

VI. ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CACTÁCEAS MEXICANAS

Ana Laura López Escamilla¹, Laura Patricia Olguín Santos²,
Judith Márquez Guzmán³, Maritza López Herrera¹

¹Laboratorio de Morfofisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Biológicas,
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo s/n km 4.5,
CP 42184, Pachuca, Hgo., México. lopeza@uaeh.edu.mx

²Unidad de Ambientes Controlados, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma
de México. CP 04510, México, D.F. lpos@correo.unam.mx

³Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Facultad de Ciencias, UNAM. CP 04510, México, D.F.
jmg@hpfciencias.unam.mx

Introducción

EL CULTIVO de tejidos vegetales (CTV) representa una alternativa viable para la propagación y conservación *ex situ* de cactáceas y adquiere un mayor valor si éstas se encuentran en alguna categoría de amenaza. Las técnicas de micropropagación han sido aplicadas a diversos miembros de la familia Cactaceae con avances significativos, muchos de estos trabajos se han realizado en diversos países de Europa, Estados Unidos y Japón entre otros, con especies mexicanas desde hace ya varios años (Vyskot y Jara, 1984; Starling, 1985; Ault y Blackmon, 1987; Kolar *et al.*, 1976; Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979; Simth *et al.*, 1991; Stuppy y Nagl, 1992; Machado *et al.*, 1996; Papafotiou *et al.*, 2001; Giusti *et al.*, 2002) pero afortunadamente estas técnicas también se han desarrollado en nuestro país (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Olguín, 1994; Pérez-Molphe *et al.*, 1998; Villavicencio *et al.*, 1999; Mata-Rosas *et al.*, 2001; Dávila-Figueroa, 2005; Rodríguez, 2006; Soria, 2006; Tapia, 2006; Díaz, 2007; Mendoza, 2007; Ramírez-Malagón, 2007; Zamora, 2007).

El desarrollo de estas técnicas nos permite realizar la propagación masiva y tener material vegetal para llevar a cabo análisis fisiológicos e histológicos que nos proporcionen información y así comprender las características que presentan los cultivos *in vitro* y el desarrollo de los regenerantes.

En el laboratorio de Morfofisiología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en conjunto con el Laboratorio del Desarrollo en Plantas y la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se establecieron las técnicas de propagación *in vitro*

de varias especies de cactáceas procedentes de los estados de Coahuila, Hidalgo y Oaxaca, para posteriormente, con los brotes regenerados de algunas de ellas, realizar estudios fisiológicos e histológicos.

Micropropagación

La micropropagación es quizá la técnica más empleada dentro del cultivo de tejidos vegetales para propagar plantas de interés hortícola, ornamental y forestal, entre otros (Hu y Wang, 1983; George y Sherrigton, 1984; Debergh, 1987; Evans, 1990; George y Debergh, 2008). Este método se basa en la obtención del mayor número de plantas posibles, con características uniformes, libres de enfermedades prácticamente en cualquier época del año y a partir de tan sólo una pequeña porción de tejido (explante inicial) que puede ser desde embriones, semillas, tallos, meristemos apicales, callos, células aisladas o granos de polen (Hu y Wang, 1983; George y Sherrigton, 1984; Collin y Edwards, 1998, Aceves y Hernández, 2000). El proceso de micropropagación consta de cinco etapas (Evans, 1990; Phillips y Hustenberger, 1995; Collin y Edwards, 1998; Razdan, 2003; George y Debergh, 2008), que de manera general consisten en lo siguiente:

Etapas 0. Se realiza la selección del material vegetal, el cual debe proceder de individuos sanos y estar en buenas condiciones.

Etapas I. Se desarrollan las técnicas de desinfección para lograr su establecimiento en condiciones asépticas.

Etapas II. Se promueve la proliferación, en la cual la formación de los regenerantes se puede presentar por tres diferentes vías: a partir de **yemas preexistentes** a las cuales se promovió su proliferación y crecimiento; por **organogénesis**, que consiste en la formación de órganos como raíces, hojas, tallos, llamados estos últimos brotes; y por **embriogénesis somática**, que se forman a partir de células somáticas y no son el resultado de la fusión de gametos, los embriones somáticos son estructuras bipolares, por que tienen un eje apical-radical, están aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno (Jiménez-González, 1998a). La organogénesis y embriogénesis somática se puede dar de forma **directa**, es decir las estructuras se generan directamente sobre el explante inicial o de forma **indirecta** cuando la formación de los órganos es precedida por la desorganización del explante en un tejido denominado callo, este se caracteriza por que presenta una división celular continua y forma un agregado irregular de células, que posteriormente es capaz

de reorganizarse y formar los órganos. Todos los eventos que se suscitan durante esta etapa (callo, formación de los diferentes órganos y/o embriones) se denominan **respuestas morfogénicas**, las cuales se expresan por la presencia de las hormonas endógenas del explante y de fitoreguladores adicionados al medio de cultivo. Las que más se emplean dentro del CTV son las citocininas, solas o en combinación con las auxinas en diferentes proporciones y concentraciones.

Etapa III. Individualización y enraizamiento. Los brotes obtenidos se individualizan y subcultivan a un medio de cultivo fresco para promover su elongación y posteriormente el desarrollo de raíces (enraizamiento), la cual puede llevarse a cabo en ausencia de auxinas (George y Sherrington, 1984) empleando medio Murashige y Skoog MS (1962) completo o al 50% de sus componentes o puede presentarse de manera espontánea sin la adición del fitoregulador; después del enraizamiento las plantas regeneradas *in vitro* están listas y pueden transferirse a sustrato. Esta etapa es importante y es parte del proceso denominado **aclimatización *in vitro***, que consiste en “obligar”, modificando el contenido de sacarosa en el medio o reduciendo las sales, entre otros, a los regenerantes (tallos) para que cambien de una condición heterótrofa a una autótrofa para que sean capaces de ser fotosintéticos y hacer más probable su adaptación y establecimiento a las condiciones *ex vitro*. En el caso de los embriones somáticos, éstos pueden germinar y continuar su crecimiento; por su naturaleza bipolar no se requiere promover su enraizamiento, sino su maduración para que puedan establecerse como plántulas.

Etapa IV. Es la transferencia de los tallos enraizados a un sustrato previamente esterilizado para que continúen con el proceso de aclimatización o lo inicien, pero ya en condiciones *ex vitro* en un invernadero. Esta etapa es la más crítica, pues define el éxito o el fracaso de todo el método en cuanto a productividad.

Germinación *in vitro*

Las semillas utilizadas fueron obtenidas por colecta directa o por donaciones realizadas por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM y el personal de la reserva de la biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo (**Etapa 0**).

Para el establecimiento en condiciones asépticas de las semillas (**Etapa I**) y promover su germinación *in vitro*, éstas fueron sometidas a un proceso de escarificación y/o desinfección, sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962), y mantenidas en condiciones de incubación de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 16/8, para

promover su germinación. Este proceso involucra la reactivación del metabolismo que comprende el crecimiento del embrión y termina cuando emerge la radícula (Bewley y Black,1994). Se consideró como semilla germinada aquella cuya radícula había emergido. En la Tabla I puede observarse que en la mayoría de las especies trabajadas los porcentajes de germinación están por arriba del 70%, lo que nos indica inicialmente que la viabilidad de las semillas es favorable, aunque en algunos casos haya trascurrido más de un año de haber sido colectadas y que las técnicas de desinfección desarrolladas así como el medio de cultivo empleado fueron los adecuados. Los porcentajes de germinación en *Astrophytum capricorne* (100%), *Astrophytum myriostigma* (91%), *Echinocactus grusonii* (96%), *Epithelantha micromeris* (80%), *Thelocactus bicolor* (96%), *Thelocactus rinconensis* (94%) son aceptables en proporción al número de semillas disponibles; en cambio, hay casos como *Echinocereus reichenbachii* y *Mammillaria pottsii* que, a pesar de contar con más de 300 semillas para establecerlas y germinarlas *in vitro*, los porcentajes de germinación fueron menores: 55 y 76% respectivamente, o como *Mammillaria coahuilensis* cuyo porcentaje de germinación (32%) fue el más bajo. Esto resultados probablemente están muy relacionados con la fecha de colecta de las semillas y las características propias de la especie, ya en *M. coahuilensis* los ensayos se realizaron en el 2004 con semillas colectadas en 1999, lo que probablemente se haya reflejado en el bajo porcentaje de viabilidad.

Aunado a esto es importante señalar que por diversos factores, durante el proceso de desarrollo y crecimiento de las plántulas *in vitro*, éstas se pueden oxidar, contaminar, detener su desarrollo o hiperhidratar, lo que provoca la ruptura y desorganización de sus tejidos, mermando el número de plántulas que pueden ser utilizadas como fuente de explante y reduciendo la posibilidad de explorar más combinaciones y concentraciones de fitohormonas (Tabla I).

Etapas de proliferación

Aquellas plántulas que alcanzaron una talla de 0.5 a 1 cm de altura, lo cual puede demorar de tres a cuatro meses, fueron seccionadas dependiendo del tamaño y características morfológicas de la plántula, en diferentes tipos de explantes: apicales, laterales y/o longitudinales y se sembraron en medio de cultivo (MS), adicionado con diferentes concentraciones y combinaciones de citocininas/auxinas (**Etapas III**), fue posible obtener la regeneración de brotes por organogénesis directa principalmente por la activación de meristemos preexistentes, que en cactáceas se denominan aréolas.

Tabla IPorcentajes de geminación *in vitro* de diferentes especies de cactáceas

*Tesis de licenciatura en proceso

ESPECIE	NO. DE SEMILLAS	NO. DE SEMILLAS GERMINADAS	% DE SEMILLAS GERMINADAS	REFERENCIA
<i>Astrophytum ornatum</i>	45	37	82	Mendoza, 2007
<i>Cephalocereus senilis</i>	50	49	98	Tapia, 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	110	105	96	Rodríguez, 2006
<i>Echinocereus reichenbachii</i>	330	181	55	Gutiérrez *
<i>Epithelantha micromeris</i>	120	97	80	Hernández*
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	124	40	32	Flores, 2008
<i>Mammillaria schiedeana</i>	95	70	73	Soria, 2006
<i>Thelocactus bicolor</i>	90	84	96	Zamora, 2008
<i>Thelocactus rinconensis</i>	68	64	94	Díaz, 2008

En algunos casos podría pensarse que estas técnicas no son redituables, ya que se obtuvo un menor número de brotes que semillas inicialmente germinadas; no hay que olvidar que finalmente el número de semillas que germinan no llegan a desarrollarse como plántulas y ser fuente de explantes. En la Tabla 2 se muestra el número de brotes que se obtuvo en el mejor tipo de explante y tratamiento con fitoreguladores en cada especie; en *Astrophytum capricorne* (64), *A. myriostigma* (28), *Echinocereus reichenbachii* (24), *Mammillaria pottsii* (92), *Thelocactus bicolor* (57) el número de brotes obtenidos es menor al número de semillas que lograron germinar, pero hay casos en que la cantidad de brotes es mayor del doble o triple con relación al número inicial de semillas germinadas, como en *Astrophytum ornatum* (178), *Cephalocereus senilis* (357), *Echinocactus grusonii* (271), *Mammillaria coahuilensis* (113), *M. schiedeana* (224), lo que refleja la eficiencia del sistema. En ambas situaciones la ventaja de tener los cultivos establecidos en condiciones asépticas es que nos permite utilizar nuevamente los brotes como fuente de explantes y exponerlos a una combinación de fitoreguladores más favorable e incrementar el número de brotes, generando a la vez un banco de germoplasma *in vitro*.

Solamente en *Leuchtenbergia principis* se presentó de forma espontánea la formación de embriones somáticos, a partir de un explante lateral sembrado en medio MS+ 1 mgL⁻¹ de Benciladenina (BA), el callo y los embriones; después han sido subcultivados en MS+ CA (1g L⁻¹) y MS 50%+ CA (1g L⁻¹) para su mantenimiento.

En la mayoría de los casos el proceso de embriogénesis en cactáceas es un evento esporádico y existen pocos reportes sobre ella (*Tabla II*): *Ariocarpus restusus* (Stuppy y Nagl, 1992), *Turbincarpus pseudomacrochele*, *Mammillaria san-angelensis* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1998); *Ariocarpus kotschobeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); en *Opuntia ficus-indica* se han caracterizado las diferentes etapas de la embriogénesis somática (Linhares *et al.*, 2006).

Tabla II
Número de brotes obtenidos a partir de diferentes tipos de explantes y en la mejor combinación de fitoreguladores (tratamiento) de cada especie

ESPECIE	TIPO DE EXPLANTE	NO. DE BROTES POR TRATAMIENTO	REFERENCIA
<i>Astrophytum capricorne</i>	Longitudinal	64	
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Apical	28	
<i>Astrophytum ornatum</i>	Longitudinal	178	Mendoza, 2007
<i>Cephalocereus senilis</i>	Longitudinal	357	Tapia, 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	Longitudinal	271	Rodríguez, 2006
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Longitudinal	92	Saby <i>et al.</i> , 2004
<i>Echinocereus reichenbachii</i>	Apical	8	Gutiérrez*
	Longitudinal	21	
	Lateral	24	
<i>Epithelantha micromeris</i>	Apical	55	Hernández*
	Lateral	92	
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	Apical	49	Flores, 2007
	Lateral	113	
<i>Mammillaria crucigera</i>	Longitudinal	15	Olguín <i>et al.</i> , 2004
<i>Mammillaria pottsii</i>	Longitudinal	256	Miguel*
<i>Mammillaria schiedeana</i>	Longitudinal	224	Soria, 2006
<i>Thelocactus bicolor</i>	Longitudinal	57	Zamora, 2007
<i>Thelocactus rinconensis</i>	Apical	80	Díaz, 2007
	Lateral	64	

*Tesis de licenciatura en proceso

Establecimiento *ex vitro*

Como ya se ha mencionado el éxito de la micropropagación es el establecimiento en condiciones *ex vitro* del material vegetal regenerado. Continuando con las etapas de la micropropagación, los brotes posteriormente de su elongación se individualizaron y subcultivaron para promover su enrizamiento, la cual se dio *de novo* en la mayoría de ellas, a excepción de *Echinocereus reinchenbachii* y *M. pottsii*, a las que se ha tenido que agregar auxinas para promover la formación de raíces.

El desarrollo de un sistema radicular es importante ya que permite llevar a cabo el establecimiento de los brotes enraizados y realizar su aclimatización *in vitro* y/o *ex vitro*. En esta fase se consideró el número de brotes que generaron raíces (brotes

enraizados) y el porcentaje de estos que lograron sobrevivir *ex vitro*; el criterio de sobrevivencia fue determinado cuando se observó un incremento en la talla del brote, la formación de nuevos tubérculos, de raíces, el crecimiento de nuevas espinas. De las especies propagadas se logró el establecimiento en condiciones *ex vitro* con porcentajes favorables de sobrevivencia, siendo el más alto en *Echinocactus grusonii* en donde se obtuvo el 100%, seguido de *Thelocactus rinconensis* (92%), *A. ornatum* (88%), *Mammillaria schiedeana* (83%) y *Thelocactus bicolor* (81%); en contraste, *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis* y *Mammillaria coahuilensis*, mostraron bajos porcentajes de enraizamiento (20, 39, 52% respectivamente) (Tabla 3).

Esto nos indica que es necesario establecer o buscar estrategias para su aclimatización desde su condición *in vitro*, y a la vez proporcionar más cuidados al momento de su transferencia *ex vitro*.

Diversos trabajos reportan porcentajes de sobrevivencia en otras especies de la familia Cactaceae como *Coryphantha macromeris* del 55% (Smith *et al.*, 1991), *Schlumbergera truncata*, *Turbincarpus laui*, ambos con 70% (Pérez *et al.*, 1998; Santos-Díaz *et al.*, 2003); *Ephithelatha micromeris*, 80% (Velásquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001); *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis*, 88% (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002); *Thurbincarpus laui*, con 94-100% (Mata *et al.*, 2001). En estos trabajos generalmente no se indica el número de brotes regenerados que se establecieron *ex vitro* y la cantidad de ellos que sobreviven realmente después de un tiempo; en nuestros resultados es posible ver que la cantidad de brotes enraizados es favorable, pero es evidente que existen problemas al momento de su transferencia a condiciones *ex vitro*, ya que en realidad no logran establecerse todos, a excepción de *Echinocactus grusonii* (Tabla III).

El número de plantas puede incrementarse notablemente si se proporcionan más cuidados en esta etapa, ya que generalmente en esta fase las plantas son susceptibles a la deshidratación, por que sus cutículas son delgadas y los estomas se encuentran abiertos. Para esta parte se encaminarán esfuerzos dirigidos a incrementar el número de individuos.

Tabla III

Número de brotes enraizados *in vitro* y porcentajes de sobrevivencia *ex vitro* en condiciones de invernadero de diferentes especies de cactáceas micropropagadas

ESPECIE	NÚMERO DE BROTOS ENRAIZADOS <i>IN VITRO</i>	NÚMERO DE BROTOS QUE SOBREVIVIERON	% DE SOBREVIVENCIA <i>EX VITRO</i>	REFERENCIA
<i>Astrophytum myriostigma</i>	30	6	20	
<i>Astrophytum ornatum</i>	218	191	88	Mendoza, 2007
<i>Cephalocereus senilis</i>	470	185	39	Tapia, 2006
<i>Echinocactus grusonii</i>	553	553	100	Rodríguez, 2006
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	100	75	75	Saby*
<i>Echinocereus reichenbachii</i>	160	104	65	Guitierrez*
<i>Mammillaria coahuilensis</i>	254	13439	52	Flores, 2007
<i>Mammillaria crucigera</i>				Olgún-Santos <i>et al.</i> , 2004
<i>Mammillaria schiedeana</i>	335	279	83	Soria, 2006
<i>Thelocactus bicolor</i>	113	91	81	Zamora, 2007
<i>Thelocactus rinconensis</i>	318	292	92	Díaz, 2007

*Tesis de licenciatura en proceso

Agradecimientos

A los brigadistas y al personal de la reserva de la biosfera Barranca de Metztlán por las facilidades brindadas y la donación de semillas. Al Jardín Botánico de la UNAM por la donación de semillas. Al proyecto FOMIX-CONACYT-Hidalgo (FOMIX-HGO-2005-C01-53) “El cultivo de tejidos vegetales como alternativa de conservación y producción de cactáceas en peligro de extinción del estado de Hidalgo”; y a CONAFOR-CONACYT (CONAFOR-20003-C03-9951) “Propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas y/o en peligro de extinción del estado de Coahuila”. A los biólogos Gutiérrez Zamora María de los Ángeles, Miguel Bautista Irma, Mendoza Madrigal Gilberto, Rodríguez González Marisol, Tapia Cruz Dulce María, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Díaz Rodríguez Berenice, Flores Rentería Dulce Yaahid, Hernández Contreras Rebeca; Saby Vercamer Louis, Zamora Maldonado Hilda, de la Universidad Nacional Autónoma de México, y Soria Campos Daniela, de la Universidad Veracruzana, becarios de los proyectos mencionados.

Literatura citada

Aceves, J y J Hernández. 2000. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. *Revista Ciencia Administrativa* del Colegio Profesional de Biólogos del Estado de Veracruz. p. 64-69.

- Ault, JR y WJ Blackmon. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species (Abst). *Hortic. Sci.* 20:541.
- Bewley, DJ y M Black. 1994. Seeds physiology of development and germination. Plenum Press. Nueva York. 445p.
- Collin, HA y GS Edwards. 1998. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157.
- Dávila-Figueroa, CA; ML De la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe-Balch. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41(4):540-545.
- Debergh, PC. 1987. Improving micropropagation. Newsletter IAPTC. Núm. 51:2-10.
- Díaz, B. 2007. Propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton & Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 52 p.
- Elías-Rocha, MA; MS. Santos-Díaz; A. Arredondo-Gómez. 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by Tissue Culture Techniques. *Haseltonia*. 6:96-101.
- Evans, NE. 1990. Micropropagation, axillary bud multiplication. En: Pollard, JW y JM Walker (eds.). *Methods in Molecular Biology*, v. 6, Plant Cell and Tissue Culture. Human press. New Jersey. 93-103.
- Flores-León, R y G. Ortiz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia* 7:92-96.
- George, EF y PC Debergh. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: George, E.F., M. Hall y G.De Klerk. *Plant propagation by tissue culture*. 3er edition. Vol 1. The Background. Springer. 29-64.
- George, EF y PD Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Limited. Inglaterra. 690.
- Giusti, P; D Vitti; F Fiocchetti; G Colla; F Saccardo; M Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Horti. Sci.* 95(4):319-332.
- Hu, CY y PJ Wang. 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans DF, WR Sharp, PV Ammirato y Y Yamada (eds.). *Basic Techniques of Plant Cell Culture*. Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. 177-227.
- Jiménez-González, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez-Ponce J. (ed.) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24 p.
- Johnson, L. y R. Emينو. 1981. Axillary Meristem Development in *Mammillaria elongata*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(1):110-113.
- Linares, FAFG; FH Fernández; PS Barbeta; O. Facó; FPC de Assis. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. (Cactaceae). *Scient. Hort.* 108: 15-21.

- Machado, MFPS y Prioli, AJ. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cell Development Biology*. 32:199-203.
- Martínez-Vázquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hortic. Sci.* 64(1):99-105.
- Mata, M; M Monroy; K Moebius; V Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:400-404.
- Mauseth, JD. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. Suc. J. (US)*. 51:186-187.
- Mendoza, MG. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 87 p.
- Moebius-Goldammer, G; M Mata-Rosas; VM Chávez-Ávila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 39:388-393.
- Murashige, T y F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473- 497.
- Olguín, SLP. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 85 p.
- Olguín-Santos Laura Patricia, López-Escamilla Ana Laura, Márquez Guzmán Judith. 2004. Propagación *in vitro* de *Mammillaria crucigera* Cactaceae. En: Sosa, V (ed.). Resúmenes XVI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxaca, Oax. México.
- Papafotiou, M; G Balotis; P. Louka; J Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:163-167.
- Pérez-Molphe-Balch, E y CA Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E; R. Pérez; E. Villalobos; E. Meza; L. Morones; H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:131-135.
- Phillips, GC y JF Hubstenberger. 1995. Micropropagation by proliferation of Axillary Buds (p. 45-48, 53). En: Gamborg OL y GC Phillips (eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer, Berlin.
- Razdan, MK. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, 60-70.

- Rodríguez, GM. 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Rodríguez-Garay, B y A Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeher). *Cactus and Succulent Journal* 64:116-119.
- Saby, VL; AL López-Escamilla; GJ Márquez. 2004. Efecto de las citocininas-auxinas en la formación de brotes adventicios de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). En: Sosa, V (ed.). Resúmenes XVI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxaca, Oax. México.
- Santacruz- Ruvalcaba, F; A Gutiérrez-Mora; B Rodríguez-Garay. 1998. Somatic Embryogenesis in some Cactus and Agave Species. *J. PACD*. 3:15-26.
- Santos-Díaz, MS; R Méndez-Ontiveros; A Arredondo-Gómez; ML Santos-Díaz. 2003. *In vitro* Organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*.39:480-484.
- Smith, RH; PJ Burdick; J Anthony; AA Reilley. 1991. *In Vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience*. 26(3):315.
- Soria, CD. 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subsp. *Schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis de licenciatura en Biología. U.V., Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zona Orizaba- Córdoba. Córdoba, Veracruz. 74.
- Starling, R y H Dodds. 1983. Tissue culture propagation of cacti and others suculents. *Bradleya* 1:84-90.
- Stuppy, W y W Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88.
- Tapia, CDM. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haworth.) Pfeiffer (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Velázquez, ELE y QR Soltero. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cact. Suc. Mex.* Tomo XLVI, año 46:56-62.
- Velázquez-Enciso, LE y R Soltero-Quintana. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 46(3):56-62.
- Villavicencio, E; MA Villegas; OG Arellano; HJ Vargas. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum miryostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. Tomo XLIV:49-57.