

Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber*

In vitro morphogenesis of *Mammillaria plumosa* Weber

Janeth Téllez-Román², María Cristina Guadalupe López-Peralta^{1§}, Eleodoro Hernández-Meneses², Andrés Adolfo Estrada Luna³, Hilda Araceli Zavaleta Mancera⁴ y Manuel Livera Muñoz¹

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. ²Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. ³CINVESTAV-Unidad Irapuato-Departamento de Ingeniería Genética. ⁴Posgrado en Botánica-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. Tel. 01(595) 9520200, ext. 1540. [§]Autor para correspondencia: cristy@colpos.mx.

Resumen

Mammillaria plumosa es una cactácea mexicana altamente apreciada como planta ornamental por su peculiar morfología. La extracción desmedida y el saqueo de sus poblaciones silvestres han forzado su protección y actualmente se encuentra clasificada como una especie en peligro de extinción. Ante esta crítica situación el presente trabajo se planteó como objetivo desarrollar un sistema de propagación *in vitro* eficiente factible de implementarse como una de las estrategias para la recuperación de la especie. Segmentos de tallos con aréolas se sembraron en medio MS (1962), suplementado con 2,4-D (9, 13.5 y 18 μM) en combinación con cinetina (4.6, 9.3 y 13.9 μM). Todos los tratamientos evaluados indujeron la formación de callos pero la activación de las aréolas para su conversión en brotes solo se obtuvo con 18 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina. En la etapa de proliferación los callos continuaron su crecimiento en las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento, la diferenciación de brotes se produjo a partir de la activación areolar y la diferenciación de brotes adventicios de novo. Los brotes formaron raíces de forma natural en el proceso pero el enraizamiento se mejoró con el cultivo en medio MS (1962)

Abstract

Mammillaria plumosa is a highly appreciated Mexican cactus as an ornamental plant for its peculiar morphology. Excessive extraction and looting of its wild populations have forced its protection and is currently classified as an endangered species. Given this critical situation this paper aimed at developing an efficient *in vitro* propagation system feasible to be implemented as a strategie for recovering the species. Stem segments with areolae were seeded in medium MS (1962), supplemented with 2,4-D (9, 13.5 and 18 μM) in combination with kinetin (4.6, 9.3 and 13.9 μM). All evaluated treatments induced callus formation but the activation of the areolae for conversion to shoots was only obtained with 18 μM of 2,4-D and 9.3 μM of kinetin. In the proliferation stage callus continued to grow at the same concentrations of growth regulators, shoot differentiation occurred from the areolar activation and differentiation of novo adventitious buds. Shoots formed roots naturally in the process but the rooting was improved with the culture in medium MS (1962) at half the concentration of salts. In the plants acclimatization the survival rate was 85% in substrate of peat and river

* Recibido: enero de 2017
Aceptado: abril de 2017

a la mitad de concentración de sales. En la aclimatación de plantas la tasa de supervivencia fue 85% en sustrato de turba y arena de río. Con este protocolo es posible establecer la micropropagación de *Mammillaria plumosa* donde se pueden regenerar un promedio 500 plantas en 24 semanas de cultivo, las cuales podrían servir en la restauración de poblaciones silvestres o para su aprovechamiento comercial.

Palabras clave: biznaga, cactácea, micropropagación, organogénesis, 2,4-D.

Introducción

Mammillaria plumosa Weber es una cactácea nativa del norte de México, popularmente conocida como biznaga, su forma de barril y el arreglo de sus areolas le dan una apariencia algodonosa que simula estar cubierta por nieve, lo que la hace atractiva como planta ornamental de alto valor comercial (Arias *et al.*, 2005). Las cactáceas son una familia cuya distribución se restringe al continente americano (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999), con excepción de *Rhipsalis baccifera*, que se distribuye en África tropical (Anderson, 2001). En la diversidad de cactáceas en México figuran 52 géneros, que representan 47% de los géneros reconocidos para la familia; a nivel de especies se reportan 850 en estado silvestre, que corresponden a 42% de todas las especies (Arias-Montes, 1993). La Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059-SEMARNAT-2010) clasifica a *Mammillaria plumosa* como una especie amenazada, por lo que podría estar en peligro de desaparecer en el corto o mediano plazo. Las cactáceas se pueden usar como plantas alimenticias, cercos vivos, forraje para ganado y medicinales, pero sin duda su uso como plantas ornamentales es el más explotado, por lo llamativo de sus flores y las formas raras de sus tallos (Jiménez y Jiménez, 2007).

Varios factores propician que muchas especies se encuentren en alguna categoría de riesgo. Su alta demanda para diversos usos ha conducido a la sobrecolecta de las especies a tal grado de amenazar las poblaciones naturales, principalmente porque muchas de ellas presentan alto grado de endemismo (Arias, 1993). La alta especificidad ambiental de las especies, ciclos de vida muy largos y su lento crecimiento son otros factores que contribuyen a la recuperación lenta de sus poblaciones ante disturbios causados de manera natural o por actividades humanas (Jiménez, 2011).

sand. Using this protocol it is possible to establish the micropropagation of *Mammillaria plumosa* where 500 plants can be regenerated in an average of 24 weeks of culture, which could be used in restoring wild populations or for commercial use.

Keywords: barrel cactus, cactus, micropropagation, organogenesis, 2,4-D.

Introduction

Mammillaria plumosa Weber is a native cactus from northern México, popularly known as biznaga, its barrel shape and its areolas arrangement give a cottony appearance that pretends to be covered by snow, which makes it attractive as an ornamental plant with a high commercial value (Arias *et al.*, 2005). Cacti are a family whose distribution is restricted to the American continent (Bravo-Hollis and Scheinvar, 1999), except for *Rhipsalis baccifera*, distributed in tropical África (Anderson, 2001). Among the cacti diversity in México there are 52 genera, representing 47% of the genera recognized for the family; at the species level 850 are reported in the wild, corresponding to 42% of all species (Arias-Montes, 1993). Official Mexican Norm 059 (NOM-059-SEMARNAT-2010) classifies *Mammillaria plumosa* as an endangered species, so it could be in danger of disappearing in the short or medium term. Cactaceae can be used as food plants, live fences, cattle fodder and medicinal plants, but its use as ornamental plants is undoubtedly the most exploited, because of its striking flowers and the rare shapes of its stems (Jiménez and Jiménez, 2007).

Several factors encourage many species to be in some risk category. High demand for various uses has led to over-collecting species to the extent of threatening natural populations, mainly because many of them have high levels of endemism (Arias, 1993). High environmental specificity of species, very long life cycles and slow growth are other factors contributing to the slow recovery of its populations against naturally caused disturbances or by human activities (Jiménez, 2011).

In addition to the cacti protection (NOM-059-SEMARNAT-2010), it is necessary to implement successful propagation techniques that allow its conservation and

Además de la protección de las cactáceas (NOM-059-SEMARNAT-2010), es necesario implementar técnicas exitosas de propagación que permitan su conservación y aprovechamiento sustentable. Los estudios de propagación son fundamentales porque ofrecen la posibilidad de multiplicar plantas valiosas a través de métodos artificiales que podrían reducir significativamente la demanda de material de origen silvestre. La propagación de las cactáceas puede realizarse a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la propagación vegetativa o por germinación de semillas (Rojas y Vázquez, 2000).

Los métodos de propagación convencionales son adecuados pero ineficientes en términos de multiplicación debido a su lento crecimiento y limitada producción de brotes (Angulo y Paredes, 2011). Ante la creciente demanda del mercado de plantas ornamentales y la mejor comprensión de los mecanismos que regulan la morfogénesis *in vitro*, la micropropagación se ha convertido en una herramienta clave para la protección de especies amenazadas o en peligro de extinción y la producción comercial a gran escala en la industria hortícola (Preil, 2003). En la micropropagación de varias especies de cactáceas las técnicas más empleadas han sido la activación de yemas axilares, la regeneración de brotes adventicios y la embriogénesis somática (Lema y Kulus, 2014). A través de los años estas técnicas han permitido micropropagar exitosamente más de 600 variedades y 40 especies ornamentales de cactáceas (Quiala *et al.*, 2004; Ruvalcaba *et al.*, 2010).

Para el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* en cactáceas se pueden emplear diversos tejidos u órganos como explantes, cuya elección depende del género y la especie. Se pueden usar brotes terminales de plántulas (Gómez *et al.*, 2006), secciones laterales o verticales de cladodios (Estrada *et al.*, 2002); aréolas simples (Pérez y Dávila, 2002; Ramírez *et al.*, 2007; Quiala *et al.*, 2009); semillas (Dávila *et al.*, 2005; De Madeiros *et al.*, 2006) y brotes florales (Wyka *et al.*, 2006), entre otros, los cuales son cultivados con diferentes reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas) de acuerdo con los objetivos de estudios y las respuestas morfogénicas deseadas.

Si bien la propagación *in vitro* de cactáceas se ha logrado eficientemente para diversas especies, desde el punto de vista científico, la aplicación de estos protocolos no se

sustainable use. Propagation studies are critical because they offer the possibility of multiplying valuable plants through artificial methods that could significantly reduce the demand for wild source material. Cactaceae propagation can be accomplished through the plant tissue culture *in vitro*, vegetative propagation or seed germination (Rojas and Vázquez, 2000).

Conventional propagation methods are adequate but inefficient in terms of multiplication due to the slow growth and limited shoot production (Angulo and Paredes, 2011). Given the increasing market demand for ornamental plants and better understanding of the mechanisms that regulate the *in vitro* morphogenesis, micropropagation has become a key tool for the protection of threatened or endangered species and large-scale commercial production in the horticultural industry (Preil, 2003). In micropropagation of several species of cactaceae the most commonly used techniques have been the activation of axillary buds, regeneration of adventitious shoots and somatic embryogenesis (Lema and Kulus, 2014). Over the years these techniques have allowed to successfully micropropagate more than 600 varieties and 40 species of ornamental cactuses (Quiala *et al.*, 2004; Ruvalcaba *et al.*, 2010).

For the establishment of an *in vitro* propagation system of cacti various tissues or organs can be used as explants, whose choice depends on the genus and species. Terminal shoots of seedlings can be used (Gómez *et al.*, 2006), lateral or vertical sections of cladodes (Estrada *et al.*, 2002); simple areolas (Pérez y Dávila, 2002; Ramírez *et al.*, 2007; Quiala *et al.*, 2009); seeds (Dávila *et al.*, 2005; De Madeiros *et al.*, 2006) and flower buds (Wyka *et al.*, 2006), among others, which are grown with different growth regulators (auxins, cytokinins and gibberellins) in accordance with the study objectives and desired morphogenic responses.

While the *in vitro* propagation of cacti has been efficiently achieved for various species, from the scientific point of view, the implementation of these protocols can not be generalized for all cactuses, since most of the morphogenic responses *in vitro* are influenced by the genotype. Therefore, the objective of this research was to establish the optimal conditions for an *in vitro* propagation system of *Mammillaria plumosa* Weber via indirect organogenesis and to determine the histological origin of callus and buds.

puede generalizar para todas las cactáceas, ya que la mayoría de las respuestas morfogénicas *in vitro* son influenciadas por el genotipo. Por ello, el objetivo de esta investigación fue establecer las condiciones óptimas de un sistema de propagación *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber vía organogénesis indirecta y determinar el origen histológico de los callos y brotes.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron plántulas sanas y vigorosas cultivadas en condiciones de vivero proporcionadas por la unidad para el manejo y aprovechamiento de cactáceas, Tepetlaoxtoc, Estado de México, con registro UMA MX/VIV-CO-194. MX-SEMARNAT.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo básico utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962) con las sales inorgánicas completas, suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), tiamina (1 mg L⁻¹) y solidificado con agar-agar (Merck®, 9 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y la esterilización se hizo en autoclave vertical (AESA®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión por 20 min. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25 ±2 °C en fotoperiodo de 16 h e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻² s⁻¹.

Establecimiento del cultivo aséptico

Las plantas jóvenes donadoras de explantes, de 4 a 6 cm de diámetro, se lavaron con detergente y agua corriente durante 25 min, después se enjuagaron seis veces con agua destilada esterilizada. Enseguida se aplicó un tratamiento de desinfección superficial que consistió en la inmersión de las plantas en una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, cloralox®; 30% v/v) con plata coloidal estable (Microdyn®; 1.5% v/v) durante 10 min y luego se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las plantas se sumergieron en etanol (70%) durante 5 min y nuevamente se aplicaron seis enjuagues con agua destilada esterilizada.

Materials and methods

Vegetal material

Healthy and vigorous seedlings grown under nursery conditions provided by the cactus management and utilization unit, Tepetlaoxtoc, Estado de México, with the UMA MX/VIV-CO-194.MX-SEMARNAT registration, were used.

Culture medium and incubation conditions

The basic culture medium used was Murashige and Skoog (MS, 1962) with complete inorganic salts, supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), myoinositol (100 mg L⁻¹), thiamine (1 mg L⁻¹) and solidified with agar (Merck®, 9 g L⁻¹). The pH was adjusted to 5.7 with NaOH or HCl 1N and sterilization was performed in a vertical autoclave (AESA® Model 300) at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² pressure for 20 min. Cultures were maintained at 25 ±2 °C in photoperiod of 16 h and light intensity of 45 μmol m⁻² s⁻¹.

Aseptic culture establishment

Young explant donor plants, of 4 to 6 cm in diameter, were washed with detergent and tap water for 25 min, then rinsed six times with sterile distilled water. Immediately, a surface disinfection treatment was applied, which consisted in the immersion of the plants in a commercial sodium hypochlorite (NaOCl, cloralox®; 30% v/v) with stable colloidal silver (Microdyn®; 1.5% v/v) for 10 min and then rinsed six times with sterile distilled water. Subsequently, the plants were immersed in ethanol (70%) for 5 min and again six rinses with sterilized distilled water were applied.

Induction of shoots

Segments of 5-8 cm tuber length with areola were seeded in 45 mL capacity flasks with 15 mL of basic culture medium MS (1962) added with 2,4-D (9, 13.5 and 18 μM) combined with Kinetin (4.6, 9.3 and 13.9 μM) and medium without growth regulators as a control. After four weeks of culture, the formation of calli (%), sprouting (number of explants with shoots) and number of shoots per explant were quantified. The experimental design was completely random, where each treatment was represented by 10 replicates and the experimental unit was an areolar explant per flask.

Inducción de brotes

Segmentos de 5-8 cm de longitud de tubérculo con areola se sembraron en frascos de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo básico MS (1962) adicionado con 2,4-D (9, 13.5 y 18 μM) combinadas con cinetina (4.6, 9.3 y 13.9 μM) y medio sin reguladores de crecimiento como testigo. A las cuatro semanas de cultivo se cuantificaron la formación de callos (%), la brotación (número de explantes con brotes) y el número de brotes por explante. El diseño experimental fue completamente al azar, donde cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones y la unidad experimental fue un explante areolar por frasco.

Proliferación de callos y multiplicación de brotes

Para promover la proliferación de brotes, los explantes (brotes y callos) fueron transferidos a los mismos tratamientos usados en la etapa de inducción de brotes durante 12 semanas, con subcultivos cada cuatro semanas. A las 4, 8 y 12 semanas se cuantificaron el crecimiento de callos (medido como peso de materia fresca (mg); el número de brotes organogénicos de novo por explante; el número de brotes por activación areolar por explante; longitud de los brotes de novo y por activación areolar (mm), el número de raíces y longitud de raíces (cm). El diseño experimental fue completamente al azar; donde cada tratamiento estuvo representado por 10 repeticiones y la unidad experimental fue un explante areolar por frasco.

Enraizamiento y aclimatación de plantas

Brotes de 1-1.5 cm de diámetro se subcultivaron en medio de cultivo MS (1962) a la mitad de concentración de sales minerales suplementado con sacarosa (15 g L^{-1}) durante seis semanas. Cuando las raíces se alargaron y constituyeron un sistema radical con 3 a 5 raíces, se seleccionaron 40 plantas con diámetro promedio de 1-1.5 cm para su aclimatación. Las plantas se extrajeron de los frascos; se lavaron las raíces con agua destilada estéril y se plantaron en vasos de poliestireno de 150 mL de capacidad. Se evaluaron dos tipos de sustratos estériles: turba + arena de río (1:1) y turba + tierra de hoja (1:1). Las plantas se cubrieron con una bolsa de polietileno y se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz; temperatura de 26 ± 2 °C y riegos con agua destilada estéril cada tercer día. A los 30 y 60 días después del trasplante se cuantificó el porcentaje de supervivencia.

Calli proliferation and shoot multiplication

In order to promote the proliferation of shoots, the explants (shoots and calluses) were transferred to the same treatments used in the induction stage of shoots for 12 weeks, with subcultures every four weeks. At 4, 8 and 12 weeks the callus growth (measured as weight of fresh matter (mg), the number of novo organogenic shoots by explant; the number of sprouts per areolar activation per explant; novo shoot length and areolar activation (mm), the number of roots and root length (cm) were quantified. The experimental design was completely random where each treatment was represented by 10 repetitions and the experimental unit was an areolar explant per flask.

Rooting and acclimatization of plants

Shoots of 1-1.5 cm diameter were subcultured on MS medium (1962) to half concentration of mineral salts supplemented with sucrose (15 g L^{-1}) for six weeks. When roots lengthened and constituted a root system with 3 to 5 roots, 40 plants with an average diameter of 1-1.5 cm were selected for acclimatization. Plants were extracted from the flasks; roots were washed with sterile distilled water and planted in polystyrene containers of 150 mL capacity. Two types of sterile substrates were evaluated: peat + river sand (1:1) and peat + leaf soil (1:1). The plants were covered with a polyethylene bag and placed in a growth chamber with photoperiod of 12 h light; temperature of 26 ± 2 °C and irrigation with sterile distilled water every third day. At 30 and 60 days after transplantation, the survival percentage was quantified.

Histological analysis

The purpose of this analysis was to study the origin of the shoots and callus obtained during the induction and multiplication stages; at 10 weeks samples were taken from explants with organogenic areolar shoots and callus tissue. Samples were fixed in FAA; dehydrated in a series of ethanol gradients and processed for inclusion in paraffin (Ruzin, 1999). Using a rotary microtome (Spencer®) transverse and anticlines samples were obtained (10 μm) which were stained with safranin 0 and solid green FCF (Zavaleta and Engleman, 1994). Observations were made under a microscope (Axioskop 2 Plus, ZEISS®) and photomicrographs were taken with a digital camera (Axioskop MRC5, ZEISS®).

Análisis histológico

Este análisis tuvo el propósito de estudiar el origen de los brotes y callos obtenidos durante las etapas de inducción y multiplicación; a las 10 semanas se tomaron muestras de explantes con brotes areolares organogénicos y tejido de callos. Las muestras se fijaron en FAA; se deshidrataron en una serie de etanol graduales y se procesaron para su inclusión en parafina (Ruzin, 1999). Con un micrótopo rotatorio (Spencer®) se obtuvieron cortes (10 µm) transversales y anticlinales los cuales se tiñeron con safranina 0 y verde fijo FCF (Zavaleta y Engleman, 1994). Las observaciones se hicieron con un microscopio (AxiosKop 2 Plus, ZEISS®) y las fotomicrografías se tomaron con cámara digital (AxiosKop MRc5, ZEISS®).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza con el paquete de análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Establecimiento del cultivo aséptico

El proceso de desinfección empleado para el establecimiento de los cultivos asépticos de *M. plumosa* resultó eficiente, ya que el porcentaje de supervivencia de los explantes fue de 90% (Figura 1a-b). La efectividad del proceso de desinfección y el eventual daño de los tejidos de los explantes se relacionan directamente con el tiempo de exposición, la concentración del desinfectante, la condición fitosanitaria de las plantas donadoras, el tipo, tamaño y fisiología de los explantes son factores críticos durante el inicio de los cultivos (George y Debergh, 2008), de manera que en *M. plumosa* se encontró un balance en estos aspectos. Esta etapa se considera fundamental, ya que la presencia de agentes contaminantes y el ennegrecimiento de tejidos afectan negativamente las respuestas morfogénicas (Smith, 2013).

Inducción de brotes

Las concentraciones de reguladores de crecimiento adicionadas al medio de cultivo tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre las respuestas

Statistic analysis

The obtained data were subjected to ANOVA with SAS statistical analysis package (SAS Institute, 2003) and for comparison of means Tukey test ($p \leq 0.05$) was used.

Results and discussion

Establishment of aseptic culture

The disinfection process used for the establishment of aseptic cultures of *M. plumosa* was efficient, since the survival rate of the explants was 90% (Figure 1a-b). The effectiveness of the disinfection process and eventual tissue damage of the explants are directly related to exposure time, disinfectant concentration, phytosanitary condition of donor plants, type, size and physiology of the explants and are critical factors during early stages of crops (George and Debergh, 2008) so that in *M. plumosa* finding a balance in these aspects was achieved. This stage is considered fundamental, since the presence of pollutants and the blackening of tissues negatively affect the morphogenic responses (Smith, 2013).

Shoots induction

The concentrations of growth regulators in the culture medium had a significant effect on the observed morphogenic responses ($p \leq 0.05$). All combinations of growth regulators promoted indirect organogenesis in the explants, whereas direct organogenesis was only obtained in three treatments (Table 1).

In indirect organogenesis the explants generated several types of calli, which varied in their coloration, texture and growth rate. The coloration varied from white to green and the consistency was firm and compact to friable (Figure 1c-d). Friable green calli originated and grew on the cut surface at the base of the explants, which is a response that matches observations in *Mammillaria carmenae*, since callus grown in the presence of 2,4-D showed a better appearance (Mata *et al.*, 2001). In general, a marked tendency was observed for callus growth as the 2,4-D concentration in the culture medium increased. Treatments with 13.5 and 18 µM induced calli formation in 100% of the explants; however, the best results were obtained with the combination of 18 µM of 2,4-D and 9.3 µM of kinetin (Figure 1e-j).

morfogénicas observadas ($p \leq 0.05$). Todas las combinaciones de reguladores de crecimiento promovieron en los explantes la organogénesis indirecta, mientras que la organogénesis directa sólo se obtuvo en tres tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de 2,4-D y cinetina en la organogénesis directa e indirecta de *M. plumosa* después de cuatro semanas de cultivo.

Table 1. Effect of 2,4-D and kinetin in direct and indirect organogenesis of *M. plumosa* after four weeks of cultivation.

2,4-D + cinetina (μM)	Regeneración callos (%) [†]	Brotación areolar (núm.) [†]	Callos frescos (g) [†]
0 + 0	0 d	0 c	0 c
9 + 4.6	8 d	0 c	0.06 c
9 + 9.3	8 d	0 c	0.05 c
9 + 13.9	8 d	0 c	0.04 c
13.5 + 4.6	16 d	2.1 b	0.07 c
13.5 + 9.3	84 ab	0 c	0.22 c
13.5 + 13.9	56 bc	0 c	0.79 b
18 + 4.6	58 bc	0 c	1.09 b
18 + 9.3	98 a	2.7 a	2.04 a
18 + 13.9	50 c	2.5 ab	0.81 b

[†] Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

En la organogénesis indirecta los explantes generaron varios tipos de callos, los cuales variaron en su coloración, textura y tasa de crecimiento. La coloración varió de blanco a verde y la consistencia fue de firme y compacto a friable (Figura 1c-d). Los callos verdes friables se originaron y crecieron en la superficie del corte en la base de los explantes, lo cual es una respuesta que coincide con observaciones hechas en *Mammillaria carmenae*, ya que los callos crecidos en presencia de 2,4-D presentaron un mejor aspecto (Mata *et al.*, 2001). En general, se observó una tendencia marcada sobre el crecimiento de los callos conforme se incrementó la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo. Los tratamientos con 13.5 y 18 μM indujeron la formación de callos 100% de los explantes; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de 18 μM de 2,4-D y 9.30 μM de cinetina (Figura 1e-j).

Estas respuestas son similares a las reportadas en la morfogénesis *in vitro* de otras especies de cactáceas, como *Notocactus magnificus* (De Medeiros *et al.*, 2006), *Opuntia* spp. (Juárez y Passera, 2002; Estrada-Luna *et al.*, 2008);

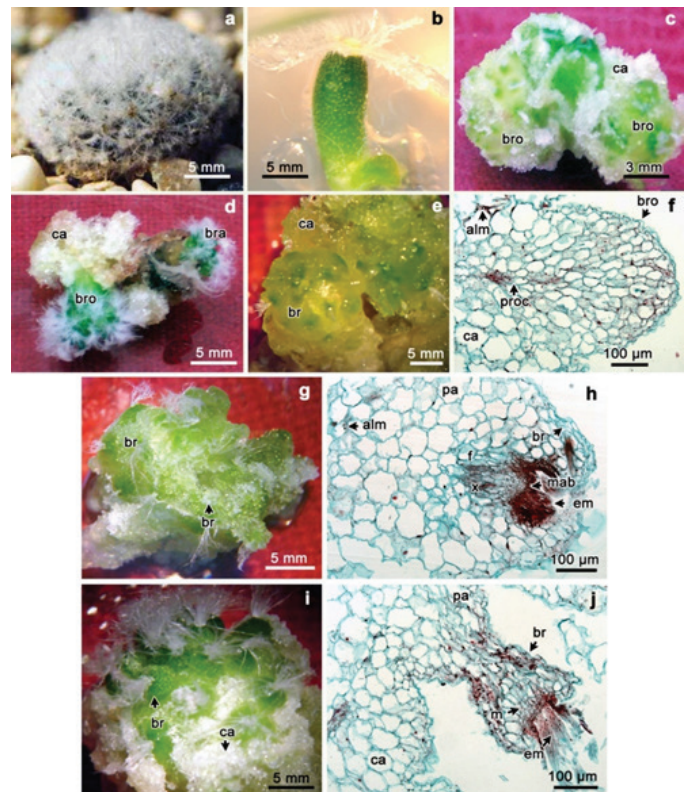


Figura 1. Morfogénesis *in vitro* y análisis histológico de *M. plumosa*. a) planta adulta; b) explante areolar; c) callo y brote regenerados de aréola apical con 2,4-D (18 μM) y cinetina (9.3 μM) a los 60 días de cultivo; d) callo organogénico, brote areolar y organogénico después de 90 días; e) estadio inicial 1, callo color verde; f) primordio de brote a los 60 días; g) estadio intermedio 2 del brote; h) sección longitudinal del brote intermedio a los 90 días; i) estadio 3 del brote; j) sección longitudinal del brote diferenciado a los 120 días; ca= callo organogénico; bra= brote areolar; bro= brote organogénico; br= brote; alm= almidón; pa= parénquima; proc= procambium; mab= meristemo apical de brote; x= xilema; f= floema; em= espinas modificadas.

Figure 1. *In vitro* morphogenesis and histological analysis of *M. plumosa*. a) adult plant; b) areolar explant; c) regenerated callus and bud of apical areola with 2,4-D (18.0 μM) and kinetin (9.30 μM) at 60 days of culture; d) organogenic callus, areolar and organogenic bud after 90 days; e) initial stage 1, green callus; f) bud emergence at 60 days; g) intermediate stage 2 of the shoot; h) longitudinal section of the intermediate shoot at 90 days; i) stage 3 of the shoot; j) longitudinal section of the differentiated shoot at 120 days. ca= organogenic callus; bra= areolar shoot; bro= organogenic shoot; br= shoot; alm= starch; pa= parenchyma; proc= procambium; mab= apical meristem of bud; x= xylem; f= phloem; em= modified spines.

Coryphantha retusa (Ruvalcaba, *et al.*, 2010); *Turbiniacarpus* spp. (Dávila *et al.*, 2005) y *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006). En la propagación *in vitro* de estas especies y diversas cactáceas se han empleado de manera exitosa diferentes medios de cultivo (Vidican y Cachita, 2010) pero el medio MS (1962) ha resultado el más satisfactorio. Sin embargo, las respuestas morfogénicas deseadas dependen principalmente del tipo y concentración de regulador de crecimiento usado, y esto coincide con lo obtenido en esta investigación.

En la diferenciación de callos de *Mammillaria albicoma* y *Coryphantha retusa* los mejores resultados se alcanzaron con el ácido naftalenacético con un rango de concentraciones de 2.6 y 26 μM (Wyka *et al.*, 2006; Ruvalcaba *et al.*, 2010). La acción individual de las auxinas o su combinación con citocininas, así como su concentración determinan el éxito de las respuestas organogénicas observadas durante las diversas técnicas de propagación (Quiala *et al.*, 2004).

La producción de brotes en esta etapa del proceso fue resultado de la activación de yemas axilares presentes en los explantes; sin embargo, sólo se obtuvo con la combinación de 2,4-D (18 μM) y cinetina (9.3 y 13.9 μM). Estas concentraciones favorecieron la regeneración de uno a tres brotes por explante, mientras las dosis de 13.5 μM de 2,4-D y 4.6 μM de cinetina indujeron dos brotes en promedio (Cuadro 1). En este tiempo no se observó la regeneración de brotes en la organogénesis indirecta. Si bien, no todos los tratamientos que incluyeron cinetina lograron la regeneración de brotes, se observó que dosis medias fueron capaces de romper la latencia de las yemas axilares y activar los meristemas de las aréolas.

Proliferación de callos y multiplicación de brotes

Los brotes y callos obtenidos en la etapa de inducción de callos y brotes se subcultivaron tres veces (30, 60 y 90 días) a los mismos medios de cultivo para promover la organogénesis indirecta y la multiplicación de brotes. Todas las dosis de auxinas promovieron la proliferación de los callos ($p \leq 05$). El mayor crecimiento de callos de apariencia friable se logró con 18 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina; a los 30 días del subcultivo triplicaron su peso inicial al pasar de 2 a 6 g. A los 60 y 90 días de cultivo la tasa de crecimiento se redujo y los callos alcanzaron un peso promedio final de 6.9 g (Cuadro 1 y 2).

Respecto a la brotación, se observó que la regeneración de brotes tuvo lugar a partir de la activación areolar, como sucedió en los cultivos de inducción, y la diferenciación de

These responses are similar to those reported in *in vitro* morphogenesis of other species of cactus, as *Notocactus magnificus* (De Medeiros *et al.*, 2006), *Opuntia* spp. (Juárez and Passera, 2002; Estrada *et al.*, 2008); *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010); *Turbiniacarpus* spp. (Dávila *et al.*, 2005) and *Mammillaria albicoma* (Wyka *et al.*, 2006). *In vitro* propagation of these species and various cacti have been successfully employed in different culture media (Vidican and Cachita, 2010) but the MS medium (1962) has been the most satisfactory. However, the desired morphogenic responses depend mainly on the type and concentration of growth regulator used, and this agrees with what was obtained in this research.

In callus differentiation in *Mammillaria albicoma* and *Coryphantha retusa* the best results were achieved with naphthaleneacetic acid with a concentration range of 2.6 and 26 μM (Wyka *et al.*, 2006; Ruvalcaba *et al.*, 2010). The individual action of auxins or the combination with cytokinins and its concentrations determine the success of the organogenic responses observed during various propagation techniques (Quiala *et al.*, 2004).

The shoots production at this stage of the process was the result of the activation of axillary buds present in the explants; however, it was only obtained with the combination of 2,4-D (18 μM) and kinetin (9.3 and 13.9 μM). These concentrations favored the regeneration of one to three shoots per explant, while the doses of 13.5 μM of 2,4-D and 4.6 μM of kinetin induced two shoots on average (Table 1). At this time the regeneration of shoots in indirect organogenesis was not observed. Although not all treatments that included kinetin achieved bud regeneration, it was observed that mean doses were able to break the latency of the axillary buds and activate the meristems of the areolas.

Calli proliferation and shoot multiplication

The buds and calli obtained in the callus and bud induction stage were subcultured three times (30, 60 and 90 days) in the same culture media to promote indirect organogenesis and shoot multiplication. All doses of auxin promoted callus proliferation ($p \leq 05$). The highest growth of calli with friable appearance was achieved with 18 μM of 2,4-D and 9.3 μM of kinetin; at 30 days of the subculture, its initial weight was tripled from 2 to 6 g. At 60 and 90 days of growth the growth rate was reduced and the callus reached a final average weight of 6.9 g (Table 1 and 2).

primordios de brotes a partir de organogénesis adventicia indirecta proveniente de células desdiferenciadas. En ninguno de los tratamientos se observaron daños por hiperhidratación, u oscurecimiento de tejido, y los nuevos brotes mostraron una apariencia normal.

La mejor respuesta en la brotación areolar se obtuvo con 18 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina donde se expresó el mayor número de explantes que generaron brotes areolares y la cantidad promedio de brotes por explante fue de 11.4 a los 90 días de cultivo (Cuadro 3). En cuanto a los brotes organogénicos, estas mismas concentraciones de reguladores de crecimiento favorecieron la mayor respuesta de regeneración de brotes en los tres periodos de subcultivo (Cuadro 4).

Regarding to sprouting, it was observed that the regeneration of shoots took place from areolar activation, as happened in the induction cultures, and the differentiation of primordia shoot from indirect adventitious organogenesis derived from dedifferentiated cells. None of the treatments showed damage by hyperhydration, or darkening of tissue, and the new shoots showed a normal appearance.

The best response in areolar budding was obtained with 18 μM of 2,4-D and 9.3 μM of kinetin where the largest number of explants that generated shoot outbreaks was expressed and the average number of shoots per explant was 11.4 at 90 days (Table 3). As for organogenic outbreaks, these same concentrations of growth regulators favored the higher bud regeneration response in the three subculture periods (Table 4).

Cuadro 2. Efecto de 2,4-D y cinetina en la proliferación de callos de *M. plumosa* después de 30, 60 y 90 días de cultivo.
Table 2. Effect of 2,4-D and kinetin in the callus proliferation of *M. plumosa* after 30, 60 and 90 days culture.

2,4-D + cinetina (μM)	Regeneración callo (%) [†]			Peso fresco callo (g) [†]		
	30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
0 + 0	0 d	0 b	0 b	0 d	0 e	0.4 d
9 + 4.6	79 d	90 a	90 a	2.1 cd	2.2 cd	3.4 bc
9 + 9.3	79 c	90 a	90 a	1.8 d	2 d	2.9 c
9 + 13.9	79 d	90 a	90 a	1.9 d	2.2 cd	3.5 bc
13.5 + 4.6	64 d	90 a	90 a	1.8 d	2.5 cd	3.1 bc
13.5 + 9.3	79 d	90 a	90 a	2.1 cd	2.2 d	3.5 bc
13.5 + 13.9	89 bc	90 a	90 a	3.4 bc	3.4 cd	4.6 abc
18 + 4.6	89 bc	90 a	90 a	4.5 ab	4.4 ab	4.9 ab
18 + 9.3	95 a	100 a	100 a	6 a	6.5 a	6.9 a
18 + 13.9	87 bc	90 a	90 a	4.6 ab	4.4 ab	5 ab

[†]= Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 3. Efecto de 2,4-D y cinetina en la multiplicación brotes areolares de *M. plumosa* a 30, 60 y 90 días de cultivo.
Table 3. Effect of 2,4-D and kinetin in areolar outbreaks multiplication of *M. plumosa* at 30, 60 and 90 days culture.

2,4-D + cinetina (μM)	Explantes con brotes areolares (núm.) [†]			Brotes areolares por explante (núm.) [†]		
	30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
0 + 0	0 c	1 cb	0 d	0 d	0 e	0 d
9 + 4.6	0.8 c	2 cb	0.8 cb	0.11 d	0.37 ed	0.5 d
9 + 9.3	0.8 c	3 cb	0.7 cb	0.09 d	0.36 ed	0.5 d
9 + 13.9	0.8 c	3 cb	0.7 cb	0.09 d	0.38 ed	0.8 cd
13.5 + 4.6	4.3 ba	4.8 cb	12 cb	0.88 cb	1.83 cbd	2.6 cb
13.5 + 9.3	0.8 c	0.6 c	1 cbd	0.13 d	0.64 ed	0.8 cd
13.5 + 13.9	0.8 c	2 cb	1 cb	0.11 d	0.49 ed	1.1 cbd
18 + 4.6	1.8 bc	2.4 cb	4 cbd	0.33 cd	1 ced	1.4 cbd
18 + 9.3	7.6 a	58.8 a	116 a	2.68 a	6.24 a	11.4 a
18 + 13.9	5.4 a	7 b	16 b	1.36 b	2.15 b	3.3 b

[†]= Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 4. Efecto de 2,4-D y cinetina en la multiplicación de brotes organogénicos de *M. plumosa* a 30, 60 y 90 días de cultivo.
Table 4. Effect of 2,4-D and kinetin in the multiplication of organogenic shoots of *M. plumosa* at 30, 60 and 90 days culture.

2,4-D + cinetina (μM)	Explantos con brotes organogénicos (número) [†]			Brotes organogénicos por explante (número) [†]		
	30 días	60 días	90 días	30 días	60 días	90 días
0 + 0	0 c	0 d	0.5 c	0 c	0.4 bc	0.6 c
9 + 4.6	0.5 c	1.2 bdc	0.8 c	0.3 bc	0.4 bc	0.8 c
9 + 9.3	0.5 c	1 bdc	0.9 c	0.2 bc	0.4 bc	0.7 c
9 + 13.9	0.5 c	0.5 dc	1.8 bc	0.6 ba	0.9 ba	1 bc
13.5 + 4.6	2 b	3.7 bac	1.7 bc	0.3 bc	0.6 bc	1 bc
13.5 + 9.3	1 cb	2 bdc	1.1 c	0.2 bc	0.6 bc	0.9 c
13.5 + 13.9	0.5 c	2.1 bdc	2.1 bc	0.2 bc	0.7 bc	1.1 bc
18 + 4.6	0.5 c	3 bdc	6.1 ba	1.1 a	1.6 a	1.9 ba
18 + 9.3	4.6 a	8 a	10 a	0.4 b	0.9 bac	2.4 a
18 + 13.9	1.5 cb	4.4 ba	1.5 bc	0 c	0.3 c	0.9 bc

[†]= Medias con letra diferente entre columnas son diferentes; Tukey ($p \leq 0.05$).

Las respuestas de regeneración de brotes obtenidas en el presente estudio son diferentes a los reportados para otras especies de cactáceas. En *Coryphantha elephantidens* la organogénesis indirecta de brotes se logró con 2.3 μM de 2,4-D y 6.9 μM de cinetina (Wakhlu y Bhau, 2000), mientras que en *Opuntia ficus-indica* la regeneración se obtuvo 2.26 μM de 2,4-D y 2.21 μM de BA con valores de 2 a 3 brotes por explante (Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011), cantidad considerablemente menor a la obtenida en este trabajo.

La activación del crecimiento de las yemas axilares areolares, de cada explante de *Mamillaria plumosa* promovida por el 2,4-D y la cinetina, puede considerarse alta; sin embargo, en la regeneración de los cactus *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* se obtuvieron 13.7 y 12.3 brotes por explante, respectivamente, con 8.8 μM de BA (8.8) (Pérez y Dávila, 2002). Asimismo, Mata *et al.* (2001) determinaron que la mayor tasa de multiplicación de brotes en *Turbincarpus laui* se obtuvo con BA (8.8-13.32 μM) y ácido naftalenacético (0 - 2.68 μM).

En todo proceso morfogénico, el número de brotes producido está determinado genéticamente y se considera el principal indicador del potencial de multiplicación de una especie. La cantidad de brotes refleja el número de plantas potenciales adultas y en este estudio, la cantidad promedio de brotes que pueden regenerarse a partir de un explante de *M. plumosa* es de 537 aproximadamente, después de 120 días de cultivo.

The shoot regeneration responses obtained in this research are different from those reported for other cactus species. In *Coryphantha elephantidens* indirect organogenesis of shoots was achieved with 2.3 μM 2,4-D and 6.9 μM kinetin (Wakhlu and Bhau, 2000), while in *Opuntia ficus-indica* regeneration was obtained with 2.26 μM of 2,4-D and 2.21 μM of BA with values of 2 to 3 shoots per explant (Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011), significantly lower amount than what was obtained in this research.

Activation of growth of areolar axillary buds of each explant of *Mamillaria plumosa* promoted by 2,4-D and kinetin can be considered high; however, in the regeneration of *Pelecypora aselliformis* and *P. strobiliformis* cactus 13.7 and 12.3 shoots per explant were obtained, respectively, with 8.8 μM of BA (8.8) (Pérez and Dávila, 2002). Also, Mata *et al.* (2001) determined that higher shoot multiplication in *Turbincarpus laui* was obtained with BA (8.8-13.32 μM) and naphthaleneacetic acid (0 - 2.68 μM).

In all morphogenic processes, the produced outbreaks number is genetically determined and is considered the main indicator of the multiplication potential of a species. The shoots amount reflects the number of potential adult plants and in this research, the average number of shoots that can be regenerated from an explant of *M. plumosa* is 537 approximately after 120 days of culture.

Análisis histológico

El análisis histológico permitió caracterizar el origen y desarrollo de los brotes a partir de los callos organogénicos. Se observaron tres etapas identificadas como estadio 1 (inicial; 60 días); estadio 2 (intermedio; 90 días) y estadio 3 (diferenciado; 120 días). En el inicial, el callo estuvo formado por células de parénquima, isodiamétricas de paredes delgadas con granos de almidón. También se observó actividad meristemática subepidérmica que promovió el levantamiento de una protuberancia globosa, caracterizada por la diferenciación de procambium en la parte central (Figura 1e-f). En el estadio intermedio, el callo se tornó de un color más verde y aumentó el número de brotes con mayor grado de diferenciación.

Se observó la formación de un meristemo apical, diferenciación de una areola juvenil, con primordios de espinas, irrigados por un haz de xilema y floema diferenciado y funcional (Figura 1g-h). En el estadio diferenciado se presentó un callo con numerosos brotes verdes claramente diferenciados (Figura 1i); el parénquima del callo desarrolló numerosos haces vasculares de tipo anficribal (floema externo y xilema interno) con ramales orientados hacia los brotes. Estos brotes presentaron espinas modificadas en el centro de la areola con haces vasculares maduros (Figura 1j). Finalmente, los brotes crecieron y la base del nuevo brote se adelgazó y desprendió del callo y regenerar un nuevo individuo.

Enraizamiento

En la etapa de multiplicación, los brotes areolares y organogénicos de novo de *Mammillaria plumosa* generaron raíces de forma natural a 90 días de cultivo. La formación de raíces en los brotes regenerados durante todo el proceso morfogénico representa una ventaja en comparación con otras especies donde es necesaria una etapa de enraizamiento con reguladores de crecimiento específicos que induzcan al número y longitud de raíces. Sin embargo, los brotes se cultivaron en medio básico MS (1962) sin reguladores de crecimiento para mejorar la respuesta. A las cuatro semanas de cultivo los brotes constituyeron un sistema radical con 2 a 4 raíces en promedio.

En las cactáceas se ha reportado que, en general, son especies fáciles de enraizar tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* y que, de la misma manera, pueden diferenciar raíces adventicias sin la presencia de auxinas. Dávila-Figueroa *et*

Histological analysis

The histological analysis allowed to characterize the origin and development of the shoots from the organogenic calli. Three stages identified as stage 1 (initial; 60 days); Stage 2 (intermediate, 90 days) and stage 3 (differentiated, 120 days) were observed. In the initial, the callus was formed by parenchyma cells, isodiametric thin-walled cells with starch grains. Subepidermal meristematic activity was also observed, which promoted the lifting of a globular protuberance, characterized by the differentiation of procambium in the central part (Figure 1e-f). In the intermediate stage, the callus turned a greener color and the number of shoots with a greater differentiation degree increased.

The formation of an apical meristem, differentiation of a juvenile areola, with spines primordia, irrigated by a xylem beam and differentiated and functional phloem was observed (Figure 1g-h). In the differentiated stage a callus appeared with numerous clearly differentiated green shoots (Figure 1i); the callus parenchyma developed numerous vascular bundles of anficribal type (external phloem and internal xylem) with branches oriented towards the buds. These shoots had modified spines in the center of the areola with mature vascular bundles (Figure 1j). Finally, the shoots grew and the base of the new shoot became thinner and detached from the callus and regenerate a new individual.

Rooting

In the multiplication stage, the areolar and organogenic novo shoots of *Mammillaria plumosa* naturally generated roots after 90 days of culture. Root formation in regenerated shoots throughout the morphogenic process represents an advantage compared to other species where a rooting stage with specific growth regulators is required to induce or improve the number and length of roots. However, the shoots were grown in MS basic medium (1962) without growth regulators to improve response. At four weeks of cultivation the shoots constituted a radical system with 2 to 4 roots on average.

In cactaceae it has been reported that, in general, are easy to root species both *in vitro* and *in vivo* conditions which, in the same way, can show differentiated adventitious roots without the presence of auxin. Dávila-Figueroa *et al.* (2005) indicated that the *in vitro* rooting of buds

al. (2005) indicaron que el enraizamiento *in vitro* de brotes de los cactus *Turbincarpus schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus* y *T. subterraneus* regenerados (54 - 94%) se logró en medio básico MS (1962) sin reguladores de crecimiento. En otras especies como *Pilocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) y *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001) el enraizamiento *in vitro* (94-100%) también fue efectivo en el medio básico MS (1962) pero con la mitad de concentración nutrientes. En el caso de *Pilocereus aselliformis* y *P. strobiliformis* la mejor respuesta de enraizamiento (87-89%) se obtuvo con ácido indolbutírico o ácido indolacético (Pérez y Dávila, 2002).

Aclimatación de plantas

En la etapa de aclimatación se utilizaron los brotes enraizados *in vitro* de *Mammillaria plumosa* que se plantaron en macetas que contenían una mezcla proporcional (1:1) de turba y arena de río. A 30 días la tasa de supervivencia de las plantas fue de 85%, que es un porcentaje aceptable. En la aclimatación de plantas de cactáceas regeneradas *in vitro* los porcentajes de supervivencia pueden ser variable; 70% en *Schlumbergera truncata*, 88% en *Pilocereus aselliformis* y *P. strobiliformis* (Pérez y Dávila, 2002) y 94-100% en *Turbincarpus laui*, *Coryphantha elephantidens* y *Mammillaria carmenae* (Mata *et al.*, 2001; Coca *et al.*, 2007).

Conclusiones

Se estableció un sistema de regeneración *in vitro* para *Mammillaria plumosa* vía organogénesis directa e indirecta a partir de explantes areolares. La morfogénesis se caracterizó por la diferenciación de tejidos desorganizados o caulogénesis y la diferenciación de estructuras organizadas u órganos (organogénesis directa e indirecta). El promedio de brotes producidos fue 12 y el potencial de multiplicación fue de 500 brotes en promedio después de 20 semanas de cultivo, incrementándose el número de plantas al aumentar el número de subcultivos. La regeneración de brotes para ambas rutas fue promovido por la combinación de 18 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina, tanto en la etapa de inducción como en la de multiplicación. La generación de raíces adventicias para la producción de plantas completas fue posible en medio de cultivo básico MS (1962) a la mitad de concentración de nutrientes totales. La supervivencia de plantas en la aclimatación fue 85% en sustrato de turba y arena de río (1:1). El sistema desarrollado es eficiente para la propagación masiva de *Mammillaria plumosa* y contribuirá

of *Turbincarpus schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus* and *T. subterraneus* regenerated cacti (54-94%) was achieved in basic medium MS (1962) without growth regulators. In other species as *Pilocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) and *Turbincarpus laui* (Mata *et al.*, 2001) *in vitro* rooting (94-100%) was also effective in the basic medium MS (1962) but with half nutrient concentration. For *Pilocereus aselliformis* and *P. strobiliformis* the best rooting response (87-89%) was obtained with indole butyric acid or indoleacetic acid (Pérez and Dávila, 2002).

Acclimatization of plants

For the acclimatization stage, *in vitro* rooted shoots of *Mammillaria feathery* were used and planted in pots containing a proportional mixture (1:1) of peat and river sand. At 30 days the survival rate of the plants was 85%, which is an acceptable percentage. Acclimatization of plants of *in vitro* regenerated cacti, survival rates can be variable; 70% in *Schlumbergera truncata*, 88% in *Pilocereus aselliformis* and *P. strobiliformis* (Pérez and Dávila, 2002) and 94-100% in *Turbincarpus laui*, *Coryphantha elephantidens* and *Mammillaria carmenae* (Mata *et al.*, 2001; Coca *et al.*, 2007).

Conclusions

A system for *in vitro* regeneration for *Mammillaria plumosa* via direct and indirect organogenesis was established from areolar explants. Morphogenesis was characterized by the differentiation of disorganized tissues or caulogenesis and the differentiation of organized structures or organs (direct and indirect organogenesis). The average number of shoots produced was 12 and the multiplication potential was 500 shoots on average after 20 weeks of cultivation, increasing the number of plants by increasing the number of subcultures. The regeneration of shoots for both routes was promoted by the combination of 18 μM of 2,4-D and 9.3 μM of kinetin, both in the induction and multiplication stages. The generation of adventitious roots for the production of complete plants was possible in a basic culture medium MS (1962) at half the concentration of total nutrients. The plants survival in the acclimatization was 85% in peat and river sand substrate (1:1). The developed system is efficient for mass propagation of *Mammillaria plumosa* and will help

a satisfacer la demanda comercial de esta especie así como su aplicación en estrategias de rescate y conservación de poblaciones silvestres.

to meet the commercial demand for this species and its implementation on rescue strategies and conservation of wild populations.

Literatura citada

End of the English version



- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Timber Press Inc. Portland, Oregon, USA. 776 p.
- Angulo, B. P. I. and Paredes, L. O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Sci. Hortic.* 128:283-288.
- Arias, M. S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 44:109-115.
- Arias, S.; Guzmán, U.; Mandujano, M. C.; Soto, G. M. and Golubov, J. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México). La lista roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50:100-110.
- Bravo, H. H. y Scheinvar, L. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica (FCE). UNAM. México. 233 p.
- Coca, S. E.; Ortiz, M. J. G.; Sánchez, C. S. y Pérez, C. J. 2007. Efecto de la irradiación luminosa en la aclimatación de *Mammillaria carmenae* Castañeda (Cactaceae) proveniente de cultivo *in vitro*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 72:101-108.
- Davila, F. C. A.; De la Rosa, C. M. L. and Perez, M. B. E. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In vitro Cell Development Biology Plant*. 41:540-545.
- De Madeiros, L. A.; De Ribeiro, R. C. S.; Gallo, L. A.; De Oliveira, E. T. and Dematte, M. E. S. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84:165-169.
- Estrada, L. A. A.; López, P. C. and Cárdenas, S. E. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Sci. Hortic.* 92:317-327.
- Estrada, L. A. A.; Martínez, H. J. J.; Torres, T. M. E. and Chablé, M. F. 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. Hortic.* 117:378-385.
- George E. F. and Debergh, P. C. 2008. Micropropagation: Uses and methods. In: George, E. F. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd. Ed. Springer, Netherlands. 29-64 pp.
- Gómez, J. J. L.; Morales, J. E.; Lechuga, C. J. A. y Cruz, S. F. 2006. Reproducción *in vitro* de garrambullo *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 51:36-45.
- Jiménez, F. A. y Jiménez, S. C. 2007. Uso y manejo de las cactáceas en la reserva de la biosfera barranca de Metztlán, Hidalgo, México. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*. 7:78-85.
- Jiménez, S. C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. UNAM. 12:1-22.
- Juárez, M. C. and Passera, C. B. 2002. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell* 26:319-324.
- Lema, R. J. and Kulus, D. 2014. Micropropagation of cacti-A review. *Haseltonia*. 19:46-63.
- Mata, R. M.; Monroy, de la R. M.; Moebius, G. K. and Chavez, A. V. M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*. 37:400-404.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-493.
- Pérez, M. B. E. and Dávila, F. C. A. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann. *In vitro Cell Develop. Biol. Plant*. 38:73-78.
- Preil, W. 2003. Micropropagation of ornamental plants. In: Laimer, D. M. and Rücker, W. (Eds.). *Plant Tissue Culture - 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Springer, Vienna. 115-133 pp.
- Quiala, E.; Montalvo, G. y Matos, J. 2004. Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal*. 4:195-199.
- Quiala E.; Matos, J.; Montalvo, G.; De Fera, M.; Chávez, M.; Capote, A.; Pérez, N.; Barbón, R. and Kowalski, B. 2009. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 11:18-25.
- Ramírez, M. R.; Aguilar, R. I.; Borodanenko, A.; Perez, M. L.; Barrera, G. J. L.; Nunez, P. H. G. and Ochoa, A. N. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cell Developmental Biology Plant*. 43:660-665.
- Rojas, A. M. and Vázquez, Y. C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*. 44:85-104.
- Ruvalcaba, R. D.; Rojas, B. D. y Valencia, B. A. J. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12:139-143.
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant microtechnique microscopy*. Oxford University Press. 322 p.
- SAS Institute. 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- SEMARNAT. 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF).
- Smith, R. 2013. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 3rd. Ed. Academic Press. USA. 188 p.
- Vidican, T. I. and Cachita, C. D. 2010. Initiation of *Opuntia fragilis* var. *fragilis* *in vitro* cultures. *Seria Stiințele Vietii*. 20:35-40.
- Wakhlu, A. K. and Bhau B. S. 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*. 36:211-214.

Wyka, T.; Hamerska, M. and Wróblewska, M. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *M. albicoma*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 87:27-32.

Zavaleta, M. H. A. and Engleman, E. M. 1994. Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology*. 44:169-175.