

## Multiplicación in vitro del barril de oro (*Echinocactus grusonii* Hildm.) (FAM.: CACTACEAE)

### Multiplication in vitro of gold barrels (*Echinocactus grusonii* Hildm.) (FAM.: CACTACEAE)

E. Edith Villavicencio-Gutiérrez<sup>1\*</sup>, Gregorio Arellano-Ostoa<sup>2</sup>, Antonio Cano-Pineda<sup>1</sup>,  
Julio C. Ríos-Saucedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Campo Experimental Saltillo.

Hacienda de Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

<sup>2</sup>Colegio de Posgraduados. Fruticultura, Campus Montecillo. Texcoco, Edo. México.

<sup>3</sup>INIFAP-Valle del Guadiana, Durango, México.

\*Autor para correspondencia: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

## RESUMEN

Por la importancia ecológica, social y económica que tiene este recurso fitogenético, se utilizó el cultivo de tejidos vegetales para definir el tratamiento que permite obtener el mayor número de brotes en la etapa de multiplicación in vitro de la biznaga barril de oro (*E. grusonii*). Se utilizó el medio MS (Murashige, 1974) al 50% de macrosales estableciendo segmentos nodales con yemas axilares como explante. Con un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial se evaluaron dos tipos de citocininas: 6-bencil aminopurina (BAP) y cinetina 6-furfuryl aminopurina (KIN) en concentración 2.5, 5.0 7.5 y 10.0 mg L<sup>-1</sup>. Estos se evaluaron en interacción con dos tipos de auxinas (ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en relación citocinina-auxina 10:1. A las ocho semanas de incubación se evaluó el número de brotes/explante (Nb) y altura (Ab, mm) por tratamiento, analizando con SAS Ver. 9.4. el efecto por tipo de citocinina, auxina, concentración y tratamiento. El ANOVA indicó diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.01$ ) entre citocininas, siendo BAP la que generó mayor Nb, teniendo un efecto estadísticamente igual con KIN en Ab. Entre auxinas, AIB registró mayor efecto, siendo la interacción citocinina-auxina BAP: AIB significativa. Con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) se estableció la significancia estadística entre tratamientos y determinó que el medio adicionado con 7.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.75 mg L<sup>-1</sup> AIB, registró una tasa de multiplicación de 6.0 brotes/explante, con un Ab de 3.85 mm. Esta interacción de fitohormonas influye positivamente en la morfogénesis del explante modulando la inducción de brotes que pueden seguirse subcultivando y multiplicando in vitro.

**Palabras clave:** Plantaciones comerciales, Resistencia a sequía, Mezcal

## ABSTRACT

Due to the ecological, social and economic importance of this phylogenetic resource, plant tissue culture was used to define the treatment that allows obtaining the highest number of shoots in the in vitro multiplication stage of golden barrel biznaga (*E. grusonii*). MS medium (Murashige, 1974) was used at 50% macrosalts establishing nodal segments with axillary buds as explant. Two types of cytokinins were evaluated in a completely randomized experimental design with factorial arrangement: 6-benzyl aminopurine (BAP) and kinetin 6-furfuryl aminopurine (KIN) in concentration 2.5, 5.0 7.5 y 10.0 mg L<sup>-1</sup>. These were evaluated in interaction with two types of auxins (naphthaleneacetic acid (NAA) and indolbutyric acid (IBA) in a 10:1 cytokinin-auxin ratio. After eight weeks of incubation, the number of shoots/plant (Nb) and height (Ab, mm) per treatment were evaluated, analyzing with SAS Ver. 9.4. the effect by type of cytokinin, auxin, concentration and treatment. ANOVA indicated significant differences ( $\alpha \leq 0.01$ ) between cytokinins, with BAP generating the highest Nb, having a statistically equal effect with KIN in Ab. Among auxins, AIB had the greatest effect, with the cytokinin-auxin BAP:AIB interaction being significant. The Tukey test ( $P \leq 0.05$ ) established the statistical significance between treatments and determined that the medium added with 7.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.75 mg L<sup>-1</sup> AIB, registered a multiplication rate of 6.0 shoots/explant, with an Ab of 3.85 mm. This interaction of phytohormones positively influences explant morphogenesis by modulating the induction of shoots that can be further subcultured and multiplied in vitro.

**Keywords:** Commercial plantations, Drought resistance, Mezcal.



## INTRODUCCIÓN

La conservación *ex situ* es una de las áreas prioritarias para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en la que se incluye la colecta selectiva, mantenimiento de colecciones y la regeneración de aquellos recursos fitogenéticos que constituyen parte de la biodiversidad y que son usados con diferentes propósitos (Hammer *et al.* 2003; FAO, 2010; Gutiérrez *et al.* 2015). Con la aplicación de la conservación *ex situ* se puede garantizar la regeneración de los recursos fitogenéticos de las especies y sus poblaciones. La regeneración *in vitro* en cactáceas, se ha realizado para el rescate de germoplasma en estatus de riesgo en varias especies del género *Coryphanta* (Pérez *et al.* (1998) y *Mammillaria* (Ordoñez, 2003) y para incrementar material de interés en la horticultura ornamental, donde se ha logrado establecer el protocolo de micropropagación para el bonete o birrete de obispo (*Astrophytum myriostigma* Lem.) (Villavicencio *et al.* 2009), biznaga cono invertido de Kunth (*Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha) (Villavicencio *et al.* 2011; Villavicencio *et al.* 2012a), biznaga blanca chilona (*Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose) (Villavicencio *et al.* 2012b; Villavicencio *et al.* 2013), órgano pequeño sacasil (*Echinocereus poselgeri* Lem.) (Villavicencio *et al.* 2020) y biznaga cono invertido de viereck (*Turbincarpus viereckii* subsp. *major* (Glass & R.A. Foster) Glass). La biznaga barril de oro (*Echinocactus grusonii* Hildm.) es una cactácea de la subfamilia Cactoideae y Tribu Cacteae (Tropicos, 2021) que utiliza en la horticultura ornamental. De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2019) es una planta endémica, en estatus de riesgo tipo P (peligro de extinción) con distribución en el centro de México, siendo en condiciones naturales una especie que difícilmente forma colonias y su propagación es escasa porque no genera brotes de manera natural (Guzmán *et al.*, 2003). Con el propósito de establecer el protocolo de micropropagación de la biznaga barril de oro (*E. grusonii*) el objetivo de esta investigación fue definir el tipo y dosis de citocininas que permiten obtener el mayor número de brotes *in vitro* en la etapa de multiplicación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, ubicado en Saltillo, Coahuila, México.

**Material vegetal.** – Se utilizaron segmentos nodales con yemas axilares como explantes tomados de vitroplantas germinadas *in vitro*.

**Inducción de brotes.** – Esta evaluación se realizó durante 2018-2019 utilizando el medio MS (Murashige, 1974) al 50% de sus macrosales, suplementado con 100 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 3% de sacarosa y 0.65% de agar, con un pH ajustado a 5.7. Mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial se evaluaron dos tipos de citocininas: 6-bencil aminopurina (BAP) y cinetina 6-furfuryl aminopurina (KIN) considerando cuatro niveles de concentración (2.5, 5.0 7.5 y 10.0 mg L<sup>-1</sup>) en interacción con dos tipos de auxinas (ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) manteniendo una relación citosina-auxina de 10:1.

En total se evaluaron 16 tratamientos estableciendo cinco explantes por frasco con igual número de repeticiones por tratamiento. Los explantes se incubaron por ocho semanas evaluando como variables de respuesta el número de brotes/explante (*Nb*) y altura de brote (*Ab*, mm), para determinar la tasa de multiplicación por tratamiento. Las variables evaluadas se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM del Sistema de Análisis Estadístico SAS, (Versión 9.4) (SAS, 2019), realizando un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las fitohormonas (citocininas, auxinas) e influencia de la concentración y una prueba de rango múltiple Tukey ( $P \leq 0.05$ ), para realizar un análisis considerando los tratamientos como efectos independientes y seleccionar el mejor tratamiento.

**Condiciones de incubación.** – El material vegetativo se estableció en el cuarto de incubación del LCTV considerando una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16h luz.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto entre citocininas.

Independientemente del tipo y concentración de citocininas se pueden generar en la etapa de multiplicación de 1 hasta 7 brotes/explante. Existieron diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.01$ ) entre citocininas siendo la 6-bencil aminopurina (BAP) la que superó en *Nb* a los tratamientos con 6-furfuryl aminopurina (KIN) registrando un *Nb* de 4.19 brotes/explante, con un promedio semejante en *Ab* de 3.62 mm (Figura 1).

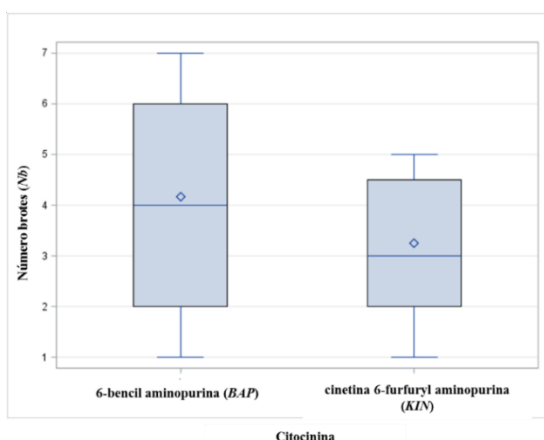


**Figura 1.** Comparación grafica entre el tipo de citocinina en la multiplicación *in vitro* de la biznaga barril de oro (*Echinocactus grusonii* Hildm.).

### Efecto entre auxinas

Existieron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre las auxinas evaluadas, siendo el ácido indolbutírico (AIB) el que influyó en la respuesta morfogénica tanto en el *Nb* como en *Ab*.

### Efecto entre concentraciones

Independientemente del tipo de citocinina utilizada, existieron diferencias entre concentraciones ( $P \leq 0.05$ ) siendo la concentración de 7.5 mg L<sup>-1</sup> la que superó en número de brotes al resto de las concentraciones evaluadas, registrando un *Nb* de 4.33 brotes/explante, con una *Ab* (3.5 mm) estadísticamente igual al resto de las concentraciones evaluadas.

### Efecto entre Tratamientos.

Al analizar los tratamientos como efectos independientes, considerando la interacción entre el tipo de citocinina y auxina con sus diferentes

concentraciones, se determinó que el medio base MS (Murashige, 1974) al 50% de sus macrosales adicionado con 7.5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BAP) + 0.75 mg L<sup>-1</sup> de AIB, fue el que registró el mayor *Nb* con 6.0 brotes/explante, superando al resto de las concentraciones evaluadas donde se utilizó la misma interacción BAP: AIB y superando a los tratamientos evaluados con la interacción KIN: ANA. Este tratamiento, generó brotes con una *Ab* de 3.8 mm mismos que pudieron manipularse por el operario al realizar el subcultivo. Los tratamientos con la interacción KIN: ANA generaron menos de la mitad de los brotes inducidos con el tratamiento 7.5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BAP) + 0.75 mg L<sup>-1</sup> de AIB, con un tamaño ligeramente mayor a 3.8 mm; sin embargo, su tasa de multiplicación es escasa, siendo este parámetro no viable para ser considerado dentro de un protocolo de micropropagación.

**Tabla 1.** Relación citocinina-auxina en la inducción de brotes *in vitro* de la biznaga barril de oro (*Echinocactus grusonii* Hildm.) vía organogénesis directa.

| ID | TRATAMIENTO                                               | Número de brotes * ( <i>Nb</i> ) | Altura de brotes * ( <i>Ab</i> ) (mm) |
|----|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 1  | 2.5 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.25 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 1.80 d                           | 4.60 b                                |
| 2  | 5.0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.50 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 3.44 c                           | 3.10 d                                |
| 3  | 7.5 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.75 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 4.09 b                           | 2.81 e                                |
| 4  | 10.0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.10 mg L <sup>-1</sup> ANA | 4.14 b                           | 2.42 e                                |
| 5  | 2.5 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.25 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 4.00 b                           | 4.25 b                                |
| 6  | 5.0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.50 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 4.69 b                           | 3.83 c                                |
| 7  | 7.5 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.75 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 6.00 a                           | 3.85 c                                |
| 8  | 10.0 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0.10 mg L <sup>-1</sup> AIB | 4.30 b                           | 3.60 c                                |
| 9  | 2.5 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.25 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 2.71 d                           | 3.00 d                                |
| 10 | 5.0 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.50 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 3.40 c                           | 3.20 c                                |
| 11 | 7.5 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.75 mg L <sup>-1</sup> ANA  | 4.25 b                           | 4.00 b                                |
| 12 | 10.0 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.10 mg L <sup>-1</sup> ANA | 3.00 c                           | 2.66 e                                |
| 13 | 2.5 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.25 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 1.66 d                           | 2.66 e                                |
| 14 | 5.0 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.50 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 2.00 d                           | 6.00 a                                |
| 15 | 7.5 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.75 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 4.14 b                           | 3.85 c                                |
| 16 | 10.0 mg L <sup>-1</sup> KIN + 0.10 mg L <sup>-1</sup> AIB | 2.60 d                           | 4.20 b                                |

\* Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

El mayor número de brotes con menor tamaño es un efecto que ocurre con frecuencia en la micropropagación, como lo refieren Mata *et al.* (2001) y Pacheco (2015), por lo que siempre es adecuado evaluar varias combinaciones para determinar el



equilibrio entre estas variables. Los resultados mostraron que el tipo y concentración de fitohormonas influyen en la morfogénesis de esta especie, siendo la interacción de cinetina 6-bencil aminopurina (BAP) y el ácido indolbutírico (AIB) las que influyen positivamente en la morfogénesis del explante, regulando la división y crecimiento celular de las yemas axilares incrementando la tasa de multiplicación, efecto que se busca en la etapa de multiplicación. La interacción BAP:AIB también ha sido reportada por Finti *et al.* (2012) y Villavicencio *et al.* (2009), quienes encontraron que la fuente de citocinina tiene efectos significativos sobre la producción de brotes de nopal (*Opuntia ficus-indica* Haw.) y la biznaga bonete de obispo (*Astrophytum myriostigma* Lem.) por lo que se tiene que considerar este aspecto en la micropropagación de cactáceas.

En la etapa de multiplicación de la biznaga barril de oro el control hormonal influye en la diferenciación del explante, como lo refieren Ascough y Staden (2010), mostrando que la regeneración de brotes *in vitro* de esta especie es posible a partir de segmentos nodales como también ha sido reportado en el viejito (*Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff.) (Choreño *et al.* 2002) y en la biznaga costilluda (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob). Tanto la eficiencia en el tratamiento de inducción de brotes como el coeficiente de brotación son importantes en la etapa de multiplicación para alcanzar los resultados finales en la micropropagación, pues de esta etapa dependerán las cantidades de explantes que se establezcan y las vitroplantas que se produzcan.

## CONCLUSIONES

La conservación *ex situ* mediante el cultivo de tejidos vegetales es factible para la regeneración de la biznaga barril de oro (*E. grusonii*). La interacción citocinina-auxina BAP-AIB resultó significativa y promueve la multiplicación *in vitro* de esta especie, influyendo positivamente en la morfogénesis del explante, modulando la inducción de brotes que pueden seguir subcultivando y multiplicando *in vitro*.

## LITERATURA CITADA

Ascough, GD y Staden, J. Van. (2010). Micropropagación de ornamentales indígenas de *Albuca bracteata* y *A. nelsonii*

con valor medicinal. Revista Sudafricana de Botánica, 76, 579–584. DOI: 10.1016/j.sajb.2010.04.012.

Finti, IA, Boullani, RE, Ayadi, FE, Aabd, NA y Mousadik, AE (2012). Micropropagación *in vitro* de *Opuntia ficus-indica* en el sur de Marruecos. Revista Internacional de Ciencia Química y Bioquímica, 1, 6-10. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.995.11.

Gutiérrez, B., Ipinza, R., & Barros, S. (2015). Conservación de Recursos Genéticos Forestales, Principios y Prácticas. Instituto Forestal, Chile. 320p.

Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM, CONABIO. MéxicoDF. 315p.

Hammer, K., Arrowsmith, N. y Gladis, T. (2003). Agrobiodiversidad con énfasis en recursos fitogenéticos. Naturwissenschaften, 90, 241-250.

Mata RM, Monroy D. la R., MA, Goldammer, KM y Chávez AVM (2001). Micropropagación de *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, especie endémica y en peligro de extinción. *In Vitro Biología Celular y del Desarrollo-Planta*, 37 (4), 400-404.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2010). El Segundo Informe sobre el estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el Mundo. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. ISBN 978-92-5-306534-9. Roma, Italia. 28p. [Enlace al PDF:

Pacheco, RFC (2015). Micropropagación de tres especies de nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). Tesis Licenciatura. Departamento de Botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Saltillo. Buenavista Saltillo, Coahuila. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.021>.

- Pérez, MB, Villalobos, E., Meza, E., Morone L. y Lizalde, JR (1998). Propagación de 21 especies de cactus mexicanos por proliferación axilar. *Biología celular y del desarrollo in vitro-Planta*, 34 (2), 131-135. DOI: 10.1007/BF02822777.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2019). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 14 de noviembre. 130p.
- Ordóñez M., MA (2003). Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactáceas). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 70 p.
- Murashige, T. (1974). Propagación de plantas mediante cultivos de tejidos. *Ana. Rev. Fisiol vegetal*. 25, 135-166.
- Trópicos. (2021). Trópicos: *Echinocactus grusonii* Hildm. <https://www.tropicos.org/name/510471> 3 (Consulta: 5 de marzo de 2021).
- Instituto del Sistema de Análisis Estadístico (SAS) Inc. (2019). Guía del usuario de SAS/STAT@14.1 Segunda edición. SAS Institute Inc. Raleigh, Carolina del Norte, EE. UU. 238p.
- Villavicencio G., EE, Cano PA, & Juárez SA (2009). Micropropagación y producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del desierto Chihuahuense. Folleto Técnico No.39. ISBN: 978-607-425-130-2I. Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP. Saltillo Coahuila de Zaragoza, México.42p.
- Villavicencio G., EE, González CA, Arredondo GA, Iracheta DJ, Comparan S., & Casique VR (2011). Micropropagación de *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactácea ornamental, amenazada de extinción del desierto Chihuahuense. *Rev. Méx. Cien.* 2(6), 37-56.
- Villavicencio G., EE, Carranza PMA, Comparan S., & González CA (2012). Micropropagación y producción de *Turbincarpus knuthianus* (Boed.) John & Riha cactácea ornamental del Desierto Chihuahuense. Folleto Técnico N° 48. ISBN 978-607-425-924-7. Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP. Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. 41p.
- Villavicencio G., EE, González CA, Arredondo GA, & Carranza PMA (2012). Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) FAC Weber ex Britt. & Rosa cactácea ornamental del Desierto Chihuahuense. Folleto Técnico N° 51. ISBN 978-607-425-923-0. Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP. Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. 41p.
- Villavicencio G., EE, González CA, & Carranza PMA (2013). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) FAC Weber Ex Britt. & Rose cactácea ornamental y recurso fitogenético del Desierto Chihuahuense. *Rev. Méx. Cien.* 3(14), 83-99.
- Villavicencio-Gutiérrez, E.E. G. Arellano O. y V. A. Belmontes D. (2020). Micropropagación del órgano pequeño sacasil (*Echinocereus poselgeri* Lem.) (Fam.: Cactaceae). *Acta Horticulturae* (1288): 123:130. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2020.1288.19>

