

EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO, KINETINA Y AGENTES OSMÓTICOS SOBRE LA RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE *Astrophytum myriostigma* (CACTACEA) *in vitro*

EFFECT OF MEDIUM, KINETIN AND OSMOTIC AGENTS ON THE *in vitro* MORPHOGENETIC RESPONSE OF *Astrophytum myriostigma* (CACTACEA)

María del Socorro Santos Díaz^{1*}, José Manuel Martín del Campo Macías¹, Alberto Arredondo Gómez² y María de Lourdes Santos Díaz¹

¹Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Col. Universitaria. CP 78210, San Luis Potosí, S.L.P. México. Fax 01(444) 426-2372. Correo electrónico: ssantos@uaslp.mx. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro Experimental Palma de la Cruz, Km 14.5 carr. San Luis-Matehuala, San Luis Potosí, México.

* Autor responsable

RESUMEN

Astrophytum myriostigma es una cactácea amenazada de extinción en los sitios en que crece silvestre. Este trabajo describe el efecto del medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos en la germinación de las semillas, crecimiento de los brotes, formación de brotes nuevos y enraizamiento de los mismos en condiciones *in vitro*, como método alternativo para su conservación y propagación. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio-Tween 20 y etanol y se germinaron en el medio MS a la mitad de la concentración de sus sales, ½ MS, y en el medio de Schenk y Hildebrandt (SH). El porcentaje de germinación y el crecimiento de las plántulas (medido como incremento en la longitud del hipocotilo y raíz, y ganancia en peso seco y fresco) fueron dos a seis veces mayor en el medio ½ MS que en el medio SH. Para inducir la formación de brotes nuevos, segmentos longitudinales de las plántulas se colocaron en medio MS con 0.5 mg L⁻¹ (C0.5), 1 mg L⁻¹ (C1) ó 2 mg L⁻¹ (C2) de cinetina. En estos medios también se evaluó la calidad de los brotes analizando la formación de callo y la hidratación de los brotes. El mejor medio fue el medio C2 en el que se obtuvieron 14 brotes por explante. Con el fin de promover una mayor compactación de los brotes y favorecer su enraizamiento, éstos se transfirieron a medio ½ MS conteniendo 1 ó 2 % de manitol o polietilenglicol. En los cuatro tratamientos se obtuvieron brotes compactos y bien definidos a las ocho semanas.

Palabras clave: *Astrophytum myriostigma*, bonete de obispo, cactáceas, micropropagación

SUMMARY

Astrophytum myriostigma is a cactacea considered as threatened by extinction on the locations where it grows wild. As an alternative procedure for its conservation, the present work describes the effect of culture medium, kinetin, and osmotic agents on germination, shoot growth, formation and rooting *in vitro*. Seeds were sterilized with sodium hypochlorite-Tween 20 and ethanol and germinated on half strength concentration MS (½ MS) and Schenk-Hildebrandt (SH) media. Germination and plant growth (recorded as an increased in epicotyl and root length and gain in fresh and dry weight) were two to six fold higher on ½ MS than in SH. To induce shooting, longitudinal segments were grown into MS containing 0.5 mg L⁻¹ (C0.5), 1

mg L⁻¹ (C1) y 2 mg L⁻¹ (C2) of kinetin. The highest shoot number (14 shoots per explant) was obtained on C2 medium. To promote a higher number of compact shoots and rooting, shoots were transferred to ½ MS medium containing 1 or 2 % manitol or polyethyleneglycol. After eight weeks well defined and compact plants were obtained under the four treatments.

Index words: *Astrophytum myriostigma*, bishop's cap, cactacea, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

México tiene el privilegio de albergar en su territorio la más grande variedad de cactáceas, con aproximadamente 48 géneros y 563 especies reconocidas (Hernández y Godínez, 1994). Desafortunadamente muchas de las cactáceas mexicanas están consideradas dentro de la Norma Oficial Mexicana Ecol-059 como amenazadas o en peligro de extinción (Diario Oficial de la Federación, 1994). Esta situación se debe a la destrucción del hábitat natural por diferentes actividades humanas como industrialización y urbanización, apertura de nuevas áreas para la agricultura y ganadería, construcción de caminos, y al saqueo ilegal de plantas colectadas de su hábitat natural. Por otro lado, las cactáceas son altamente apreciadas como ornamentales por su diversidad de formas y la vistosidad de sus flores. Ya que en México existen poco viveros comerciales que reproduzcan estas especies, la demanda internacional y nacional se abastece con ejemplares obtenidos del campo.

Astrophytum myriostigma es una cactácea mexicana considerada como amenazada de extinción en los sitios en que crece silvestre. Se distribuye principalmente en la región Centro-Norte del país en los Estados de Coahuila, Chihua-

hua, Durango, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas. Es conocida como "peyote cimarrón", "mitra" y "bonete o birrete de obispo". Para evitar la desaparición de esta especie y cubrir la demanda que tiene como ornamental, es necesario establecer métodos de propagación que permitan asegurar su sobrevivencia.

Esta especie puede propagarse por semilla de manera exitosa (Arredondo-Gómez y Camacho, 1995). Sin embargo, para incrementar su capacidad de crecimiento y el número de brotes nuevos pueden usarse métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos vegetales. Esta tecnología ha sido utilizada con éxito para la reproducción de diferentes cactáceas como *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon, 1987), *Mammillaria san angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992), *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992), *Pelecypora asseliformis* y *Turbinicarpus laui* (Méndez-Ontiveros, 1998) y *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1999).

En relación a *A. myriostigma*, se ha descrito previamente su propagación usando ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) en combinación con benciladenina (BAP) o cinetina (Cin) obteniéndose alrededor de nueve brotes por explante (Vyskot y Jara, 1984; Pérez-Molphe Balch *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se estudió el efecto de los medios de cultivo, cinetina y agentes osmóticos en la respuesta morfofenética de *A. myriostigma*. Los resultados, sustentados por análisis estadísticos, mostraron que el número de brotes nuevos fue superior al descrito en estudios anteriores y por lo tanto el protocolo desarrollado constituye un método alternativo para la propagación comercial de *A. myriostigma*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Se usaron los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) que contenían 116 µM de mio-inositol, 1.2 µM de tiamina-HCl, 3 % de sacarosa y 0.35 % de Phytigel. El pH de los medios se ajustó a 5.7 con NH₄OH 0.1 M antes de su esterilización en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2°C con fotoperíodo de 16 h.

Desinfección y germinación de las semillas. Las semillas de *A. myriostigma* procedentes de plantas maduras se mantuvieron 1 h en agua desionizada y se seleccionaron solamente las que se fueron al fondo del recipiente. Las semillas seleccionadas se mantuvieron en agua con jabón durante 2 h con agitación constante, se colocaron 1 h bajo

el chorro de agua y se remojaron 3 días en agua desionizada. Posteriormente se desinfectaron con etanol 70 % durante 2 minutos, peróxido de hidrógeno 30 % durante 10 minutos y solución de hipoclorito de sodio 20 % + Tween 20 a 0.2 % durante 20 minutos. Por último se lavaron abundantemente con agua desionizada estéril.

Las semillas se germinaron en los medios SH y ½ MS, el medio MS a la mitad de la concentración de sus sales. Cada tratamiento incluyó tres repeticiones y 50 semillas por repetición. La germinación se evaluó a los 25 días, tomando como parámetro el Índice de Maguire (IM). Este valor es una medida de la calidad de la germinación que considera la capacidad, velocidad y uniformidad germinativa (Maguire, 1962), y se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IM = C \cdot \sum (Gi/Di)$$

donde:

C = 100/número de semillas utilizadas como tamaño de muestra por repetición.

Gi = semillas germinadas al día que indica el subíndice i.

Di = días transcurridos desde la siembra hasta la fecha de la evaluación que indica el subíndice i.

Pruebas de crecimiento. El crecimiento de las plantas se determinó en los medios ½ MS y SH usando plantas germinadas de 25 días de edad. Se evaluó el incremento en la longitud del hipocotilo y de las raíces, y la ganancia en pesos fresco y seco (secado 5 h a 90 °C) a las 4 y 6 semanas.

Pruebas de brotación. Para inducir la formación de brotes nuevos, las plántulas de aproximadamente 7-10 mm se cortaron en dos segmentos longitudinales, los cuales se colocaron en medio MS conteniendo el doble de la concentración de cloruro de calcio descrita originalmente por Murashige y Skoog (MS-2Ca), 12 g L⁻¹ de agar y las siguientes concentraciones de cinetina: 0.5 mg L⁻¹ (C0.5), 1 mg L⁻¹ (C1) y 2 mg L⁻¹ (C2). En pruebas preliminares se probaron BAP o Cin solas o en combinación con ANA (0.01, 0.5 y 1 mg L⁻¹) o con 1 % de carbón activado. Estos estudios mostraron que Cin generó mejores brotes que BAP, por lo que se seleccionó aquella para los siguientes experimentos. Cada tratamiento incluyó tres repeticiones y 20 explantes por repetición.

Ya que es importante evaluar la calidad del brote, se determinó además de la generación de brotes nuevos, la formación de callo y el grado de compactación del tejido a los 30, 60 y 90 días. La formación de callo y la hidratación se consideraron como ausencia (0), baja (+), mode-

rada (++) y alta (+++). Estos datos se transformaron a (n+1) para reducir la subjetividad de los valores en cada unidad experimental, que correspondió a un frasco con cuatro explantes (Steel y Torrie, 1980).

Compactación y enraizamiento de las plantas. Para incrementar la compactación de los brotes y la formación de raíz, éstos se transfirieron a medio $\frac{1}{2}$ MS conteniendo el doble de la concentración de cloruro de calcio ($\frac{1}{2}$ MS-2Ca) y con 1 ó 2 % de manitol o de polietilenglicol. Se usaron 15 frascos conteniendo cada uno cuatro explantes. La evaluación se realizó a las 4 y 8 semanas de cultivo.

Análisis estadístico. El diseño experimental correspondió a un arreglo completamente al azar. Los datos de germinación, crecimiento, brotación y compactación se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey. Se utilizó el Paquete de Diseños Experimentales FAUANL, versión 2.0 de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación y desarrollo. Con el fin de conocer si los medios de cultivo utilizados influían en la germinación de la semilla se determinaron el Índice de Maguire (IM) y el porcentaje de germinación. Se obtuvieron mayores valores de IM y porcentajes de germinación en el medio $\frac{1}{2}$ MS en relación al medio SH (Cuadro 1) y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 1. Valor germinativo y porcentaje de germinación de *A. myriostigma* en los medios indicados.

Medio	Índice Maguire ⁽¹⁾	Germinación ⁽¹⁾ (%)
$\frac{1}{2}$ MS	8.98 a	85 a
SH	7.49 b	69 b

⁽¹⁾ Los tratamientos con letras diferentes difieren significativamente (Tukey, 0.05).

En la literatura se han descrito valores hasta de 90 % de germinación de las semillas de *A. myriostigma* sobre papel filtro húmedo a 25 °C (Arredondo-Gómez y Camacho, 1995). El menor porcentaje de germinación obtenido en este trabajo probablemente se deba a que algunos embriones se dañaron durante el proceso de esterilización. Sin embargo, cuando se usan tratamientos más suaves de desinfección se incrementa de manera importante el número de semillas contaminadas.

En cuanto al crecimiento de las plántulas después de 4 y 6 semanas en el medio $\frac{1}{2}$ MS, se obtuvo un incremento de 1.5 a 2 veces en la longitud del hipocotilo y de la raíz, respectivamente, en comparación con el medio SH (Cuadro 2). Asimismo, las ganancias en pesos fresco y seco

fueron entre seis y tres veces mayor en medio $\frac{1}{2}$ MS que en el medio SH, respectivamente (Cuadro 2), confirmando los datos obtenidos en el Cuadro 1. El medio $\frac{1}{2}$ MS difiere del medio SH en su mayor contenido de glicina y de sales minerales, y en la fuente de nitrógeno (nitratos en $\frac{1}{2}$ MS y amonio en el medio SH). Dado que los suelos donde crecen las cactáceas se caracterizan por poseer elevadas concentraciones de sales (Pizzetti, 1992), el mayor porcentaje de germinación y el mejor crecimiento de *A. myriostigma* en el medio $\frac{1}{2}$ MS seguramente están relacionados al contenido de sales en el medio. Resultados similares se han obtenido con otras especies. Por ejemplo, la germinación *in vitro* de semillas de *Mammillaria candida* fue de 93, 95 y 86 % en medios MS, $\frac{1}{2}$ MS y SH, respectivamente (Elías-Rocha *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento de las plantas de *A. myriostigma* ⁽¹⁾.

Variable	4 semanas		6 semanas	
	$\frac{1}{2}$ MS	SH	$\frac{1}{2}$ MS	SH
Long. hipocotilo (mm)	9.66 a	4.83 b	10.16 a	4.80 b
Long. raíz (mm)	15.50 a	7.83 b	15.50 a	10.00 b
Peso verde (g)	0.13 a	0.02 b	0.17 a	0.02 b
Peso seco (mg)	3.80 a	0.01 b	6.90 a	2.10 b

⁽¹⁾ A lo largo del renglón los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

Pruebas de brotación. Las plantas obtenidas en la etapa de germinación en el medio $\frac{1}{2}$ MS se cortaron longitudinalmente y los segmentos obtenidos se colocaron en los medios de brotación para promover la regeneración de la planta y la inducción de brotes nuevos. Se ha descrito que el calcio es importante para el crecimiento de las cactáceas (Hubstenberger *et al.*, 1989). Por tanto, a todos los medios de brotación se les adicionó el doble de la concentración de cloruro de calcio descrita por Murashige y Skoog. A los 30 días no se observaron diferencias significativas en el número de brotes formados entre los tratamientos (Cuadro 3). A los 60 días, en el medio C2 se obtuvieron alrededor de nueve brotes por explante, mientras que en los otros medios se originaron tres brotes por explante. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). La evaluación a los 90 días presentó la misma tendencia, formándose catorce brotes por explante en el medio C2 y cinco brotes por explante en los medios C0.5 y C1 (Cuadro 2). La proliferación de brotes obtenida en el medio C2 fue superior a la descrita por otros autores y permitió incrementar rápidamente el material biológico. Nuestros resultados concuerdan con los descritos para la propagación *in vitro* de las cactáceas *Pediocactus bradyi*, *P. knowltonii*, *Sclerocactus spinositor* (Clayton *et al.*, 1990), *Mammillaria craigii*, *M. formosa*, *M. obscura* (Meza-Rangel, 1994), *M. haageana* y *M. san-angelensis* (Martínez-

Cuadro 3. Efecto de la cinetina en la formación de callo, hidratación y el número de brotes por explante a los 30, 60 y 90 días⁽¹⁾.

Días	Brotes (número)			Callo (unidades)*			Hidratación (unidades)*		
	C0.5	C1	C2	C0.5	C1	C2	C0.5	C1	C2
30	1.0 a	1.3 a	1.0 a	1.4 a	1.6 ab	2.0 b	1.4 a	1.7 ab	1.9 b
60	3.2 b	2.7 b	8.8 a	1.2 a	1.4 a	1.6 a	1.2 a	1.3 a	1.5 a
90	5.6 b	5.2b	14.5 a	1.4 a	1.3 a	1.5 a	1.2 a	1.3 a	1.4 a

⁽¹⁾ Los valores de callo e hidratación representan la media de cruces más uno (n+1) por unidad experimental. Los tratamientos con la misma letra a lo largo del renglón no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

Vázquez y Rubluo, 1989) en los que se usaron concentraciones de citocininas que variaron entre 1 y 5 mg L⁻¹ para la regeneración de brotes.

Además de evaluar la formación de nuevos brotes es importante analizar la calidad de los mismos. Por ello, se cuantificó la formación de callo y la hidratación del tejido ya que ambos factores causan la deformación del brote (Debergh *et al.*, 1992). A los 30 días la presencia de callo fue mayor en el medio C2, no observándose diferencias estadísticas entre los otros dos medios. A los 60 y 90 días la presencia de callo disminuyó y fue similar ($P > 0.05$) entre los tres tratamientos (Cuadro 3).

Con respecto a la hidratación, a los 30 días los explantes mantenidos en el medio C2 fueron los más hidratados existiendo diferencias significativas con el medio C0.5. A los 60 y 90 días, disminuyó la hidratación en los tres tratamientos, sin diferencias estadísticas entre ellos (Cuadro 3).

Los datos obtenidos indican que conforme aumentó el tiempo de cultivo se incrementó el número de brotes y la calidad de los mismos. Así, aunque los explantes colocados en medio C2 fueron inicialmente los más hidratados y los que formaron mayor cantidad de callo, en resiembra posteriores generaron brotes bien definidos y poco callo (Figura 1). Resultados similares se han obtenido durante la propagación de *F. latispinus* (Santos-Díaz, 1996) y de *Agave cantala* (Binh *et al.*, 1990), y podrían deberse a cambios en el balance hormonal de los brotes.

Compactación y enraizamiento. Para inducir la formación de raíz, los brotes obtenidos del medio C2 se transfirieron a medio ½ MS y ½ MS-2Ca dado que un buen número de cactáceas enraizan fácilmente en medios sin reguladores de crecimiento (Clayton *et al.*, 1990). A los cuatro meses se obtuvieron 52.4 y 21.4 % de brotes con raíz en los medios MS y ½ MS-2Ca, respectivamente. Las plántulas, sin embargo, continuaron generando numerosos brotes. La formación de éstos es de gran utilidad para la propagación de *A. myriostigma*, pero también tiende a deformar el material y a dificultar la obtención de plantas grandes y bien definidas.

Resultados obtenidos con *Mammillaria candida* (Elías-Rocha *et al.*, 1999), *Ferocactus glausceus* (Santos-Díaz, 1998) y *F. latispinus* (Santos-Díaz, 1996) mostraron que los brotes hidratados y menos definidos tienden a formar una mayor cantidad de brotes. Por ello, para promover una mayor compactación de los brotes y en consecuencia reducir la generación de brotes nuevos que deformen el material inicial, se indujo un ligero déficit hídrico mediante la adición al medio de 1 ó 2 % de manitol (M1 y M2) o polietilenglicol (P1 y P2). Estos agentes osmóticos atrapan las moléculas de agua y, por tanto, reducen el potencial de agua del medio. También se ha descrito que el uso de 12 g L⁻¹ de agar favorece la compactación de brotes de algunas cactáceas (Perez-Mophe Bach, 1998); sin embargo, los medios con agar se endurecen mucho, dificultan la resiembra del material vegetal, y con frecuencia se fragmentan al introducir el explante.

Los resultados de los tratamientos con manitol y polietilenglicol se presentan en el Cuadro 4. A las cuatro semanas no se presentaron diferencias significativas entre los medios, pero a las ocho semanas los brotes mantenidos en el medio P1 fueron más compactos que aquéllos mantenidos en medio M1 ($P < 0.05$). En cuanto a la formación de raíz hubo mayor enraizamiento de las plantas en los medios con manitol que en los medios con polietilenglicol. Por otro lado, el número de brotes a las cuatro y ocho semanas se redujo notablemente en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos. Los resultados indicaron que tanto el manitol como el polietilenglicol aumentaron la compactación y redujeron la formación de brotes nuevos, promoviendo así la obtención de plantas bien definidas y de mayor tamaño. En la Figura 2 se muestra el aspecto de brotes de *A. myriostigma* enraizados en medios con manitol.

Ya que los porcentajes de enraizamiento fueron bajos en relación a otras especies, deberán probarse otros tratamientos (ácido indolbutírico, enraizadores comerciales) que favorezcan la formación de raíces vigorosas. Éste es un requisito fundamental para lograr una exitosa transferencia a suelo.



Figura 1. Aspecto de brotes bien definidos de *A. myriostigma* obtenidos en medio C2 después de 90 días.



Figura 2. Brotes de *A. myriostigma*, enraizados en medio $\frac{1}{2}$ MS conteniendo 1 % de manitol.

Cuadro 4. Efecto de los medios de enraizamiento en la compactación, generación de brotes nuevos y formación de raíz⁽¹⁾

Tiempo	Medio	Compactación	Raíz	Núm. brotes por explante
4 semanas	M1	2.7 a	2.7 a	1.6 a
	M2	3.0 a	4.0 b	1.4 a
	P1	3.8 a	1.0 c	1.9 a
	P2	3.4 a	1.6 ac	1.1 a
8 semanas	M1	2.8 a	2.7 a	1.6 a
	M2	3.6 ab	4.3 b	1.5 a
	P1	5.0 bc	1.2 c	2.4 a
	P2	4.3 ac	2.1 ac	1.7 a

⁽¹⁾ Los tratamientos con la misma letra en la columna no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

De los datos presentados puede concluirse que el protocolo desarrollado permitió la regeneración de 14 brotes por explante (28 brotes por semilla germinada), mejorando así los resultados descritos en trabajos previos. Los resultados mostraron que la germinación y el crecimiento de *A. myriostigma* fue mayor en el medio $\frac{1}{2}$ MS y que el mejor medio para inducir mayor número de brotes fue MS con 2 mg L⁻¹ de cinetina. Se recomienda la adición de 1 % de PEG o manitol para incrementar el grado de compactación de los brotes y favorecer su enraizamiento. Con base en lo anterior, se propone usar el cultivo de tejidos vegetales como un método alternativo para el cultivo comercial de *A. myriostigma*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACyT por el financiamiento recibido para la realización de este proyecto (clave 3106-N) y por la beca otorgada a José Manuel Martín del Campo Macías.

BIBLIOGRAFÍA

- Arredondo-Gómez, A. y F. Camacho. 1995. Germinación de *Astrophytum myriostigma* en relación con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubación. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 40:34-38.
- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). Hort. Sci. 22:126-127.
- Binh, L.T., L.T. Muoi, H.T.K. Oanh, T.D. Thang, and D.T. Phong. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23:67-70.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger, and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the cactaceae subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:337-343.
- Debergh, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman, and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:135-140.
- Diario Oficial de la Federación. 1994. Listado de especies raras, amenazadas, en peligro de extinción o sujetas a protección especial y sus endemismos en la República Mexicana. México.

- Elías-Rocha, M.A., M.S. Santos-Díaz, and A. Arredondo-Gómez. 1999. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactacea) by tissue cultures techniques. *Haseltonia*. Yearbook of the Cactus and Succulent Society of America No. 6: 96-101.
- Hernández, H. M. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mex.* 26:33-52.
- Hubstenberger, J.F., P. W. Clayton, and G.C. Phillips. 1989. Micropropagation of cacti. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Heidelberg. pp:1-37.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination. Aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Martínez-Vázquez, O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. *J. Horti Sci.* 64:99-105.
- Méndez-Ontiveros, R. 1998. Propagación *in vitro* de *Turbincarpus laui* (Glass y Foster) y *Pelecypora aselliformis* (Ehrenbeg). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. pp: 20-42.
- Meza-Rangel, E. 1994. Desarrollo de sistemas para la micropropagación de tres especies de cactáceas del género *Mammillaria*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp:18-50.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Pérez-Molphe Bach, E., M.E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L.R. Morones Ruiz, and H. Lizalde-Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cell Develop. Biol.* 34: 131-135.
- Pizzetti, M. 1992. Guía de Cactus. Grijalbo. México. 36 p.
- Rodríguez-Garay, B. and A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent J.* 64:116-119.
- Santos Díaz, M.S. 1996. Propagación de *Ferocactus latispinus* por técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Cuadernos Científicos del Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas 2: 21-27.
- _____. 1998. Micropropagación de *Ferocactus glausceus* una cactácea de interés comercial. XVII Congreso de Fitogenética, Acapulco, Gro. 5 al 9 de Octubre.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach. McGraw-Hill. N.Y.
- Stuppy, W. and W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Horti. Sci.* 59:449-452.