Canto *et al.*, 2004; Wyka and Hamerska, 2010).

Root length (LR). The greatest (2.3 mm) appeared at the end of the process from the T2 treatment = MS at 50% + 1.5 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>; in contrast, T1 and T3 treatments were statistically the same with an average value of 1.9 cm (Table 5, Figure 5).

The *in vitro* rooting responses of *E. micromeris* show that their symbiosis with *Azospirillum* favor cambios morfológicos and physiological changes as well as the production of growth hormones, which promote the development of longer roots in a shorter time, as described by Puente and Bashan (1993) and Burdman *et al.* (2000).

The rhizogenic effect of the bacterial strain that was inoculated in a concentration of 1.5 x10<sup>6</sup> UFC L<sup>-1</sup> is similar to one used in *Pinus pringlei* Shaw, in which a fresh weight increment of the plant up to 60% and a root length of 100% were obtained.

The bacteria invaded the root system of *E. micromeris* for six weeks of incubation, a period calculated for their *in vitro* rooting.

According to Kapulnik *et al.* (1985), the application of 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> affects the number and total length of the root, while the inoculation of 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> inhibits their development. The rhizogenic effect of the inoculated strain to the ground in a 1.5 x10<sup>6</sup> UFC L<sup>-1</sup> concentration of *Azospirillum brasilense* is similar to that quoted for *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton *et* Rose). In *T. knuthianus*, the bacteria invaded its root system during the first 30 days of acclimatization, a time estimated as an adaptation phase (Pacovsky, 1985; Puente and Bashan, 1993).

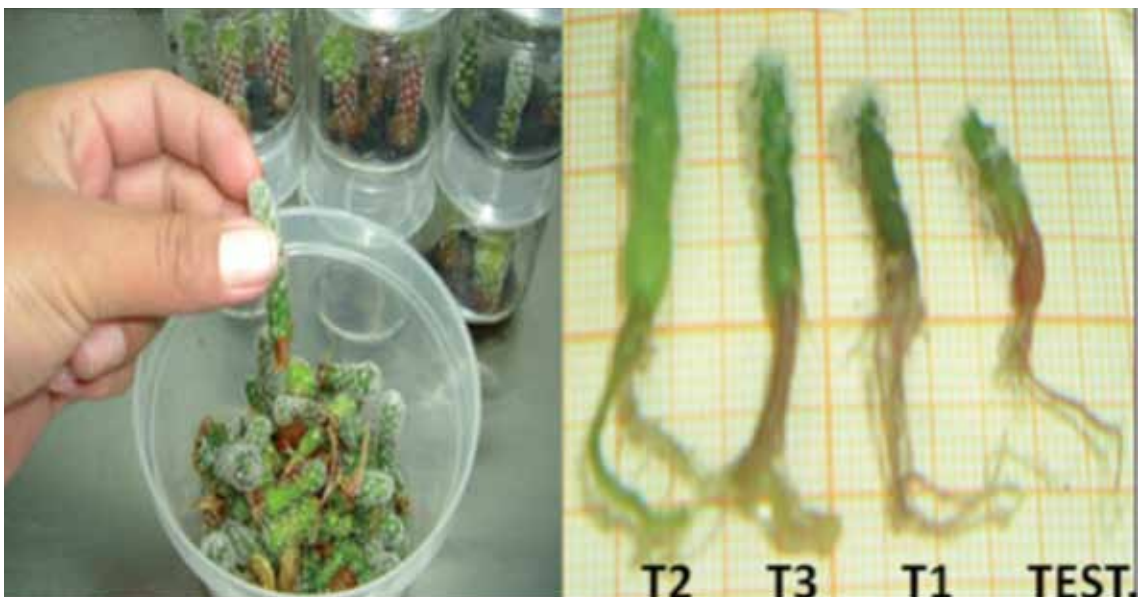


Figura 5. Efecto de *Azospirillum* sp. en el proceso rizogénico de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose.

Figure 5. Effect of *Azospirillum* sp. in the rhizogenic process of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose.

En cuanto a *E. micromeris*, la bacteria invadió su sistema radical durante las seis semanas de incubación, período considerado para su enraizamiento *in vitro*.

De acuerdo con Kapulnik *et al.* (1985), la aplicación de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  incide en el número y longitud total de raíz, en tanto que la inoculación de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  inhibe su desarrollo. El efecto rizogénico de la cepa inoculada al suelo en concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC  $\text{L}^{-1}$  de *Azospirillum brasilense* es similar al citado para *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton *et Rose*. Para el caso de *T. knuthianus*, la bacteria invadió su sistema radical en los primeros 30 días de aclimatación, tiempo estimado como fase de adaptación (Pacovsky *et al.*, 1985; Puente y Bashan, 1993).

#### Etapa 4. Aclimatación

Supervivencia. Las plantas enraizadas *in vitro* de cada tratamiento, aclimatadas en un sustrato estéril, preparado con corteza de coco y agrolita en relación 1:2, tuvieron diferencias significativas en la supervivencia. Aquellas inoculadas con la cepa T2 tuvieron un porcentaje de supervivencia superior a 91%; a diferencia de las plantas enraizadas *in vitro* con el tratamiento T1 y T3, con 82%. El porcentaje más bajo se alcanzó en las plantas *in vitro* sin la aplicación de la cepa (72 %) (Figura 6).

#### Stage 4. Acclimatization

Survival. The *in vitro* rooted plants of each treatment, acclimatized in a sterile substrate, which was prepared with coconut bark and agrolite in a 1:2 ratio, had significant differences in their survival. Those which were inoculated with the T2 strain had a survival over 91%; in contrast, the *in vitro* rooted plants with the T1 and T3 treatments, 82%. The lowest per cent belongs to the plants that had no *in vitro* application of the strain (72 %) (Figure 6).

The latter shows that the hardening and acclimatization stage in *E. micromeris* depends on the phases previous to micropropagation, since in the *in vitro* culture a morphogenic response is promoted, while in the acclimatization adaptive processes of the plant are reconstructed and developed, such as the lignification of some cuticular covers and stomatal activation as well as photosynthetic organs to achieve an autonomous development (Pacovsky, 1985; Puente and Bashan, 1993).

Therefore, the protocol of micropropagation and acclimatization of *E. micromeris* suggests that vitroplants feasible to adapt to heteromixotrophic conditions to which they are exposed during this process can be produced; also, it is important to highlight that their production and acclimatization lasted for eight months





Figura 6. Plantas de *E. micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose aclimatadas en invernadero.  
Figure 6. Acclimatized plants of *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F. A. C. Weber ex Britt. & Rose in a greenhouse.

Lo anterior muestra que la etapa de endurecimiento o aclimatación en *E. micromeris* depende de las fases anteriores de la micropropagación, pues 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 la lignificación de las cubiertas cuticulares y la activación de estomas y órganos fotosintéticos para lograr un desarrollo autónomo (Pacovsky *et al.*, 1985; Puente y Bashan, 1993).

Así, el protocolo de micropropagación y aclimatación de *E. micromeris* indica que pueden producirse vitroplantas susceptibles de adaptarse a las condiciones hetero-mixotróficas a las cuales están expuestas durante este proceso; asimismo, se destaca que su obtención y aclimatación en invernadero duró ocho meses.

## CONCLUSIONES

En especies con un número reducido de semillas, como *E. micromeris*, la pérdida de plántulas limita su regeneración en condiciones controladas; en consecuencia, la selección del medio de cultivo es importante en la etapa de establecimiento, dado que su efecto en dicho momento se refleja en las siguientes fases de la micropropagación.

La micropropagación es un método factible para regenerar especies de cactáceas, ya que produce vitroplantas de tamaño uniforme y con buena calidad fitosanitaria. Mediante el cultivo de tejidos vegetales y la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal es posible optimizar los procesos biológicos.

El uso de *Azospirillum brasilense* es una alternativa exitosa para el enraizamiento *in vitro* de *E. micromeris*, puesto que su aplicación aumenta la producción de plantas en más de 800%, en comparación con las técnicas tradicionales. 🌱

## CONCLUSIONS

In species that have a small number of seeds as *E. micromeris*, the loss of seedlings limits their regeneration under a controlled environment; consequently, the choice of the culture medium is important in the establishment stage, since its effect in such moment is reflected in the following phases of micropropagation.

Micropropagation is a feasible method to regenerate cacti species, since it produces vitroplants of a uniform size and a good phytosanitary quality. By plant tissue culture and the use of vegetal growth promoting microorganisms it is possible to optimize the biological processes.

The use of *Azospirillum brasilense* is a successful option for the *E. micromeris* *in vitro* rooting, as its application increases plant production in more than 800%, compared with traditional techniques. 🌱

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to the SNICS-SINAREFI for the financial support provided to the ORNCAC project from which the actual work came.

*End of the English version*



## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento y agradecimiento al SNICS-SINAREFI por el financiamiento del proyecto ORNCAC que dio origen al presente trabajo.



## REFERENCIAS

- 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.
- Burdman, S., Y. Okon and E. Jurkevitch. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* 26:91-110.
- Canto M., J. C., S. Medina P. y D. Morales A. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and subtropical Agroecosystems* 4 (1):21-27.
- Carletti S., M. E. Rodríguez C. A. y E. Llorente B. 2003. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la micropropagación de plantas. In: Albanesi, A., A. Anriquez, S. Luna, C. Kunst y R. Ledesma (Eds.). *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación Argentina.* Universidad Nacional de Santiago del Estero. Ciudad Santiago del Estero. Argentina. pp. 119-129.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger and G. Phillips C. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hor. Sci.* 115 (2):337-343.
- Corneanu, M. M., G. C. Corneanu and S. N. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. In: *Abstracts of the VII<sup>th</sup> International Congress on Plant Tissue and Cell Culture.* Amsterdam, The Netherlands. June 24-29, 1990. Abs. No. A3-66. p. 99
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). 1990. Appendices I, 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, DC. USA. 25 p.
- Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (CRGAA). 2011. Segundo informe del estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo. FAO. Roma, Italia. 372 p.
- Choreño T., J. M., H. González R., T. Terrazas S. y A. Hernández L. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 8 (2):183-196.
- Dabekausen, 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. Sci. Hort.* 46:283-294.
- Dávila, F. C. A., M. I. de la Rosa C. and E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 41:540-545.
- De la Rosa, I. M. y H. García. 1994. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. *Phyton-Int. J. Exp. Bot.* 56:147-150.
- Díaz-Zorita, M., R. M. Ballina, M. V. Fernández C and A. Peticari. 2004. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) with *Azospirillum brasilense* in the Pampas region, Argentina. In: *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Latin American Conference on Rhizobiology.* Rio de Janeiro, Brasil. p. 125.
- Dutra, D., T. R. Johnson, P. J. Kauth, L. S. Stewart, 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, Tissue and Organ Culture.* 94:11-21.
- Escobar, H. A. 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyklaea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de Méx. México. 80 p.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Focchetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. 2002. *In Vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95 (4):319-332.
- Hunt, D., N. Taylor and G. Charles. 2006. *The New Cactus Lexicon. Descriptions & Illustrations of The Cactus Family.* the International Cactaceae Systematic Group. Milborn Port, UK. Vol. I, 375 p. Vol. II, 526 p.
- Kapulnik, Y., Y. Okon and Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31:881-887.
- Kauth, P. J., W. A. Vendrame. and M. E. Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85 (1):91-102.
- Leszczyńska B., H. 1990. Potencial genético ornamental de la tierra mexicana. *Manual de Horticultura Ornamental No. 5.* Puebla, Pue. México. 40 p.
- Malda, G., H. Suzan and R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci. Hortic.* 81 (1):71-87.
- Mauseth, D. J. and W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* 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 polyacantha* (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.
- Mata R., M., A. Monroy-De la Rosa, K. Moebius-Goldammer and V. M. Chávez-Ávila. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 37:400-404.
- Minocha, C. S. and P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61 (2):168-173.
- Moebius-Goldammer K., M. Mata R and V. M. Chávez Á. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39 (4):388-393.
- Mohamed, Y. E. 2002. "Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 38, pp. 427-429.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Okon, Y. and C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- 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, 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. A. Kaushik, 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. M. E. Pérez R., E. Villalobos A., E. Meza R., I. Del Rio Morones R., H. J. Lizalde V. 1998. Propagation of 21 species of Mexican cacto by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34:131-135.
- Puente, M. E. and Y. Bashan. 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.



- 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: Ammirato, P. V., D. A. Evans, W. R. Shar and Y. P. S. Baja (Eds). Handbook of plant cell culture. Ornamental species. Vol. 5. McGraw-Hill New York. New York, NY. USA. pp. 32-39.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Anexo Normativo II. [http://www.inec.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec\\_nat/no\\_059a2g.html](http://www.inec.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_059a2g.html). (4 de marzo de 2011).
- Velázquez E., L. E. y R. Soltero Q. 2001. Micropropagación de *Ephithelantha micromeris* Engelm. Weber ex Britton et Rose. 46(3):56-62.
- Villavicencio G., E. E., A. Cano P., I. H. Almeyda L. y M. A. Arellano G. 2006. Nueva técnica para la producción comercial del bonete o birrete de obispo (*Astrophytum myriostigma* Lem.) Cactácea ornamental del desierto Chihuahuense. Campo Experimental Saltillo. CRNE-INIFAP. Folleto para productores No. 12. Saltillo, Coah. 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. CRNE-INIFAP. Folleto Técnico No. 39. Saltillo, Coah México. 42 p.
- Villavicencio G., E. E., A. Arredondo G., M. A. Carranza P., O. Mares A., S. Comparan S. y A. González C. 2010. Cactáceas ornamentales del Desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. Campo Experimental Saltillo. CRNE-INIFAP. Libro Técnico No. 2. Saltillo, Coah. 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. CRNE-INIFAP. Saltillo, Coahuila. México). p.13.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 59 (3):449-452.
- Wyka, T. P. and 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.