

REGENERACIÓN *in vitro* DE *Echinopsis chamaecereus* H. FRIEDRICH & GLAETZLE cv. 'Aurea'

In vitro REGENERATION OF *Echinopsis chamaecereus* H. FRIEDRICH & GLAETZLE cv. 'Aurea'

Janeth Téllez-Román¹, María Cristina Guadalupe López-Peralta^{2*}, Eleodoro Hernández-Meneses¹,
Manuel Livera-Muñoz², Andrés A. Estrada-Luna³, Hilda A. Zavaleta-Mancera⁴

¹Fisiología Vegetal. ²Genética. ⁴Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México (cristy@colpos.mx). ³CINVESTAV-Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.

RESUMEN

Echinopsis chamaecereus cv. "Aurea" es una cactácea ornamental cuya condición aclorofílica limita la fotosíntesis y para sobrevivir debe injertarse en otra cactácea. Para su aprovechamiento comercial se requieren sistemas de propagación, como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. El propósito de esta investigación fue establecer un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas de *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' a partir de segmentos areolares. Los explantes se desinfectaron con hipoclorito de sodio (6% v/v) y plata coloidal (0.048%) y se sembraron en medio MS con bencilaminopurina (4.4, 8.8 y 13.2 μM) y ácido naftalenacético (5.3, 10.7 y 16.0 μM). El diseño experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un explante en cada frasco. Los brotes y callos se formaron a los 30 d con 13.2 μM de bencilaminopurina y 5.3 μM de ácido naftalenacético; se obtuvieron 12.6 brotes por explante y 3.01 g de tejido fresco de callo. En la etapa de multiplicación 55 brotes se regeneraron por explante con 13.2 μM de bencilaminopurina y 5.3 μM de ácido naftalenacético. Los callos no fueron morfogénicos y no sobrevivieron. Con este sistema de regeneración *in vitro* es factible generar plantas del cv. "Aurea" para la producción de microinjertos y multiplicación masiva con fines de conservación y aprovechamiento comercial.

Palabras clave: organogénesis, cactaceae, micropropagación, callogénesis, *Echinopsis chamaecereus* cv. Aurea, areola.

INTRODUCCIÓN

Echinopsis chamaecereus H. Friedrich & Glaetzle es una cactácea originaria de Sudamérica, se aprovecha como ornamental y su adaptabilidad

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2018. Aprobado: diciembre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 163-175. 2020.

ABSTRACT

Echinopsis chamaecereus cv. "Aurea" is an ornamental cactus whose achlorophyllic condition limits photosynthesis and it must be grafted onto another cactus in order to survive. For its commercial use, propagation systems such as *in vitro* plant tissue culture are required. The purpose of this research was to establish a protocol for *in vitro* regeneration of *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' plants from areolar segments. Explants were disinfected with sodium hypochlorite (6% v/v) and colloidal silver (0.048%) and sown in MS medium with benzylaminopurine (4.4, 8.8 and 13.2 μM) and naphthaleneacetic acid (5.3, 10.7 and 16.0 μM). The experimental design was completely randomized with 20 repetitions per treatment and the experimental unit was an explant in each flask. Shoots and callus were formed at 30 d with 13.2 μM benzylaminopurine and 5.3 μM naphthaleneacetic acid; 12.6 shoots per explant and 3.01 g of fresh callus tissue were obtained. In the multiplication stage 55 shoots were regenerated per explant with 13.2 μM benzylaminopurine and 5.3 μM naphthaleneacetic acid. Callus were not morphogenic and did not survive. With this *in vitro* regeneration system, it is feasible to generate "Aurea" plants for the production of micrografts and massive multiplication for conservation and commercial purpose.

Key words: organogenesis, cactaceae, micropropagation, callogenesis, *Echinopsis chamaecereus* cv. Aurea, areola.

INTRODUCTION

Echinopsis chamaecereus H. Friedrich & Glaetzle is a cactus native to South America, it is used as an ornament and its adaptability has allowed this species to be distributed throughout the world. The plant forms erect shoots with light green stems of 1 cm in diameter and numerous white

le ha permitido distribuirse en el mundo. La planta forma brotes de aspecto erecto, con tallos de color verde claro de 1 cm de diámetro y con numerosas espinas blancas con apariencia de cerdas. Las plantas pueden alcanzar 15 cm de altura y 30 cm de diámetro. Las ramificaciones de los tallos le otorgan aspecto de planta colgante. Con luz apropiada la planta puede producir flores de color rojo bermellón de 5 cm de diámetro (Anderson, 2001).

De esta especie se han obtenido mutantes cromáticos (quiméricos aclorofílicos) que producen flores de mayor tamaño y de diferentes colores (Maiti y Singh, 2016). El cultivar “Aurea” es un mutante aclorofílico que se detectó en el banco de germoplasma del Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados. Este mutante presenta amplio potencial como planta ornamental y su nombre común es “cacto cacahuete”. Posee tallos de 5 a 10 cm de longitud con epidermis de coloración amarilla por la presencia de carotenoides; sus areolas son afieltradas de color blanco o crema provistas de gloquidios y espinas numerosas, similares a cerdas, ubicadas sobre costillas. Las flores emergen desde al ápice de los tallos y miden 5 cm de longitud por 10 cm de diámetro; son de color rojo anaranjado intenso (Boyle y Anderson, 2002).

La condición aclorofílica del cv. ‘Aurea’ limita la fotosíntesis; sólo sobrevive, crece y florece cuando se injerta sobre otra cactácea. Los mutantes cromáticos de varias especies de cactus de colores brillantes pueden injertarse en el género *Hylocereus*. Por el alto valor ornamental de los genotipos aclorofílicos es de interés estudiar estrategias y técnicas de propagación que aseguren la conservación y aprovechamiento comercial de forma sustentable.

Las técnicas de propagación *in vitro* son una solución viable para la problemática que enfrentan las cactáceas. Los protocolos establecidos a partir de la activación areolar han permitido multiplicar y establecer bancos de germoplasma *in vitro* para aprovechar y conservar especies en vías de extinción o de importancia económica (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). Entre las especies micropropagadas exitosamente destacan: *Escobaria minima* (Giusti *et al.*, 2002), *Opuntia lanigera* (Estrada-Luna *et al.*, 2008), *Pelecypora aselliformis* (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002), *Pilosocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) *Mammillaria plumosa* (Téllez-Román *et al.*,

spines that look like bristles. The plants can reach 15 cm in height and 30 cm in diameter. The branches of the stems give it the appearance of a hanging plant. With proper light the plant can produce vermilion red flowers of 5 cm in diameter (Anderson, 2001).

From this species, chromatic mutants (achlorophylic chimeric) have been obtained that produce larger flowers of different colors (Maiti and Singh, 2016). The “Aurea” cultivar is an aclorophylic mutant that was detected in the germplasm bank of the Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados. This mutant has wide potential as an ornamental plant and its common name is “peanut cactus”. It has stems from 5 to 10 cm long with yellow epidermis due to the presence of carotenoids; its areolas are white or cream coloured with numerous gloquids and abundant spines, similar to bristles, located on ribs. The flowers emerge from the apex of the shoots and measure 5 cm in length by 10 cm in diameter; they are deep orange-red colored (Boyle and Anderson, 2002).

The aclorophylic condition of cv. ‘Aurea’ limits photosynthesis; it only survives, grows and flowers when grafted onto another cactus. Chromatic mutants of several brightly coloured cactus species can be grafted onto the *Hylocereus* genus. Due to the high ornamental value of the aclorophylic genotypes, it is of interest to study propagation strategies and techniques that ensure conservation and commercial use in a sustainable way.

In vitro propagation techniques are a viable solution to the problems faced by cactuses. The protocols established through areolar activation have allowed the multiplication and establishment of *in vitro* germplasm banks. These banks bring advantage to and allow to conserve those species of economic importance or which are in danger of extinction (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). Among the species that have been successfully micro-propagated, the following stand out: *Escobaria minima* (Giusti *et al.*, 2002), *Opuntia lanigera* (Estrada-Luna *et al.*, 2008), *Pelecypora aselliformis* (Pérez-Molphe-Balch and Dávila-Figueroa, 2002), *Pilosocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) *Mammillaria plumosa* (Téllez-Román *et al.*, 2017) and *Micranthocereus* (Civatti *et al.*, 2017). The objectives of this study were to determine the *in vitro* regeneration capacity of the chromatic aclorophylic mutant *E. chamaecereus* cv.

2017) y *Micranthocereus* (Civatti *et al.*, 2017) entre otras. Los objetivos de este estudio fueron determinar la capacidad de regeneración *in vitro* del mutante cromático aclorofílico *E. chamaecereus* cv. 'Aurea' a través del cultivo de areolas y analizar histológicamente el origen de los brotes y callos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados durante los años 2010-2012. El clon aclorofílico de *Echinopsis chamaecereus* H. Friedrich & Glaetzle se obtuvo en el Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados desde un tallo aclorofílico que se generó en una planta normal y se reprodujo injertándolo en *Hylocereus undatus*. Los explantes fueron segmentos de tallo jóvenes de 1 cm de longitud con areolas provenientes de plantas jóvenes, sanas y vigorosas cultivadas en el vivero de dicho Proyecto (Figura 1A).

Medio de cultivo y condiciones de incubación

En todas las etapas del proceso de regeneración se usó el medio de cultivo básico MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa (30 g L^{-1}), mio-inositol (200 mg L^{-1}), tiamina (2 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}) y ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}); solidificado con agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1N y HCl 1N con un potenciómetro (Thermo Scientific® Orion 3 Star) y la esterilización se hizo en autoclave vertical (AESAs®, Modelo 300) a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.5 kg cm^{-2} de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron a $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16 h de luz blanca fría fluorescente ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y humedad relativa de 30%.

Establecimiento del cultivo aséptico

Brotes jóvenes se lavaron con detergente comercial y agua corriente durante 5 min; posteriormente se disecaron segmentos de tallo con areola de 1 cm de longitud. Para establecer la desinfección superficial de los explantes se evaluaron nueve tratamientos conformados por mezcla de fungicidas Captan + Benomil (4 g L^{-1} c/u; 20, 30 y 35 min), hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex®; 30, 35 y 40% v/v) adicionado con 1.5% v/v de plata coloidal estable (Microdyn®, 0.048%) durante 10 min, y alcohol 70% (3, 5 y 10 min). Los tratamientos se aplicaron

'Aurea' through the cultivation of areolas and to analyze histologically the origin of shoots and callus.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The study was carried out in the Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, during 2010-2012. The aclorophyllic clone of *Echinopsis chamaecereus* H. Friedrich & Glaetzle was obtained at the facilities of the Proyecto de Recursos Genéticos de Cactáceas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados from an aclorophyllic stem that was generated in a normal plant and reproduced by grafting it to *Hylocereus undatus*. The explants were young stem segments of 1 cm in length with areolas from young, healthy and vigorous plants grown in the nursery of that project (Figure 1A).

Culture medium and incubation conditions

At all stages of the regeneration process the basic culture MS medium (Murashige and Skoog, 1962) was used, sucrose (30 g L^{-1}), myo-inositol (200 mg L^{-1}), thiamine (2 mg L^{-1}), pyridoxine (0.5 mg L^{-1}), glycine (2 mg L^{-1}) and nicotinic acid (0.5 mg L^{-1}); solidified with agar-agar (Merck®, 7 g L^{-1}). The pH of the medium was adjusted to 5.7 ± 0.1 with NaOH 1N and HCl 1N with a potentiometer (Thermo Scientific® Orion 3 Star) and sterilization was performed in a vertical autoclave (AESAs®, Model 300) at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ and 1.5 kg cm^{-2} pressure for 20 min. Cultures were incubated at $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ with 16 h photoperiod of cold white fluorescent light ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and 30% relative humidity.

Establishment of aseptic culture

Young shoots were washed with commercial detergent and running water for 5 min; afterwards, stem segments were dissected with 1 cm long areola. In order to accomplish the surface disinfection of the explants, nine treatments were evaluated, consisting of a mixture of Captan + Benomyl fungicides (4 g L^{-1} each; 20, 30 and 35 min), commercial sodium hypochlorite (NaOCl, Cloralex®; 30, 35 and 40% v/v) added with 1.5% v/v of stable colloidal silver (Microdyn®, 0.048%) for 10 min, and 70% alcohol (3, 5 and 10 min). The treatments were applied in continuous agitation and at the end five rinses were made with sterile distilled water. The explants were placed individually in 45 mL glass flasks with 10 mL of MS medium without plant

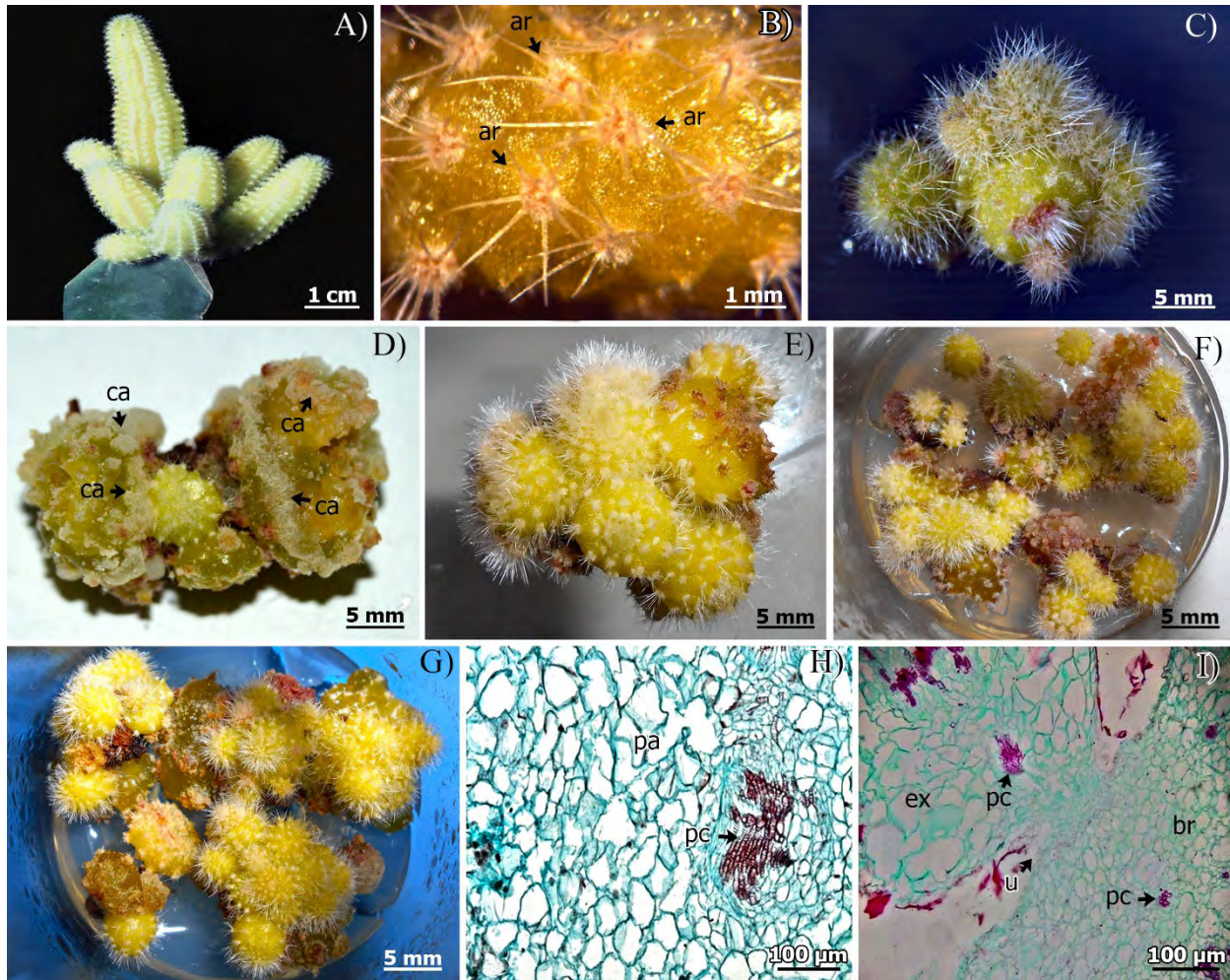


Figura 1. Fases de la regeneración *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea': A) Planta madre; B) segmento de tallo con múltiples areolas; C) inducción de brotes; D) callos en medio MS con 13.2 μM de BAP y 5.35 μM de ANA después de 30 d de cultivo; E) multiplicación de brotes a los 60 d, F) 90 d, y G) 120 d con 13.2 μM de BAP y 5.3 μM de ANA; H) sección longitudinal de callos, e I) brotes a los 30 d de cultivo con 13.2 μM de BAP y 5.3 μM de ANA. ar: areola; ca: callo; ex: explante; br: brote; u: unión; pa: parénquima; pc: procámbium. Autor de la foto del inciso A). Dr. Manuel Livera Muñoz.

Figure 1. Stages of *in vitro* regeneration of *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea': A) Mother plant; B) stem segment with multiple areolas; C) shoots induction; D) callus in MS medium with 13.2 μM BAP and 5.35 μM ANA after 30 d of culture; E) shoots multiplication at 60 d, F) 90 d, and G) 120 d with 13.2 μM BAP and 5.3 μM ANA; H) longitudinal section of callus, and I) longitudinal section after graft join at 30 d of culture with 13.2 μM BAP and 5.3 μM ANA. ar: areola; ca: callus; ex: explant; br: shoot; u: join; pa: parenchyma; pc: procambium. Picture A) is courtesy of Dr. Manuel Livera Muñoz.

en agitación continua y al finalizar se hicieron cinco enjuagues con agua destilada estéril. Los explantes se colocaron de forma individual en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio MS sin reguladores de crecimiento. A los 10 d se cuantificó la supervivencia (%), contaminación por microorganismos (%) y oscurecimiento de los explantes (%).

growth regulators. At 10 d, survival (%), contamination by microorganisms (%) and darkening of the explants (%) were quantified.

Inducción de brotes y callo

Para estudiar la capacidad morfogénica de los explantes se evaluó el efecto de tres concentraciones de bencilaminopurina (BAP; 4.4, 8.8 y 13.2 μM) combinadas con tres de ácido α -naphthalenacético (ANA; 5.3, 10.7 y 16 μM), y el testigo sin reguladores. A los 30 d de cultivo *in vitro* se cuantificó la formación de callo por explante mediante tejido fresco de callo (g), número de brotes por explante y el porcentaje de explantes que generaron brotes.

Multiplicación de brotes y proliferación de callos

Para promover la multiplicación de brotes y el crecimiento de los callos en la etapa de inducción, se subcultivaron en los mismos medios de inducción cada cuatro semanas por un periodo de 12 semanas, en frascos de vidrio de 96 mL de capacidad con 30 mL de medio. A los 60, 90 y 120 d de cultivo se cuantificó el tejido fresco de callo (g), número de brotes por explante (%) y la longitud de los brotes (mm).

Análisis histológico

Durante la etapa de multiplicación se obtuvieron muestras de callos y brotes de cuatro semanas de cultivo. Las muestras se fijaron en solución FAA (3.6% de formaldehído, 50% de etanol al 96%, 5% de ácido acético en 35% de agua destilada) (Ruzin, 1999). Los tejidos fijados se lavaron con agua destilada y se deshidrataron con un procesador de tejidos automático secuencial: etanol (50, 70, 96 y 100%), xilol (100%) y xilol:etanol (1:1), por 30 min en cada cambio. Las muestras se incluyeron en parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific®) y se obtuvieron cortes transversales y anticlinales de 10 mm de grosor con un microtomo rotatorio (Spencer® American Optical Company). Los cortes se adhirieron a portaobjetos y tiñeron con safranina "0" y verde fijo FCF (Zavaleta-Mancera y Engleman, 1994) y se observaron en un microscopio óptico (Axioskop 2 Plus, ZEISS®) con cámara fotográfica digital (Axioskop MRc5, ZEISS®).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un explante en cada frasco. Los datos de cada variable y experimento se analizaron con un ANDEVA y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Estos análisis estadísticos se realizaron con SAS versión 9.1 (SAS Institute, 2003).

Shoots and callus induction

In order to study the morphogenic capacity of the explants, the effect of three concentrations of benzylaminopurine (BAP; 4.4, 8.8 and 13.2 μM) combined with three concentrations of naphthaleneacetic acid (ANA; 5.3, 10.7 and 16 μM), and the control without plant growth regulators was evaluated. After 30 d of *in vitro* culture, callus formation per explant was quantified using fresh callus tissue (g), number of shoots per explant and the percentage of explants that generated shoots.

Shoots multiplication and callus proliferation

For promoting shoots multiplication and callus growth at the induction stage, shoots and calluses were subcultured in the same induction media every four weeks for a period of 12 weeks, in 96 mL glass flasks with 30 mL medium. At 60, 90 and 120 d of culture, fresh callus tissue (g), number of shoots per explant (%) and length of shoots (mm) were quantified.

Histological analysis

During the multiplication stage, callus and shoot samples from four weeks of culture were obtained. The samples were fixed in FAA solution (3.6% formaldehyde, 50% ethanol at 96%, 5% acetic acid in 35% distilled water) (Ruzin, 1999). The fixed tissues were washed with distilled water and dehydrated with an automatic sequential tissue processor: ethanol (50, 70, 96 and 100%), xylol (100%) and xylol: ethanol (1:1), for 30 min at each change. The samples were included in paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific®). Transversal and longitudinal sections (10 μm thick) were obtained with a rotating microtome (Spencer® American Optical Company). The cuts were adhered to slides and stained with safranin O and fast green FCF (Zavaleta-Mancera and Engleman, 1994). Tissue was observed with an optical microscope (Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Germany), and images were obtained with a digital camera (Axioskop MRc5, Carl Zeiss, Germany).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with 20 repetitions per treatment and the experimental unit was an explant in each flask. Data for each variable and experiment were analyzed with an ANOVA and treatment means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). These statistical analyses were performed with SAS version 9.1 (SAS Institute, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico

El método de desinfección de los explantes afectó significativamente supervivencia, oscurecimiento y contaminación ($p \leq 0.05$). La supervivencia mayor (85%) se obtuvo con 30% de NaClO por 10 min (Cuadro 1; Figura 1B). Esta respuesta se considera aceptable ya que la desinfección superficial de los segmentos de tallo areolar es difícil (Pérez *et al.*, 1999; Lema-Rumińska y Kulus, 2014; Téllez-Román *et al.*, 2017). En algunas cactáceas la contaminación puede ser total, como en *Copiapoa tenuissima* (Lema-Rumińska, 2011) debido a que las esporas de hongos y otras estructuras reproductivas se alojan en los gloquidios y espinas.

Los tratamientos con alcohol 70% por 10 min y Captan+Benomilo por 35 min ennegrecieron los explantes por lo que resultaron tóxicos para los tejidos. La efectividad de los desinfectantes y el oscurecimiento del explante aumentaron conforme al tiempo y concentración del agente. El alcohol como desinfectante puede ser tóxico para los tejidos vegetales, por lo que su empleo se restringe a enjuagues de 1 a 2 min y en superficies externas cuyos explantes

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of aseptic culture

The disinfection method of explants significantly affected survival, darkening and contamination ($p \leq 0.05$). The highest survival (85%) was obtained with 30% NaClO for 10 min (Table 1; Figure 1B). This response is considered acceptable since surface disinfection of areolar stem segments is difficult (Pérez *et al.*, 1999; Lema-Rumińska and Kulus, 2014; Téllez-Román *et al.*, 2017). In some cactuses, the contamination may be total, as in *Copiapoa tenuissima* (Lema-Rumińska, 2011), due to the fact that fungal spores and other reproductive structures are lodged in the glochids and spines.

Treatments with 70% alcohol for 10 min and Captan+Benomyl for 35 min blackened the explants and were therefore toxic to tissues. The effectiveness of the disinfectants and the darkening of the explant increased according to the time and concentration of the agent. Alcohol as a disinfectant can be toxic to plant tissues, so its use is restricted to rinsing for 1 to 2 min and on external surfaces whose explants are dissected inside the organ (Lema-Rumińska and Kulus, 2014).

Cuadro 1. Respuesta de segmentos de tallos areolares de *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' en el establecimiento del cultivo aséptico a los 10 d después de la siembra *in vitro*.

Table 1. Segment response of areolar stems of *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' in the establishment of aseptic culture at 10 d after *in vitro* sowing.

Desinfectante + tiempo (min)	Supervivencia (%)	Oscurecimiento (%)	Contaminación (%)
Captán + Benomilo (4 g L ⁻¹) + 20	17 c	34 ab	49 a
Captán + Benomilo (4 g L ⁻¹) + 30	13 c	46 a	40 a
Captán + Benomilo (4 g L ⁻¹) + 35	12 c	45 a	43 a
NaOCl (30% v/v) + 10	39 abc	28 ab	34 ab
NaOCl (35% v/v) + 10	85 a	8 b	7 b
NaOCl (40% v/v) + 10	69 ab	7 b	24 ab
Alcohol (70%) + 3	34 bc	31 ab	34 ab
Alcohol (70%) + 5	43 abc	20 ab	37 ab
Alcohol (70%) + 10	21 c	30 ab	48 a

Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). NaOCl: hipoclorito de sodio ♦ Different letters in columns indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). NaOCl: sodium hypochlorite.

se disecan al interior del órgano (Lema-Rumińska y Kulus, 2014).

Inducción de brotes y callo

Las combinaciones de BAP + ANA tuvieron un efecto significativo sobre el número de brotes por explantes y el peso fresco de callo ($p \leq 0.05$). A los 30 d inició la formación de brotes y callos en los explantes; la brotación se presentó en todos los tratamientos y los brotes se regeneraron de forma directa, como producto de la activación de la yema axilar de cada areola. A los 12 d de cultivo se observó el hinchamiento del explante y enseguida se observó la formación de protuberancias areolares que se regeneraron en brotes a los 20 d.

La activación areolar y formación de brotes se presentaron de forma exponencial en las dosis mayores de BAP. Sin embargo, las concentraciones de BAP y su combinación con ANA influyeron significativamente en el número de brotes producidos. Los mejores resultados se obtuvieron con 13.2 μM de BAP y 5.3 μM de ANA. Esta combinación produjo el mayor número de brotes por explante (12.6) seguido de 13.2 μM de BAP y 10.7 μM de ANA, con 11.3 brotes (Cuadro 2; Figura 1C).

Shoots and callus induction

The combinations of BAP + ANA had a significant effect on the number of shoots per explant and fresh callus weight ($p \leq 0.05$). At 30 d, shoot and callus formation started in the explants; shooting occurred in all treatments and shoots regenerated directly as a result of the activation of the axillary bud of each areola. After 12 d of culture, swelling of the areola was observed and then the formation of areolar protuberances was observed, which regenerated into shoots after 20 d.

Areolar activation and shoot formation occurred exponentially at higher doses of BAP. However, the concentrations of BAP and its combination with ANA significantly influenced the number of shoots produced. The best results were obtained with 13.2 μM BAP and 5.3 μM ANA. This combination produced the highest number of shoots per explant (12.6) followed by 13.2 μM BAP and 10.7 μM ANA, with 11.3 shoots (Table 2; Figure 1C).

Organogenesis is the ability to regenerate plants from meristematic or non-meristematic tissues (Schwarz *et al.*, 2005), here including tuber areolas (Lema-Rumińska and Kulus, 2014). Organogenesis is one of the most successful methods of *in vitro*

Cuadro 2. Inducción de brotes y callos en *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' después de 30 d de cultivo.
Table 2. Shoots and callus induction in *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' after 30 d of culture.

BAP + NAA (μM)	Brotes por explante (Número)	Longitud de brote (mm)	Tejido fresco de callo (g)
0 + 0	0 f	0 c	1.8 d
4.4 + 5.3	4.5 d	1.7 b	1.4 dc
4.4 + 10.7	4.0 ed	4.6 ba	1.0 d
4.4 + 16.0	3.0 e	5.1 ba	2.7 ba
8.8 + 5.3	7.5 cb	5.4 a	1.1 d
8.8 + 10.7	6.7 c	4.7 ba	1.5 dc
8.8 + 16.0	4.4 d	5.3 ba	2.2 bac
13.2 + 5.3	12.6 a	5.0 ba	1.8 bdc
13.2 + 10.7	11.3 a	5.0 ba	1.4 dc
13.2 + 16.0	8.5 b	5.0 ba	3.0 a

Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). BAP: bencilaminopurina; ANA: ácido naftalenacético ♦ Different letters in columns indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$). BAP: benzylaminopurine; ANA: naphthaleneacetic acid.

La organogénesis es la capacidad de regenerar plantas a partir de tejidos meristemáticos o no meristemáticos (Schwarz *et al.*, 2005), aquí se incluyen las areolas de tubérculos (Lema-Rumińska y Kulus, 2014). La organogénesis es uno de los métodos de propagación vegetativa *in vitro* más exitoso; se aprovecha el mantenimiento de la estabilidad genética del material propagado y la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

En estudios con *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006), *Escobaria minima* (Baird) D. Hunt, *M. pectinifera* (Ruempler) F.A.C. Weber y *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg (Giusti *et al.*, 2002) las citoquininas y dosis mínimas de auxinas, promovieron la inducción de brotes, al igual que lo obtenido en esta investigación. Estos resultados demuestran que las citoquininas son esenciales en la propagación *in vitro* de cactáceas porque estimulan la activación areolar y la consecuente generación de brotes. En *Epithelanta micromeris* la organogénesis se estableció mediante la activación de yemas axilares con 55.7 μM de cinetina (Velásquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001), mientras que Mata-Rosas *et al.* (2001) indujeron brotes adventicios en *Turbinucarpus laui* con dosis de 8.8-13.2 μM de BAP y 0-2.6 μM de ANA en medio de cultivo MS.

La formación de callos se presentó en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento, en la zona del corte y en la base del explante (Figura 1D). Esta respuesta es similar a lo observado en otras cactáceas como *Turbinucarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002), *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* f. *lutea* y *Aylostera heliosa* (Vidican *et al.*, 2009). Los callos de cv. "Aurea" fueron de consistencia firme (dura o compacta) y densos, su presencia fue mayor en explantes cultivados con dosis altas de auxina. La combinación de 13.2 μM de BAP y 16.0 μM de ANA produjo la mayor cantidad de callo con 3 g (Cuadro 2). La respuesta promovida por el ANA se debe a que las auxinas están relacionadas con el control de la expansión y división celular. En la morfogénesis *in vitro*, concentraciones equilibradas de auxinas y citoquininas promueven la formación de callos (Gaba, 2005).

vegetative propagation; it takes advantage of the maintenance of the genetic stability of the propagated material and the possibility of obtaining large numbers of plants (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

In studies with *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006), *Escobaria minima* (Baird) D. Hunt, *M. pectinifera* (Ruempler) F.A.C. Weber and *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg (Giusti *et al.*, 2002) cytokinins and minimal doses of auxins promoted the induction of shoots, as did the results of this research. These results show that cytokinins are essential in the *in vitro* propagation of cacti because they stimulate areolar activation and the consequent generation of shoots. In *Epithelanta micromeris*, organogenesis was established by axillary bud activation with 55.7 μM kinetin (Velásquez-Enciso and Soltero-Quintana, 2001), while Mata-Rosas *et al.* (2001) induced adventitious shoots in *Turbinucarpus laui* with doses of 8.8-13.2 μM BAP and 0-2.6 μM ANA in MS culture medium.

Callus formation occurred in all treatments with growth regulators, in the cut area and at the base of the explant (Figure 1D). This response is similar to that observed in other cacti such as *Turbinucarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002), *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* f. *lutea* and *Aylostera heliosa* (Vidican *et al.*, 2009). Calluses of cv. "Aurea" were firm (hard or compact) and dense, their presence was higher in explants cultivated with high doses of auxin. The combination of 13.2 μM BAP and 16.0 μM ANA produced the largest amount of callus with 3 g (Table 2). The response promoted by ANA is due to the fact that auxins are related to the control of cell expansion and division. In *in vitro* morphogenesis, balanced concentrations of auxins and cytokines promote callus formation (Gaba, 2005).

Shoots multiplication and callus proliferation

At this stage, BAP and ANA concentrations affected the number of shoots per explant at 60, 90 and 120 d of culture and fresh callus tissue (g) at 60 and 90 d ($p \leq 0.05$). Callus formed in the initial explants only showed limited growth after 60 d of cultivation and there was no shoot or root

Multiplicación de brotes y proliferación de callos

En esta etapa, las concentraciones de BAP y ANA afectaron el número de brotes por explante a los 60, 90 y 120 d de cultivo y el tejido fresco de callo (g) a los 60 y 90 d ($p \leq 0.05$). Los callos formados en los explantes iniciales sólo mostraron crecimiento limitado después de 60 d de cultivo y no hubo regeneración de brotes ni raíces. Con las concentraciones de 4.4, 8.8 y 13.2 μM de BAP combinadas con 16.0 μM de ANA se observó crecimiento de callo; el peso del tejido fresco fue de 2.3 a 2.7 g. Después de este tiempo, los callos se tornaron de color café, se necrosaron y murieron (Cuadro 3).

La respuesta negativa del crecimiento de los callos después del subcultivo pudo deberse al medio de cultivo donde las concentraciones de reguladores de crecimiento no fueron las óptimas. En *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* f. *lutea* y *Aylostera heliosa* la combinación de 4.4 μM de BAP y 4.9 μM de AIB indujo la formación de callos en explantes de segmentos de tallo areolares y no se observó la regeneración de brotes (Vidican *et al.*, 2009). En otras especies como *Micranthocereus flaviflorus* y *M. polyanthus* se logró la multiplicación de brotes, y se evitó la formación de callos, en medio MS a la mitad de concentración con 1.34 μM de ANA sin la adición de citocininas (Civatti *et al.*, 2017). Estas respuestas

regeneration. At concentrations of 4.4, 8.8, and 13.2 μM BAP combined with 16.0 μM ANA, callus growth was observed; fresh tissue weight was 2.3 to 2.7 g. After this time, the callus turned brown, became necrotic and died (Table 3).

The negative response of callus growth after subculture could be due to the culture medium where the concentrations of growth regulators were not optimal. In *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* f. *lutea* and *Aylostera heliosa* the combination of 4.4 μM BAP and 4.9 μM IBA induced callus formation in explants of areolar stem segments and no shoot regeneration was observed (Vidican *et al.*, 2009). In other species such as *Micranthocereus flaviflorus* and *M. polyanthus* shoot multiplication was achieved, and callus formation was avoided, in MS medium at half concentration with 1.34 μM of ANA without the addition of cytokinins (Civatti *et al.*, 2017). These variable responses show that the morphogenic capacity of the cactus is limited not only by genotype but also by plant growth regulators.

During multiplication the number of shoots increased in all treatments with plant growth regulators. Consistently, the combination of 13.2 μM BAP and 5.35 μM ANA favored the highest number of shoots at 60, 90, and 120 d of culture with 30.0, 30.5, and 55.0 shoots, respectively (Table 3; Figure

Cuadro 3. Multiplicación de brotes y proliferación de callos de *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' cultivados durante 60, 90 y 120 d.
Table 3. Shoots multiplication and proliferation of *Echinopsis chamaecereus* cv. 'Aurea' callus, cultured during 60, 90 and 120 d.

BAP + NAA (μM)	Tejido fresco de callo (g)	Brotes por explante (Número)			Longitud de brote (mm)		
	60 d	60 d	90 d	120 d	60 d	90 d	120 d
0 + 0	0 c	0 g	4.5 f	5.3 g	0 c	4.6 b	23.0 c
4.4 + 5.3	1.4 dc	9.0 f	20.0 ef	26.0 f	11.1 b	27.9 a	45.6 a
4.4 + 10.7	0.9 c	14.0 e	23.0 dc	32.0 de	12.6 ba	31.3 a	45.5 a
4.4 + 16.0	2.4 ba	11.0 f	20.0 de	30.0 e	12.3 ba	28.9 a	47.9 a
8.8 + 5.3	0.9 c	21.0 d	25.0 bc	39.0 c	12.0 ba	31.0 a	44.2 a
8.8 + 10.7	1.5 bc	24.0 d	25.0 bc	35.0 dc	12.6 ba	30.0 a	43.5 a
8.8 + 16.0	2.3 bac	16.0 e	24.0 bc	51.0 bc	13.6 ba	29.9 a	46.3 a
13.2 + 5.3	1.8 bdc	30.0 a	30.5 a	55.0 a	14.6 a	31.0 a	47.3 a
13.2 + 10.7	1.4 bc	27.0 b	27.0 ba	37.0 c	12.9 ba	29.6 a	42.7 a
13.2 + 16.0	2.7 a	26.0 c	26.0 bc	38.0 c	12.6 ba	29.3 a	31.4 b

Letras diferentes en una columna indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). BAP: bencilaminopurina; ANA: ácido naftalenacético ♦ Different letters in columns indicate statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$). BAP: benzylaminopurine; ANA: naphthaleneacetic acid.

variables demuestran que la capacidad morfogénica de los cactus está limitada no solo por el genotipo sino también por los reguladores de crecimiento.

Durante la multiplicación aumentó el número de brotes en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento. En forma consistente la combinación de 13.2 μM de BAP y 5.35 μM de ANA favoreció la mayor cantidad de brotes a los 60, 90 y 120 d de cultivo con 30.0, 30.5 y 55.0 brotes, respectivamente (Cuadro 3; Figura 1E-G). Los resultados de este estudio son similares a los documentados en otras especies de cactáceas donde las citocininas promovieron la multiplicación de brotes, aunque en dosis menores. Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) en *Mammillaria formosa*, *Nyctocereus serpentinus*, *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* lograron la mayor cantidad de brotes con 2.2 y 4.4 μM de BAP.

En *Opuntia lanigera* la multiplicación se promovió con dosis de BAP desde 2.32 μM hasta 3.72 μM (Estrada-Luna *et al.*, 2008), así como en *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y en *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). En otras especies la mejor respuesta se obtuvo con concentraciones de citocininas mayores a las evaluadas en este estudio. En *Coryphantha elephantidens* se obtuvieron 12.4 brotes en medio MS con 6.6 μM BAP en explantes de tallos cortados longitudinalmente (Bhau y Wakhlu, 2015). En *Pelecypora aselliformis* 23 μM de cinetina resultó la mejor concentración, mientras que 22 μM de BAP fue la óptima para *Escobaria minima* y *Mammillaria pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002). En contraste, la multiplicación de *Turbinicarpus valdezianus* fue mejor con 9.28 μM de cinetina, sin adición de auxinas, y se obtuvieron 11.75 y 4.5 brotes en explantes apicales y laterales, respectivamente, disecados de plántulas germinadas *in vitro* (Martínez *et al.*, 2016).

La mayor cantidad de brotes obtenida en este trabajo (55) supera lo logrado en otras especies de cactus como *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) donde el máximo fue de 14.9 brotes; *Turbinicarpus laui* con 13.7 brotes (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* con 7 brotes (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), *Turbinicarpus pseudopectinatus* con 19 brotes, *Turbinicarpus valdezianus* con 8 brotes (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) y *Opuntia* sp con 20 brotes (Estrada-Luna *et al.*, 2008). En estos estudios la diferenciación de brotes fue resultado de la activación de yemas axilares pre-existentes en la estructura areolar y que corresponde a brotación o rebrotación

1E-G). The results of this study are similar to those documented in other cactus species where cytokinins promoted shoot multiplication, although at lower doses. Pérez-Molphe-Balch and Dávila-Figueroa (2002) achieved the highest number of shoots in *Mammillaria formosa*, *Nyctocereus serpentinus*, *Pelecypora aselliformis* and *P. strobiliformis*, with 2.2 and 4.4 μM BAP.

In *Opuntia lanigera*, multiplication was promoted with BAP doses from 2.32 μM to 3.72 μM (Estrada-Luna *et al.*, 2008), as well as in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) and in *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). In other species the best response was obtained with higher concentrations of cytokinins than those evaluated in this study. In *Coryphantha elephantidens*, 12.4 shoots were obtained in MS medium with 6.6 μM BAP in explants of longitudinally cut stems (Bhau and Wakhlu, 2015). In *Pelecypora aselliformis*, 23 μM kinetin was the best concentration, while 22 μM BAP was optimal for *Escobaria minima* and *Mammillaria pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002). In contrast, the multiplication of *Turbinicarpus valdezianus* was better with 9.28 μM kinetin, without addition of auxins, and 11.75 and 4.5 shoots were obtained in apical and lateral explants, respectively, dissected from *in vitro* germinated seedlings (Martínez *et al.*, 2016).

The highest number of shoots obtained in this work (55) exceeds what was achieved in other cactus species such as *Coryphanta retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) where the maximum number was 14.9 shoots; *Turbinicarpus laui* with 13.7 shoots (Mata-Rosas *et al.*, 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* with 7 shoots (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003), *Turbinicarpus pseudopectinatus* with 19 shoots, *Turbinicarpus valdezianus* with 8 shoots (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) and *Opuntia* sp with 20 shoots (Estrada-Luna *et al.*, 2008). In these studies, the differentiation of shoots was the result of the activation of pre-existing axillary buds in the areolar structure and that corresponds to direct shooting or reshooting, thus implying the latency breaking of the meristematic areas. This regeneration indicates that shoot multiplication can be maintained after the induction period as it has been observed in different cactus species (Pérez-Molphe-Balch and Dávila-Figueroa, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

directa; ello implicó el rompimiento de latencia de las áreas meristemáticas. Esta regeneración indica que la multiplicación de brotes se puede mantener después del período de inducción tal como se ha observado en diferentes especies de cactus (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010).

En diferentes cactáceas el número de brotes por explante *in vitro* puede ser desde 0 hasta 128 (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Lema-Rumińska y Kulus, 2014) con influencia de la especie y del tipo de regulador de crecimiento usado. Todos estos resultados indican que para establecer la regeneración *in vitro* de una especie de cactus se deben determinar experimentalmente el tipo y la concentración del regulador de crecimiento.

Los períodos de tiempo en los que se obtuvieron los brotes en nuestro estudio coinciden con los reportados en otros cactus. En los géneros *Mammillaria* y *Coryphantha* el tiempo óptimo para alcanzar la máxima generación de brotes es 60 d (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). Pero según Cardarelli *et al.* (2010), el periodo óptimo para *Obregonia denegrii* fue 120 d.

Los brotes de cv. 'Aurea' crecieron en altura cuando se subcultivaron con reguladores de crecimiento y alcanzaron 47.9 mm después de 120 d de cultivo (Cuadro 3). En los subcultivos se observó que los brotes formaron raíces en ausencia de reguladores de crecimiento, lo cual favorece una absorción mayor de los nutrientes del medio y su conversión en crecimiento. El enraizamiento observado (20%) después de 90 d de cultivo también se ha registrado en *Turbinicarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmidickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmidickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmidickeanus* subsp. *schmidickeanus*, *T. subterraneus* y *T. valdezianus* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). La similitud en los resultados confirma que muchas especies de cactus regeneran raíces cuando los brotes se cultivan sin reguladores de crecimiento, incluidas *Opuntia* spp. (Estrada-Luna *et al.*, 2008), *Pilocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) y *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

A diferencia de otras especies de cactáceas donde el enraizamiento *in vitro* favorece la aclimatación de plantas a condiciones de invernadero, en el mutante "Aurea" estudiado el 20% de enraizamiento obtenido confirma que para la supervivencia de las plantas es

The number of shoots *in vitro* per explant in different cacti can be from 0 to 128 (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Lema-Rumińska and Kulus, 2014) depending on the species and the type of plant growth regulator used. All these results indicate that to establish the *in vitro* regeneration of a cactus species, the type and concentration of the plant growth regulator should be determined experimentally.

The time periods in which the shoots were obtained in our study match those reported in other cacti. In the *Mammillaria* and *Coryphantha* genera the optimal time to reach the maximum generation of shoots is 60 d (Ramírez-Malagon *et al.*, 2007; Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). But according to Cardarelli *et al.* (2010), the optimal period for *Obregonia negrii* was 120 d.

Shoots of cv. 'Aurea' grew in height when subcultured with plant growth regulators and reached 47.9 mm after 120 d of culture (Table 3). In the subcultures it was observed that the shoots formed roots in the absence of plant growth regulators, which favours a greater absorption of the nutrients from the medium and their conversion into growth. The rooting observed (20%) after 90 d of culture has also been recorded in *Turbinicarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmidickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmidickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmidickeanus* subsp. *schmidickeanus*, *T. subterraneus* and *T. valdezianus* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005). The similarity in results confirms that many cactus species regenerate roots when shoots are grown without plant growth regulators, including *Opuntia* spp. (Estrada-Luna *et al.*, 2008), *Pilocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) and *Turbinicarpus laui* (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

Unlike other cactus species where *in vitro* rooting favours the acclimatization of plants to greenhouse conditions, in the "Aurea" mutant, after have studied the 20% rooting obtained, it confirms that for the survival of the plants it is necessary to graft them onto another cactus. These shoots would not survive acclimatization by themselves; however, the alternative is to make micro-grafts that can later be acclimatized.

Histological analysis

In the initial cultures and subcultures the calluses were non morphogenic, compact in consistency,

necesario injertarlos en otra cactácea. Estos brotes no sobrevivirían a la aclimatación por sí solos; sin embargo, la alternativa es hacer microinjertos que después se puedan aclimatar.

Análisis histológico

En los cultivos iniciales y subcultivos los callos fueron no morfogénicos, de consistencia compacta, color amarillento pardo y crecimiento lento. El callo estuvo conformado por parénquima de células isodiamétricas de crecimiento irregular y haces vasculares dispersos con elementos traqueales caracterizados por elementos de vaso con engrosamiento helicoidal. Los brotes se generaron por la activación de la yema axilar presente en las areolas, esto garantiza que las plantas obtenidas son genéticamente idénticas a la planta madre (Figura 1H-I).

Este sistema de regeneración *in vitro* por organogénesis es una opción viable para el aprovechamiento sustentable de cactáceas. La importancia de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* destaca para la propagación de cactus aclorofílicos cuya supervivencia solo es posible si se injertan sobre otra cactácea. Este protocolo podría aplicarse para otras especies y cultivares de cactáceas.

CONCLUSIONES

El protocolo permitió la regeneración *in vitro* de *Echinopsis chamaecereus* cv. "Aurea" por organogénesis a partir de segmentos de areolas. La inducción y multiplicación de brotes se logró en medio Murashige y Skoog con 13.2 μM de bencilaminopurina y 5.35 μM de ácido naftalenacético. Los brotes se originaron de la activación de meristemos axilares pre-existentes en las areolas y los callos fueron no morfogénicos.

LITERATURA CITADA

- Anderson, E. F. 2001. The Cactus family. Timber Press Inc. Portland, Oregon, U.S.A. 776 p.
- Bhau, B. S., and A. K. Wakhlu. 2015. A highly efficient in vitro propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha lephantidens* (Lem.) Lem. J. Gene Engin Biotechnol. 13: 215–219.
- Boyle, T. H., and E. F. Anderson. 2002. Biodiversity and conservation. In: Nobel, P. S. (ed). Cacti: Biology and Uses. University of California Press. pp: 125-141.

yellowish-brown in colour and of slow growing. The callus was formed by parenchyma of isodiametric cells of irregular growth and dispersed vascular bundles with tracheal elements characterized by vessel elements with helicoidal thickening. The shoots were generated by the activation of the axillary bud present in the areolas, which guarantees that the plants obtained are genetically identical to the mother plant (Figure 1H-I).

This system of *in vitro* regeneration by organogenesis is a viable option for the sustainable use of cacti. The importance of *in vitro* plant tissue culture techniques is highlighted for the propagation of achlorophyllic cacti whose survival is only possible if they are grafted onto another cactus. The longitudinal sections at the grafted join showed the development of procambial branches, and young trachery elements in both the shoot and the explant sides, indicating the establishment of a vascular connection, necessary for the survival of the achlorophyllic explant. This protocol could be implemented to other cactus species and cultivars.

CONCLUSIONS

The protocol allowed the *in vitro* regeneration of *Echinopsis chamaecereus* cv. "Aurea" by organogenesis from segments of areolas. Shoot induction and multiplication was achieved in Murashige and Skoog medium with 13.2 μM of benzylaminopurine and 5.35 μM of naphthaleneacetic acid. The shoots originated from the activation of pre-existing axillary meristems in the areolas and the callus were non morphogenic.

—End of the English version—

-----*-----

- Cardarelli, M., D. Borgognone, and G. Colla. 2010. *In vitro* propagation of *Obregonia denegrii* (Cactaceae). Propag. Orn. Plants 10: 29-36.
- Civatti, L. M., M. N. G. Marchi, and M. C. Bellintani. 2017. Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. Afr. J. Biotechnol. 16: 749-762.
- Dávila-Figueroa, C. A., M. L. De la Rosa-Carrillo, and E. Perez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant* 41: 540–545.

- Estrada-Luna, A. A., J. J. Martínez-Hernández, M. E. Torres-Torres, and F. Chablé-Moreno. 2008. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. *Sci. Hort.* 117: 378-385.
- Gaba, V. P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. *In: Trigiano, R. N., and D. J. Gray (eds). Plant Development and Biotechnology.* Boca Raton, FL. CRC Press. pp: 87-99.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo, and M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci. Hort.* 95: 319-332.
- Lema-Rumińska, J. 2011. Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots, and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstrosa. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 106: 531-535.
- Lema-Rumińska, J. and D. Kulus. 2014. Micropropagation of cacti: A review. *Haseltonia* 19: 46-63.
- Maiti, R. K., and F. V. P. Singh. 2016. Biodiversity of cactus biology: A review. *Crop Res.* 51: 1-15.
- Martínez P. A., R. Cárdenas N., and D. B. Hernández O. 2016. Micropropagation of *Turbincarpus valdezianus* (Möeller) Glass & Foster (Cactaceae) an endemic cactus in Northern Mexico. *HortSci.* 51: 94-97.
- Mata-Rosas, M., R. M. A. Monroy, K. Moebius-Goldammer, and V. M. Chavez-Avila. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 37: 400-404.
- Moebius-Goldammer, K. G., M. Mata-Rosas, and V. M. Chavez-Avila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 39: 388-393.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pelah, D., R. A. Kaushik, Y. Mizrahi, and Y. Sitrit. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 71: 81-84.
- Pérez, E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones, and H. Lizalde. 1999. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 34: 131-135.
- Perez-Molphe-Balch, E., and C. A. Davila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 38: 73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. C. Santos-Díaz, R. Ramírez-Malagón, and N. Ochoa-Alejo. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. *Sci. Agri.* 72: 540-561.
- Quiala, E., J. Matos, G. Montalvo, M. de Fera, M. Chávez, A. Capote, N. Pérez, R. Barbón, and B. Kowalski. 2009. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *J. Profes. Assoc. Cactus Develop.* 11: 18-25.
- Ramírez-Malagon, R., I. Aguilar-Ramirez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius, and N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 43: 660-665.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botin. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphanta Retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 12: 139-143.
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant Microtechnique Microscopy.* Oxford University Press. 322 p.
- SAS Institute. 2003. *SAS/STAT User's Guide.* Release 9.1 Ed. Cary, NC. USA.
- Schwarz, O. J., A. R. Sharma, and R. M. Beaty. 2005. Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis. *In: Trigiano, R. N., and D. J. Gray. (eds). Plant Development and Biotechnology.* Boca Raton, FL. CRC Press. pp: 159-172.
- Téllez-Román, J., M. C. G. López-Peralta, E. Hernández-Meneses, A. E. Estrada-Luna, H. A. Zavaleta-Mancera y M. Livera-Muñoz. 2017. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8: 863-876.
- Velásquez-Enciso, L. E., y R. Soltero-Quintana. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber *ex* Britton et Rose, var. *micromeris, cactaceae.* *Cact. Suc. Mex.* 46: 56-62.
- Vidican, T. L., D. Cachita-Cosma, and J. E. Romocea. 2009. The initiation of *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* F. Lutea and *Aylosteria heliosa* vitrocultures. *Studia Univ. VG, SSV.* 19: 351-357.
- Wyka, T. P., M. Hamerska, and M. Wróblewska. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 87: 27-32.
- Zavaleta-Mancera, H. A., and E. M. Engleman. 1994. Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology* 44: 169-175.

