

Efecto de fitohormonas sobre explantes de mamilas juveniles de *Echinocactus grusonii* Hildm para la inducción de callogénesis *in vitro*  
Effect of phytohormones on explants of juvenile mamillas of *Echinocactus grusonii* Hildm for the induction of callogenesis *in vitro*

J. Dávila-Sandoval <sup>a,\*</sup>, D. Galván-Hernández <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Micología Integral, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, C.P. 42184.

## Resumen

*Echinocactus grusonii* es una cactácea endémica de México, sin embargo, se encuentra en riesgo debido a la colecta y comercialización por su valor ornamental. Se estableció un protocolo para la inducción de callogénesis *in vitro* a partir de mamilas de ejemplares juveniles de *Echinocactus grusonii* Hildm. Se evaluó el agente desinfectante NaClO a diferentes concentraciones y combinaciones con Tween 80, así como, se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (AIA y BAP) en medio MS al 50%. Se registró el porcentaje de contaminación, número total de callos por explante, porcentaje de callos, número promedio de raíces por explante. Los tratamientos de desinfección no presentaron diferencias significativas, el tratamiento de 1 mg/L BAP + 4 mg/L AIA permite obtener mayor número y porcentaje de callos (3.2 y 64%, respectivamente). Estos resultados son importantes para la propagación de cactáceas ornamentales a fin de reducir el consumo ilegal de estas.

**Palabras Clave:** explante, reguladores, ácido indol-3-acético, 6-bencilaminopurina, Murashige & Skoog.

## Abstract

*Echinocactus grusonii* is an endemic cactus of Mexico, however, it is at risk due to the collection and commercialization of its ornamental value. A protocol was established to induce callogenesis *in vitro* from mamillas of juvenile specimens of *Echinocactus grusonii* Hildm. The disinfectant NaClO agent was evaluated at different concentrations and combinations with Tween 80, as well as, different concentrations of growth regulators (IAA and BAP) in 50% MS medium were evaluated. The contamination percentage, the total number of calluses per explant, the rate of calluses, and the average number of roots per explant were recorded. The disinfection treatments did not present significant differences, the treatment of 1 mg/L BA + 4 mg/L IAA allows obtaining a more substantial number and percentage of calluses (3.2 and 64%, respectively). These results are essential for propagating ornamental cacti to reduce their illegal consumption.

**Keywords:** explant, regulator, indol-3-acetic acid, 6-benzylaminopurine, Murashige & Skoog.

## 1. Introducción

La familia cactácea tiene sus orígenes en el continente americano; teniendo una mayor diversidad en México con alrededor de 55 géneros y 850 especies endémicas (Mandujano *et al.*, 2002); su distribución actual no es homogénea, se restringe a zonas áridas o semiáridas del país (Miguel-Talonia *et al.*, 2014), también es común encontrarlas en diferentes tipos de ecosistemas tales como matorrales, pastizales, bosques tropicales y matorrales de dunas (Aguirre, 2016).

La especie *Echinocactus grusonii* Hildm. presenta una amplia distribución que va desde Querétaro hasta Hidalgo (Guzmán, 2003), sin embargo, debido a su endemismo, a la sobrecolecta y destrucción de su hábitat se encuentra en la categoría de en peligro de extinción “P” según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Rodríguez, 2006; DOF, 2010).

Por ello se requiere el desarrollo de estrategias para la conservación de este grupo de plantas, una alternativa son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales que permiten el crecimiento aséptico de las plantas o partes de esta bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, luz, entre

\*Autor para la correspondencia: dulce\_galvan11212@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: dulce\_galvan11212@uaeh.edu.mx (Dulce María Galván-Hernández), da334899@uaeh.edu.mx (José Emmanuel Dávila-Sandoval).

otras (Suárez-Padron, 2020). Una de las respuestas morfogénicas que podemos encontrar en la propagación *in vitro* es la callogénesis, el cual es un proceso de desdiferenciación y división celular intensiva formando una estructura llamada callo (Villareal, 2015), este proceso depende del tipo de explante, genotipo, medio de cultivo, reguladores de crecimiento, así como de la concentración y combinación de estos. El cultivo de callos puede ser utilizado para la micropropagación y el mejoramiento vegetal a partir de tejidos con alta diferenciación como raíces, tallo, hojas; o a partir de tejidos menos diferenciados como hipocótilos, cotiledones, embriones zigóticos maduros e inmaduros (Rodríguez et al., 2014).

En cactáceas se han realizado diversos trabajos de propagación *in vitro*, un ejemplo son los desarrollados en *Turbincarpus laui* (biznaga como invertido), *Pelecypora aselliforfis* (peotillo), *A. myriostigma* (birrete de obispo), y *Echinocactus platycanthus* (biznaga burra), entre otras (Rodríguez, 2006; Mendoza, 2007). En *E. parryi* se ha inducido organogénesis directa a partir de epicótilos (García-González et al., 2021a), en *E. grusonii* se han realizado estudios de escarificación de la semilla para la micropropagación *in vitro* (Correia and Bernardo, 2020), en *E. mihanovichii* y *Echinopsis chamaecereus f. lutea* se ha logrado la propagación a partir de mini brotes obtenidos de la planta madre vía organogénesis (Vidican et al., 2020), o en *Echinocactus parryi* se ha obtenido organogénesis a partir de explantes como semillas, brotes y callos (García-González et al., 2021b), pese a estos ejemplos, ningún estudio se ha enfocado en la inducción de organogénesis indirecta a partir de la callogénesis en *Echinocactus grusonii*, por tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la inducción de callogénesis libre de patógenos a partir de mamilas de ejemplares juveniles de *E. grusonii* mediante el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a fin de ser empleado para la micropropagación de la especie.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Obtención del material biológico

Se seleccionaron ejemplares vivos de *E. grusonii* provenientes del jardín botánico “Cactáceas México”. Las plantas presentaron un tamaño de diámetro aproximado de entre 15 y 20 cm (Figura 1A). La selección del explante consistió en mamilas jóvenes y sanas provenientes de la zona central de la planta donadora los cuales destacan por presentar un tamaño más grande que las presentes en la zona del ápice y la base, las cuales incluían sus areolas; las mamilas seleccionadas presentaron un color verde intenso (Figura 1D); se retiraron las espinas y se realizó un corte profundo procurando no cortar los anillos vasculares para garantizar su posterior cicatrización según lo recomendado por Adema (2015).

### 2.2. Desinfección del explante

La desinfección se realizó según lo propuesto por Pariani (2015) con algunas modificaciones. Los explantes se enjuagaron con abundante agua corriente para retirar cualquier residuo sólido, se pasaron a una solución jabonosa mantenida en agitación constante por 10 minutos, al finalizar el tiempo se desechó la solución, posteriormente se transfirió el material

dentro de una campana de flujo laminar ThermoScientific previamente desinfectada, se agregó una solución de alcohol al 70% y se mantuvo en agitación por 40 seg., se desechó el alcohol, siendo hasta este punto el tratamiento para control, y para el resto de los explantes el tejido se pasó a una solución bactericida (10 gotas de Microdyn en 25 ml H<sub>2</sub>O) donde se mantuvo en agitación constante por 15 minutos, pasado ese tiempo se transfirieron a una solución de fungicida (Captán 50 al 2% p/v) mantenida en agitación constante durante 5 minutos para posteriormente realizar la evaluación de los diferentes métodos de desinfección 1) NaClO 1%, 2) NaClO 1% + Tween 80, 3) NaClO 0.5%, 4) NaClO 0.5% + Tween 80, 5) Control positivo (sin desinfectante) por 15 minutos en agitación continua.

Al finalizar el tiempo, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril en agitación constante por 1 minuto para cada uno de los cinco tratamientos; se realizaron 2 cortes transversales en cada mamila para colocar 4 explantes por frasco, el tejido que presentó clorosis fue eliminado. Cada tratamiento se realizó con cinco réplicas, cada frasco corresponde a una unidad experimental. Los explantes se incubaron a una temperatura constante entre 25 y 30° C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz-oscuridad y una humedad atmosférica entre el 80 y 90% (Pariani, 2015).

Se consideró como variable de respuesta el porcentaje de contaminación, el cual se calculó tomando el número de explantes contaminados entre el número de explantes totales, multiplicado por 100 para cada unidad experimental, posteriormente se obtuvieron los promedios por tratamiento.

### 2.3. Medio MS y barrido hormonal

Para la preparación del medio se utilizó sacarosa (30 gr/L), macro y micronutrientes de acuerdo con la formulación del medio de cultivo MS al 50%, y carbón activado (2 mg/L), se aforó al volumen final y ajustó el pH a 5.7-5.8 con NaOH 1N o HCl 1N. Finalmente, se agregó agar (7 gr/L) manteniendo en agitación y temperatura constante hasta su disolución. A cada frasco se agregaron 25 ml de medio MS 50%, se taparon con papel aluminio y ajustaron con una banda elástica, posterior a ello, se esterilizaron a 120°C por 20 minutos con 1 atmósfera de presión.

Se realizó un barrido hormonal para identificar las concentraciones adecuadas de auxina (ácido indol acético AIA) y citoquinina (bencil amino purina BAP) capaces de producir el crecimiento de callos (Ferreira et al., 2006; Bouamama et al., 2011; Lema-Ruminska et al., 2013; García-González et al., 2021b). Para esto se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) 0.5 mg/L BAP + 2 mg/L AIA, 2) 0.5 mg/L BAP + 4 mg/L AIA, 3) 0.5 mg/L BAP + 6 mg/L AIA, 4) 1 mg/L BAP + 2 mg/L AIA, 5) 1 mg/L BAP + 4 mg/L AIA, 6) 1 mg/L BAP + 6 mg/L AIA, 7) Control negativo, al cual no se adicionaron reguladores de crecimiento al medio MS al 50%, considerándose como variable de respuesta el crecimiento de callo.

Cada tratamiento se realizó con 10 repeticiones, se consideró cada frasco como unidad experimental, el cual contenía cinco explantes de mamila. Se sometieron a las condiciones de incubación mencionadas previamente hasta alcanzar un periodo de 30 días, posterior a este tiempo se revisó la formación de callos para seleccionar los tratamientos con

mejor respuesta de crecimiento, se tomo como criterio de selección la formación de una masa celular irregular verdosa.

### 2.4. Inducción de callo

Para la inducción de callo se seleccionaron únicamente los tratamientos que brindaron respuestas favorables al crecimiento en el barrido hormonal, se incluyó un control negativo. Para cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones, considerando a cada frasco como unidad experimental, el cual contenía 5 explantes de mamilas. Se sometieron a las condiciones de incubación mencionadas previamente; a los dos meses se midió el crecimiento de callos para seleccionar el mejor tratamiento. Se calculó el promedio de callos por explante, el número de raíces por explante y el porcentaje de crecimiento de callos, considerando para este último el número total de explantes que formaron callo entre el número total de explantes multiplicado por 100.

### 2.5. Análisis estadístico

Se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una prueba posterior de Mann-Whitney para comprobar diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección, y los tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, y el número de raíces. Se aplicó una prueba paramétrica de Tukey's para determinar diferencias entre los tratamientos con mejor respuesta al crecimiento y número de callos.

## 3. Resultados

### 3.1. Método de desinfección

No existen diferencias significativas entre los cinco tratamientos de desinfección ( $F= 1.775$ ,  $gl= 9.6$ ,  $p > 0.05$ ); es decir, los tratamientos con desinfectantes presentaron contaminación al igual que el grupo control que no tenía desinfectante. En la tabla 1 se observa el porcentaje de contaminación por tratamiento, cabe destacar que los tratamientos de NaClO al 1% y NaClO 1% + Tween 80 permitieron reducir los porcentajes de contaminación, por tanto, utilizar cloro al 1% más Tween 80 es adecuado para disminuir la infección por patógenos en mamilas de *E. grusonii*.

Tabla 1: Evaluación del método de desinfección con diferentes concentraciones de NaClO

Tratamiento	% de contaminación*
1% NaClO	4 <sup>a</sup>
1% NaClO + Tween 80	4 <sup>a</sup>
0.5% NaClO	24 <sup>a</sup>
0.5% NaClO + Tween 80	36 <sup>a</sup>
Control positivo	36 <sup>a</sup>

\*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes.

### 3.2. Evaluación del barrido hormonal

Posterior a los 30 días de incubación, de los siete tratamientos evaluados en el barrido hormonal, se demostró que los mejores para obtener callos con una coloración verdosa, así como mayor número y tamaño de estos fueron 0.5 mg/L de BAP + 6 mg/L AIA, 1 mg/L BAP + 4 mg/L AIA y 1

mg/L BAP + 6 mg/L AIA ( $H=15.3$ ,  $P= 0.0002$ ,  $N=70$ ,  $t=7$ ) (ver Tabla 2) (Figura 1B y C).

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la fenolización ( $H= 3.85$ ,  $p= 0.42$ ;  $N= 70$ ,  $t= 7$ ); todos los tratamientos presentaron oxidación en los explantes a pesar de la adición de carbón activado al medio de cultivo, por tanto, se requiere la utilización de otros agentes antioxidantes que ayuden a disminuir la oxidación del callo (Figura 1G).

Tabla 2: Número de callos obtenidos a partir de un barrido hormonal con diferentes concentraciones de BAP y AIA

Tratamiento	Número promedio de callos*	Tamaño	% Fenolización *
0.5 mg/L de BAP + 2 mg/L AIA	0 <sup>bc</sup>	-	10 <sup>a</sup>
0.5 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA	0 <sup>bc</sup>	-	10 <sup>a</sup>
0.5 mg/L de BAP + 6 mg/L AIA	0.7 <sup>abd</sup>	Pequeño-Grande	10 <sup>a</sup>
1 mg/L de BAP + 2 mg/L AIA	0.2 <sup>bc</sup>	Pequeño-Mediano	30 <sup>a</sup>
1 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA	1.2 <sup>a</sup>	Pequeño-Grande	10 <sup>a</sup>
1 mg/L de BAP + 6 mg/L AIA	0.1 <sup>bcd</sup>	Mediano	10 <sup>a</sup>
Control negativo	0.3 <sup>bcd</sup>	Pequeño	50 <sup>a</sup>

\*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes ( $P > 0.5$ ).

### 3.3. Callogénesis

Las concentraciones de 1 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA y 1 mg/L de BAP + 6 mg/L AIA fueron las elegidas para inducir el crecimiento de los callos debido a que inicialmente estos presentaron un mayor número en un periodo de dos meses (Figura 1E y F). De los dos tratamientos, aquel que contenía 1 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA permitió obtener mayor número de callos ( $F= 5.855$ ,  $gl= 7.39$ ,  $p < 0.05$ ) y mayor porcentaje de crecimiento de callos ( $F= 4.27$ ,  $gl= 14$ ,  $p < 0.05$ ). Por otro lado, en lo que respecta al número y crecimiento de raíces, ningún tratamiento mostró diferencias significativas en el lapso de un mes ( $H= 3.55$ ,  $p= 0.098$ ;  $N= 15$ ,  $t= 3$ ) (Tabla 3).

Tabla 3: Inducción del crecimiento de callos y raíces en dos concentraciones de AIA

Tratamiento	Número total de callos por explante	% de callos*	Número promedio de raíces por explante
1 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA	3.2 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>
1 mg/L de BAP + 6 mg/L AIA	2.2 <sup>b</sup>	44 <sup>ab</sup>	0.24 <sup>a</sup>
Control negativo	0.8 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>

\*Valores con letras iguales no son estadísticamente diferentes ( $P > 0.5$ ).

## 4. Discusión

La inducción de callogénesis se obtuvo a partir de la combinación de reguladores de crecimiento con BAP y AIA a

partir de mamilas de individuos juveniles de *Echinocactus grusonii*. El uso de hipoclorito de sodio a una concentración de 1 % permite disminuir la presencia de patógenos en el medio de cultivo durante los primeros días; posterior a un mes de incubación, se apreció contaminación principalmente por hongos, levaduras y bacterias.

Los desinfectantes son agentes antimicrobianos principalmente de tipo químico, capaces de eliminar gérmenes depositados sobre el material vegetal (Ramos-Meléndez and Ramos-Perfecto, 2015). Para el cultivo *in vitro* de mamilas de *E. grusonii*, es recomendable realizar una cadena de desinfección que incluya el uso de alcohol al 70%, bactericida, fungicida, NaClO y agentes surfactantes como el Tween 80.

El hipoclorito de sodio (NaClO), es el reactivo más utilizado en un tren de desinfección para el cultivo *in vitro* de especies vegetales. El mecanismo de acción del NaClO es inhibir enzimas esenciales de los microorganismos al oxidar los grupos tiol (S-H) causando cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Echeverría *et al.*, 2007); se ha observado que a mayor concentración y tiempo de exposición la efectividad del desinfectante es mejor, tal como se observó en el presente estudio; sin embargo, a su vez puede producir un efecto fitotóxico en los tejidos (Borges *et al.*, 2009), esto reduce el crecimiento del explante o incluso provocar necrosamiento del tejido.

El método de desinfección implementado en este estudio ha sido utilizado en la micropropagación de semillas de *E. grusonii* (Rodríguez, 2006), *E. parryi* (García-González *et al.*, 2021) y en *Opuntia ficus-indica* (Bouamama *et al.*, 2011) logrando cultivos libres de patógenos.

En un estudio similar donde se utilizó NaClO al 1% por 10 minutos de exposición en explantes de *Carica papaya* (papaya) se presentó 39.8% de contaminación por hongos y bacterias, al igual que el tratamiento adicionado con alcohol al 70% por 30 segundos donde se obtuvo una contaminación del 21% (Ticona *et al.*, 2019). En el presente estudio, las mismas condiciones de concentración y tiempos de exposición permitieron reducir la contaminación hasta un 4%, siendo altamente efectivo en mamilas de *E. grusonii*.

Los alcoholes son compuestos solubles al agua que actúan destruyendo la membrana celular y desnaturalizando las proteínas, por tanto, es un bactericida de acción intermedia frente a bacterias gram negativas y positivas (Ramos-Meléndez and Ramos-Perfecto, 2015). El alcohol al 70 % es ampliamente utilizado para la desinfección de explantes en cultivo *in vitro* de cactáceas, se ha probado que esta concentración en conjunto con hipoclorito de sodio, permite reducir la contaminación hasta del 10.5 % y 5.5 % en semillas cultivadas *in vitro* de *Echinocactus platyacanthus* y *E. chiotilla* (Villanueva *et al.*, 2016). En este trabajo, se utilizó alcohol al 70 % como parte del tren de desinfección general de las mamilas de *E. grusonii*, sin embargo, podría ampliarse el tiempo de exposición a 2 minutos como máximo en lugar de 40 segundos tal como se utilizó en este estudio.

En ocasiones, se utilizan tensoactivos como el Tween en conjunto con el NaClO para potenciar su efecto desinfectante, principalmente en tejidos con estructuras como espinas, tricomas, o semillas rugosas. El Tween es un tensoactivo no iónico que en disoluciones acuosas tienden a agregarse formando micelas que son lipofílicas por dentro e hidrofílicas por el exterior, debido a esta característica anfifílica puede reducir la tensión superficial de los solventes (Pérez-Rosés *et*

*al.*, 2014) lo que permite una mejor penetración del agente desinfectante.

Por ejemplo, el uso de NaClO al 3% + Tween 80 con un tiempo de exposición de 15 minutos en *Swietenia macrophylla* (caoba), permite obtener contaminaciones hasta de un 13.33%, si se aumenta el tiempo de exposición a 20 minutos, la contaminación se reduce hasta un 6.67 %, aunque se presenta un 40% de explantes necrosados (Campos *et al.*, 2020). Esto demuestra que, a mayor concentración y tiempo de exposición, se disminuye la contaminación de patógenos, pero aumenta la presencia de tejido necrosado. Pese a que en el presente trabajo se logró disminuir la incidencia de contaminación por patógenos (hongos y bacterias), esta fue persistente; por lo que se adicionaron agentes bactericidas y fungicidas.

El uso de bactericidas y fungicidas se recomienda para el control de la contaminación *in vitro* proveniente de la planta madre, el explante o el medio de cultivo (Bogado *et al.*, 2016). El Microdyn actúa como un bactericida de amplio espectro cuyo compuesto principal es la plata ionizada o coloidal, un coloide es una sustancia que permanece suspendida en una solución, este puede combinarse con grupos químicos sulfhídrico, carboxilo, fosfato y amino de las proteínas, modificando sus propiedades físicas (Mendoza, 2004). Algunos trabajos mencionan que la plata tiene una alta reactividad con compuestos de azufre, reaccionando con enzimas que contienen este compuesto (Morones, 2009).

Por su parte, los fungicidas son productos químicos capaces de disminuir el desarrollo y crecimiento de hongos. El Captán 50 es un fungicida protectante de amplio espectro, es decir, actúa por contacto (Melgarejo, 2011). Reacciona con enzimas sulfhidrílicas con producción de tiofosgeno, sustancia tóxica para las células fúngicas, interfiere en el proceso de respiración celular en los hongos inhibiendo la germinación de las esporas (Adama, 2023). Los fungicidas protectantes tienen baja capacidad de penetración dentro del huésped, sin embargo, en caso de que llegasen a penetrar, pueden resultar tóxicos para la planta (Melgarejo, 2011), por esta razón un tiempo de exposición prolongado del explante a la solución de fungicida puede ocasionar daño en el tejido o impedir el desarrollo de este.

#### *Establecimiento de explantes*

Una de las formas de propagación más utilizada en cactáceas es por vía sexual (a través de semillas) y/o vegetativa (a través del enraizamiento de hijuelos o esquejes). La propagación por semillas es insuficiente para cubrir las demandas de plantas tanto para reintroducción o comercialización debido al tiempo de producción, disponibilidad y viabilidad de los propágulos. Por su parte, para el uso de esquejes se requiere del desarrollo de nuevos brotes, lo cual puede llegar a ser de lento crecimiento para algunas especies (Fuentes, 2017).

En cultivo *in vitro* los explantes más utilizados han sido las yemas axilares, discos de la hoja, secciones de raíz y meristemas, de preferencia provenientes de plantas jóvenes o con crecimiento activo, tal como se utilizó en este estudio, ya que se ha observado que entre más indiferenciado este el tejido, mejor respuesta. También se ha visto que entre más pequeño el explante, tendrá una mejor respuesta a la regeneración (Adema, 2015).

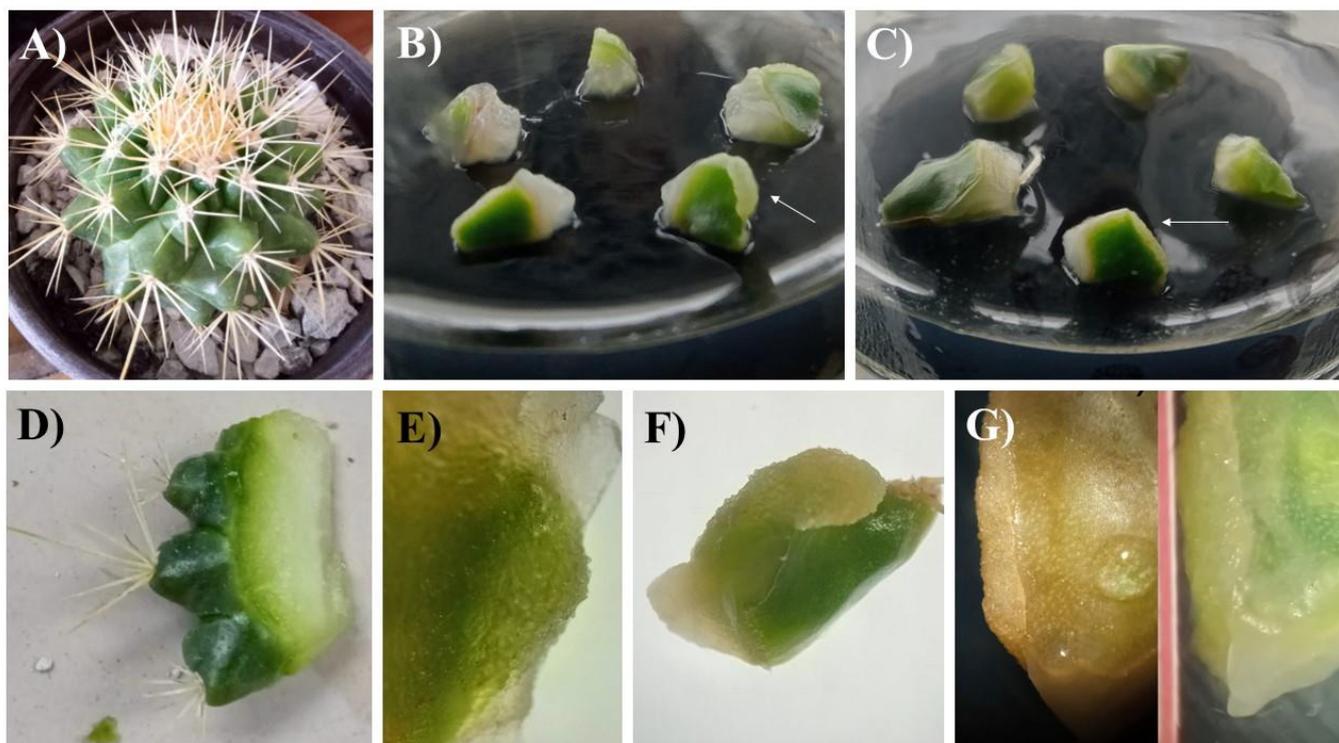


Figura 1: Inducción de callogénesis en *Echinocactus grusonii*. A) Planta madre de *E. grusonii*. B) Inducción de callogénesis a 1 mg/L BAP + 4 mg/L AIA. C) Inducción de callogénesis a 1 mg/L BAP + 6 mg/L AIA. Flechas blancas señalan el crecimiento de callos. D) Corte de mamilas como fuente de explantes. E) y F) Crecimiento de callos en mamilas. G) Fenolización de los explantes (izquierdo), callos de coloración verdosa (derecho).

En cactáceas, la mayoría de los tallos presentan hendiduras longitudinales las cuales producen unas crestas llamadas costillas, a su vez, están divididas por hendiduras transversales formando las mamilas donde se ubican las areolas, que son elementos semejantes a las yemas existentes en los tallos de las demás dicotiledóneas (Ceroni y Castro, 2013), y por tanto, son tejidos altamente indiferenciados e ideales para utilizarlos como fuente de explantes; es por esto, que la formación de callos en tratamientos aun sin la adición de reguladores de crecimiento tienen la capacidad de generar diferentes estructuras, tal como se observó en el presente trabajo mediante la evaluación del barrido hormonal. Una respuesta similar fueron los estudios de García-González *et al.* (2021b) quienes obtuvieron callos sin la presencia de la auxina 2, 4-D en explantes de *E. parryi*.

Es importante probar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para el establecimiento de los explantes ya que nos permite identificar las cantidades adecuadas para inducir una respuesta morfogenética, tal como lo presenta Lema-Ruminska *et al.* (2013), quienes obtuvieron embriones somáticos de *Copiapoa tenuissima* a partir de callos crecidos en diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) a 0, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  teniendo porcentajes de 66.7, 83.6, 66.7 y 83.6 % respectivamente; observaron que una menor concentración de la auxina permite un buen desarrollo en el peso fresco del callo, pero a mayor concentración de ABA disminuye la tasa de proliferación.; un trabajo similar fue el de Bouamama *et al.* (2011) quienes utilizaron 2 mg/L de 2, 4-D + 2.5 mg/L de la citoquinina thidiazuron (TDZ) obteniendo mayor número de embriones somáticos a partir de callos en *Opuntia ficus-indica*. Algunas especies requieren cantidades

pequeñas de auxinas para la inducción y mantenimiento de los callos, tal como ocurre en la especie *Cereus peruvianus* (De Oliviera *et al.*, 1995). Esto difiere de los resultados obtenidos en el presente trabajo debido a que no se registró crecimiento a concentraciones menores de AIA.

#### *Inducción de callogénesis*

El establecimiento de los explantes es importante para la inducción de respuestas morfogenéticas tanto directa como indirecta. En este estudio se logró la inducción de callogénesis, una respuesta morfogenética indirecta que permite tener una gran diversidad de aplicaciones en el cultivo *in vitro*, por ejemplo, el desarrollo de embriones somáticos. Se estableció que a 1 mg/L de citoquinina (BAP) y mayor concentración de la auxina AIA (4 y 6 mg/L) se pueden obtener mayor porcentaje de callos (64% y 44%, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por García-González *et al.* (2021), quienes obtuvieron mayor número de callos embriogénicos en *E. parryi* a la concentración de 6 mg/L (79.05%) y 4 mg/L (49.08%) de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) en medio basal MS después de 30 días de cultivo, a pesar de utilizar como fuente de explantes la zona central o media de la planta, tal como se utilizó en el presente estudio.

En *E. grusonii* se observaron callos de coloración verde, aunque conforme transcurría el tiempo de incubación, algunos se tornaban marrones (Figura 1G), esto también fue observado en *Opuntia ficus-indica* (Bouamama *et al.*, 2011) cuando posterior de 4 a 5 subcultivos, los callos cultivados en medio MS al 50% adicionado con 1% de carbón activado, 2 mg/L de

2, 4-D y 2.5 mg/L de TDZ se tornaban marrones lo cual imposibilitaba la producción de embriones somáticos.

Lema-Ruminska et al., (2013) menciona que a una mayor concentración de auxina cambia la coloración del callo (de verde a amarillo-marrón) y disminuye la tasa de proliferación; es probable que este efecto sea similar al observado en los callos de *E. grusonii* donde se apreció una disminución en el crecimiento a mayor concentración de auxina, por tanto, el tratamiento de 1 mg/L de BAP + 4 mg/L AIA es el más favorable para obtener callos sin que presenten el problema de oxidación del tejido. En *E. grusonii* se obtuvieron 3.2 callos por explante, resultado favorable comparado con el estudio realizado en *Opuntia ficus-indica* (Ferreira et al., 2006) donde la concentración de 4 mg/L de picloram (auxina) permiten la inducción de 1.33 callos con embriones somáticos; esto permite un gran número de aplicaciones a futuro entre los que destacan el desarrollo de embriones somáticos o la formación de semillas sintéticas con fines de propagación masiva, no obstante, en *E. grusonii* se requiere explorar a largo plazo los resultados del crecimiento de los callos con la concentración de 4 mg/L de AIA o en su defecto, probar con otro tipo de auxinas para valorar la respuesta morfogénica de los callos.

## 5. Conclusiones

Se logró establecer el cultivo *in vitro* de mamilas a partir de individuos juveniles de *Echinocactus grusonii*, si bien, la concentración de 1% de hipoclorito de sodio con la adición de Tween 80 no elimina en su totalidad al agente patógeno (bacterias y hongos), puede reducir su presencia hasta un 4%.

La combinación de reguladores de crecimiento de 1 mg/L BAP + 4 mg/L AIA permite obtener un mayor número y porcentaje de callos (3.2 y 64%, respectivamente), así mismo, esta combinación favorece la presencia de un callo de coloración verdosa lo cual es favorable para el desarrollo de otras aplicaciones del cultivo *in vitro* en *Echinocactus grusonii* para favorecer la conservación y comercialización sustentable de la especie.

## Agradecimientos

Agradecemos al jardín botánico Cactáceas México por facilitar los ejemplares de *E. grusonii* que fueron utilizados en el presente proyecto.

## Referencias

Adama., (2023) Captan 50 WP. Ficha técnica de productos fitosanitarios. <http://www.adama.com/mexico>

Adema, M., (2015). ¿Por dónde empezamos?. En: Sharry, S., Adema, M. & Abedini W (Eds.). Plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp, Bolivia, pp. 81-91.

Aguirre, A., (2016). Distribución espacial de especies de cactáceas en la región del desierto chihuahuense. Tesis de maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.

Bogado, F., Vera, B. C., Ayala, P., Sansberro, P., Luna, C., (2016). Uso de distintos desinfectantes auperficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. Ciencias Agronómicas 16, 011-016.

Borges, G. M., Estrada, A. E., Pérez, R. I., Meneses, R. S., (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología 11(2), 127-135.

Bouamama, B., Salem, A., Zoghalmi, N., Zemni, H., Mliki, A., Ghorbel, A., (2011). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature anthers of *Opuntia ficus-indica*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 86(4), 313-318. DOI: 10.1080/14620316.2011.11512766

Campos, J., Arteaga, M., Campos, S., Chico, J., Cerna, L., (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). Arneldao 27(1), 86-94. DOI: 10.22497/arnaldoa.271.27107

Ceroni, S. A. H., Castro, C. V., (2013). Manual de cactus, identificación y origen. Dirección General de Diversidad Biológica. Ministerio del Ambiente, Perú, 29 p.

Correia, D., Bernardo, J. C., (2020). Propagação *in vitro* de *Echinocactus grusonii*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 206. Embrapa Agroindústria Tropical. pp 22.

De Oliveira, S. A., Da Silva Machado, M. F. P., Priolo, A. J., Mangolin, C. A., (1995). *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 31: 47-50.

Diario Oficial de la Federación, (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. pp 77.

Echeverría, P. L. C., Cifuentes, O. G. C., Granados, R. J. M., Arias, P. J., Fernández, L. C., (2007). Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en industria farmacéutica. Revista Cubana de Farmacia 41(2). 0-0.

Ferreira, F., Fernandes, F., Barbeto, P., Facó, O. & Paiva, F. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). Scientia Horticulture 108. 15-21. DOI: 10.1016/j.scienta.2005.12.007

Fuentes, M. A., (2017). Propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas amenazadas. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, México, 83 p.

García-González, D. A., Santos-Díaz, M. S., Flores-Margez, J. P., Osuna-Ávila, P., (2021a). Influencia del Ca<sup>2+</sup>, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Echinocactus parryi* (Engelm.). Terra Latinoamericana 38(3), 489-498. DOI: 10.28940/terra.v38i3.734

García-González, D. A., Santos-Díaz, M. S., Flores-Margez, J. P., Osuna-Ávila, P., (2021b). Effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from different explants of *Echinocactus parryi* Engelm., an endemic and endangered species. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales 27(3): 431-447. DOI: 10.5154/r.rchscfa.2020.08.053

Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P., (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas. Primera ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 247.

Lema-Ruminska, J., Goncerzewicz, K., Gabriel, M., (2013). Influence of abscisic acid and sucrose on Somatic Embryogenesis in cactus *Copiopa tenuissima* Ritt. Forma *mostruosa*. The Scientific World Journal 2013, 1-7. DOI: 10.1155/2013/513985

Mandujano, M., Golubov, J. & Reyes, J. (2002). Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. Biodiversitas 6(40), 4-7.

Melgarejo, G. J., (2011). Mecanismo de acción de los fungicidas. Revista Ventana al Campo Andino 15, 193-202.

Mendoza, G. (2007). Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de grado. Área Académica de Biología. Universidad del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.

Mendoza, D. S., González, S., Ruíz, R., Robles, R., Hernández-Baumgarten, E., Soto, N., Ciprián, C. A., Mendoza, E. S., (2004). Estudio por microscopia electrónica del efecto de plata coloidal sobre *Escherichia coli* y *Streptococcus suis*. Memoria Congreso Nacional AMVEC.

Miguel-Talonia, C., Téllez-Valdés, O., Murguía-Romero, M., (2014). Las cactáceas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. Revista Mexicana de Biodiversidad 85, 436-444. DOI: 10.7550/rmb.31390

Morones, R. R., (2009). El uso de la plata en los antibióticos del futuro. Revista Digital Universitaria 10(10). <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num10/art69/int69.htm>

Pérez-Rosés, R., Risco, E., Vila, R., Peñalver, P., Cañigueral, S., (2014). Antioxidant activity of Tween-20 and Tween-80 evaluated through different *in-vitro* tests. Journal of Pharmacy and Pharmacology 67, 666-672. DOI: 10.1111/jphp.12369

Pariani, S. (2015). Condiciones ambientales de cultivo y asepsia. En: Sharry, S., Adema, M. & Abedini W (Eds.). Plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp, Bolivia, pp. 73-80.

- Ramos-Meléndez, A., Ramos-Perfecto, D., (2015). Efectividad de diferentes agentes antimicrobianos en la desinfección de conos de gutapercha. *Odontología Sanmarquina* 18(1), 19-22.
- Rodríguez, M., (2006). Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de grado. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- Rodríguez, B. M., Latsague, V. M. I., Chacón, F. M. A., Astorga, B. P. K., (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)* 35(1), 111-118. DOI: 10.4067/S0717-92002014000100011
- Suárez-Padron, I. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Colombia.
- Ticona, J., Triguero, M. L., (2019). Evaluación de tres métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de papaya (*Carica papaya* L.) En la estación experimental Sapecho. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales* 6(1), 24-29.
- Vidican, I. T., Lazár, A. N., Iancu, C. V., Carbuñar, M., (2020). Comparative study on regenerative and organogenic capacity of *Echinocactus mihanovichii* and *Echinopsis (Zucc.) chamaecereus f. lutea* cultivation *in vitro* in the presence in the cultural medium of 3-indutyl butyric acid (aib) added in different concentrations. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula: Protectia Mediului* 34: 143-152. DOI: 10.5281/zenodo.4362296
- Villanueva, R. M., Navarro, M. C., Eliosa, H. R., (2016). Germinación de tres especies de cactáceas endémicas de México en condiciones asépticas 16(1), 1-16. DOI: 10.21704/za.v16i1.633
- Villareal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas *in vitro*? En: Sharry, S., Adema, M. & Abedini W (Eds.). *Plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Edulp, Bolivia, pp. 92-101.