



Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias



AGRADECIMIENTOS

Se agradece al SNICS-SINAREFI, por las aportaciones económicas brindadas para la realización del proyecto: Micropropagación de cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción del desierto Chihuahuense.

La presente publicación se terminó de imprimir en el mes de Mayo del 2009 en los talleres de:

IMPRESOS GARCER
Arteaga No. 820
Zona Centro
Saltillo, 25000, Coah.
Tel. /fax (844) 4102380
Tiraje 500 ejemplares



Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS
CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL NORESTE
CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO**

**MICROPROPAGACION Y PRODUCCION DE
PLANTAS DEL BONETE O BIRRETE DE
OBISPO, CACTACEA ORNAMENTAL
AMENAZADA DE EXTINCION DEL
DESIERTO CHIHUAHUENSE**



**SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

ING. ALBERTO CÁRDENAS JIMÉNEZ
Secretario

ING. FRANCISCO LOPEZ TOSTADO
Subsecretario de Agricultura

ING. ANTONIO RUIZ GARCIA
Subsecretario de Desarrollo Rural

LIC. JEFFREY MAX JONES JONES
Subsecretario de Fomento a los Agronegocios

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRICOLAS Y PECUARIAS**

Dr. PEDRO BRAJCICH GALLEGOS
Director General

Dr. ENRIQUE ASTENGO LOPEZ
Coordinador de Planeación y Desarrollo

Dr. SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

LIC. MARCIAL ALFREDO GARCIA MORTEO
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL DEL NORESTE

Dr. SEBASTIAN ACOSTA NUÑEZ
Director Regional

Dr. JORGE ELIZONDO BARRON
Director de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. NICOLAS MALDONADO MORENO
Director de Planeación y Desarrollo

M. A. JOSE LUIS CORNEJO ENCISO
Director de Administración

CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO

M. C. GUSTAVO JAVIER LARA GUAJARDO
Director de Coordinación y Vinculación en Coahuila

GOBIERNO DEL ESTADO DE COAHUILA

PROFR. HUMBERTO MOREIRA VALDES
Gobernador Constitucional del Estado

LIC. ROMAN ALBERTO CEPEDA GONZALEZ
Secretario de Fomento Agropecuario

LIC. ELIAS JUAN MARCOS ISSA
Subsecretario de Agricultura y Comercialización

ING. JOSE CARLOS DESTEVANE MEJIA
Secretario de Agricultura

M. V. Z. ENRIQUE GARCIA PEREZ
Director de Ganadería

ING. FRANCISCO MARTINEZ AVALOS
Secretario de Medio Ambiente

DELEGACION ESTATAL DE SAGARPA

ING. EDUARDO VILLARREAL DAVILA
Delegado en Coahuila

ING. JORGE ALBERTO FLORES BERRUETO
Subdelegado Agropecuario

LIC. REYNOLD MALTOS ROMO
Subdelegado de Planeación

LIC. REYNALDO PEREZ-NEGRON
Subdelegado de Administración

COMITÉ DEL SINAFERI

ING. EDUARDO BENÍTEZ PAULÍN
*Director de General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico
SAGARPA*

ING. ENRIQUETA MOLINA MACIAS
Director SNICS

ING. VIRGILIO MORENO FIGUEROA
*Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación
y la Agricultura (SINAREFI)*

DRA. MARIA TERESA COLINAS LEÓN
Red Ornamentales

En el proceso editorial de esta publicación colaboraron:

Comité Unidad de Planeación y Evaluación del Campo Experimental Saltillo:

M. C. Gustavo J. Lara Guajardo
M. C. Francisco J. Contreras de la Reé
M. C. Oscar U. Martínez Burciaga
M. C. Carlos Ríos Quiroz
M. C. Luís Mario Torres Espinosa

Supervisión Técnica:

Dr. Jorge Elizondo Barrón
Biol. Alberto Arredondo Gómez
Dr. Isidro Humberto Almeida León

Captura Computacional:

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

Fotografía:

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

**MAYOR INFORMACION
INIFAP**

Campo Experimental Saltillo
Blvd. Vito Alessio Robles No. 2565
Col. Nazario S. Ortiz Garza
Saltillo, 25100, Coah.
Tel. (01 844) 4 16 20 25
Fax (01 844) 4 39 19 01
E-mail: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

Dirección de Coordinación y Vinculación del
INIFAP-Coahuila
Blvd. Vito Alessio Robles No. 2565
Col. Nazario S. Ortiz Garza
Saltillo, 25100, Coah.
Tel /Fax: (01 844) 4 39 24 36
E-mail: lara.gustavo@inifap.gob.mx



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS
CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL NORESTE
CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO**

**MICROPROPAGACION Y
PRODUCCION DE PLANTAS DEL
BONETE O BIRRETE DE OBISPO,
CACTACEA ORNAMENTAL
AMENAZADA DE EXTINCION DEL
DESIERTO CHIHUAHUENSE**

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

Investigador del Nodo Regional de la Red de
Innovación Manejo Forestal Sustentable del Campo
Experimental Saltillo

M. C. Antonio Cano Pineda

Investigador Coordinador Regional del Nodo de la Red
Innovación Manejo Forestal Sustentable del Campo
Experimental Saltillo

Ing. Arturo Juárez Santana

Técnico del Laboratorio de Cultivos Vegetales
del Campo Experimental Saltillo

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y
Pecuarias
Centro de Investigación Regional del Noreste
Campo Experimental Saltillo
México
Mayo 2009

MICROPROPAGACION Y PRODUCCION DE PLANTAS DEL BONETE O BIRRETE DE OBISPO, CACTACEA ORNAMENTAL AMENAZADA DE EXTINCION DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Progreso No. 5
Barrio de Santa Catarina
Del. Coyoacán
04010 México, D. F.
Tel. (55) 38718700

ISBN: 978-607-425-130-2

Primera edición 2009

No. de Registro INIFAP /CIRNE /F-79

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros medios, sin el permiso previo y por escrito de la Institución

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CARACTERÍSTICAS DE LAS CACTACEAS	3
CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>Astrophytum myriostigma</i> Lemaire	4
Forma de la planta	4
Distribución	5
Hábitat	6
Sinónimos	6
ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS.	6
APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS	7
Micropropagación	8
Propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos	10
Ventajas y desventajas de la propagación	10
MÉTODOS USADOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES.	12
ESQUEMA DE MICROPROPAGACION PARA EL BIRRETE O BONETE DE OBISPO	13
Medio Nutritivo Base	15
Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo	17
Vida del medio	19
PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN	19
ETAPA 1. ESTABLECIMIENTO DEL INÓCULO EN UN CULTIVO ASÉPTICO	19
Semillas como fuente de inóculo	21
Protocolo de desinfección	22
Germinación <i>in vitro</i>	23
Velocidad de emergencia	24
Porcentaje de germinación	25
Altura y aspecto de las vitroplantas	26
ETAPA 2. MULTIPLICACIÓN O INDUCCIÓN DE BROTES.	27
ETAPA 3. ENRAIZAMIENTO	30
Número de raíces	31
Longitud de raíces	33
Altura de la planta	33
ETAPA 4. ACLIMATACION	34
Porcentaje de supervivencia	35
Incrementos en altura	36
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Planta de "birrete o bonete de obispo" (<i>Astrophytum myriostigma</i> Lem.)	2
2	Esquema para la producción de vitroplantas del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.)	14
3	Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).	18
4	a.- Contaminación de semillas del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.). b.- Establecimiento de la vitroplanta en un cultivo aséptico en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).	20
5	Aspecto del hipocotilo y epicotilo de las semillas del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.), a los 30 días de germinadas <i>in vitro</i> en el LACUTEV-CESAL.	24
6	Velocidad de emergencia de las plántulas del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.), después de 42 días de establecidas <i>in vitro</i> en el LACUTEV-CESAL-INIFAP.	25
7	Establecimiento de explantes en la etapa de multiplicación para la inducción de brotes del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.), en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.	28
8	Número y longitud de raíces de las vitroplantas del bonete o birrete de obispo (<i>A. myriostigma</i> Lem.), generados en el medio de cultivo MIR en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Clasificación taxonómica de <i>A. myriostigma</i> Lem.	4
2	Consideraciones del sistema de micropropagación.	11
3	Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas <i>in vitro</i> <i>A. myriostigma</i> Lem.	16
4	Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de <i>A. myriostigma</i> Lem. utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP	22
5	Porcentaje de germinación de <i>A. myriostigma</i> Lem. en diferentes medios de cultivo <i>in vitro</i> evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.	26
6	Respuesta morfogénica de diferentes tipos de explante de <i>A. myriostigma</i> Lem. utilizados en la inducción de brotes (MBM) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP	29
7	Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>A. myriostigma</i> Lem. obtenido en medio MIR con diferentes concentraciones de auxinas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.	32
8	Porcentaje de supervivencia e incrementos en la altura de las plántulas de <i>A. myriostigma</i> Lem. en el invernadero del CESAL-CIRNE-INIFAP.	36

MICROPROPAGACION Y PRODUCCION DE PLANTAS DEL BONETE O BIRRETE DE OBISPO, CACTACEA ORNAMENTAL AMENAZADA DE EXTINCION DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE

Edith Villavicencio Gutiérrez¹,
Antonio Cano Pineda²,
Arturo Juárez Santana³

INTRODUCCION

La especie *Astrophytum myriostigma* Lem., llamada comúnmente “birrete o bonete de obispo”, se distribuye en el Desierto Chihuahuense, siendo una planta de lento crecimiento y escasa en su hábitat natural y catalogada en la NOM-059-2001 (SEMARNAT-2001), como una planta de lento crecimiento, escasa en su hábitat natural que está amenazada de extinción (Figura 1). Por su morfología es apreciada por coleccionistas expertos y/o aficionados nacionales y extranjeros, quienes la utilizan como planta de ornato.

Es una especie que tiene gran demanda en países europeos y asiáticos donde existe una gran afición por las cactáceas, por consecuencia se requiere de su conservación dado su gran potencial de mercado.

La micropropagación es parte de la Biotecnología que a nivel mundial se ha utilizado ampliamente en especies de interés económico. Es una técnica que utiliza el cultivo de tejidos vegetales para multiplicar rápida y masivamente una especie de interés, basándose en el concepto de totipotencia vegetal, en el que se promueve el desarrollo de un organismo completo, considerando la diferenciación celular y potencial genético del genotipo.

¹M. C. Investigador del Nodo Regional de la Red de Innovación Manejo Forestal Sustentable del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

²M. C. Investigador Coordinador Regional del Nodo de la Red de Innovación Manejo Forestal Sustentable del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

³Ing. Agr. Técnico del Laboratorio de Cultivos Vegetales del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

Mediante esta técnica se pueden obtener plantas con diferentes propósitos en cantidades suficientes, siendo una nueva opción para multiplicar genotipos que cuentan con pocos individuos o tienen dificultades para propagarse por métodos convencionales como es el caso del birrete de obispo. Las plantas que se desarrollan aplicando esta técnica se pueden formar a partir de pequeños segmentos (yemas, tallos, hojas) que crecen dentro de un tubo o frasco en un medio aséptico (libre de microorganismos).



Figura 1. Planta de “birrete o bonete de obispo” (*Astrophytum myriostigma* Lem.).

La propagación de plantas por medio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha tenido en los últimos años una gran difusión, principalmente en laboratorios comerciales productores de plantas de ornato y en laboratorios de investigación y enseñanza.

Se considera que el uso de esta técnica ofrece una alternativa para la conservación de los recursos genéticos y rescate de especies amenazadas o en peligro de extinción.

En esta publicación se describe un sistema de micropropagación desarrollado para *A. myriostigma* Lem., cactácea en estatus de riesgo que fue generado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP de acuerdo con las etapas señaladas por Murashige (1974) y posteriormente revisadas por Debergh y Maene (1981) y abarca, desde el establecimiento de inóculos en laboratorio para su micropropagación hasta la obtención de plantas en invernadero.

CARACTERISTICAS DE LAS CACTACEAS

La palabra cactus proviene del griego kaktos que se cree se utilizaba para nombrar a una planta espinosa del sur de Europa y norte de África parecida al cardo (Nobel, 1998). Los cactus son plantas de origen americano que evolucionaron de plantas herbáceas, trepadoras, tropicales cercanas a las Pereskia. Las plantas de la familia *Cactaceae* son dicotiledóneas adaptadas para sobrevivir en climas áridos, debido a que tienen una cutícula rica en ceras que les sirve para prevenir la pérdida de agua y sus hojas han sido reducidas a espinas (Newland *et al.*, 1980; Montañaño *et al.*, 1993; Hernández y Godínez, 1994). Estas especies presentan un tallo carnoso que puede crecer en forma de órgano, globular, cilíndrico, candelabro y arbustivo, el cual funciona como elaborador de carbohidratos primarios siguiendo la ruta fotosintética del metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC).

En él se distribuyen meristemas laterales frecuentemente latentes compuestos por dos yemas, una que produce espinas y otra que produce brotes axilares o yemas florales (Seeni y Gnanam, 1980; Hubstenberger *et al.*, 1992; Montañaño *et al.*, 1993).

Estas yemas están contenidas en las areolas y/o mamilas, una estructura única en las cactáceas que se distribuye en algunas especies a lo largo de las costillas o pueden proyectarse en tubérculos como en *Leuchtenbergia sp* (Starling, 1985).

CARACTERISTICAS DE LA ESPECIE *Astrophytum myriostigma* Lemaire

El nombre de este género proviene del griego "ástron" que significa estrella y "phyton" planta (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *A. myriostigma* Lem.

REINO:	Vegetal
SUBDIVISION:	Angiospermae
CLASE:	Dicotiledóneas
ORDEN:	Cactales
FAMILIA:	Cactaceae (Clasificación de Jussieu A. L., 1789)
SUBFAMILIA:	Cactoideae
TRIBU:	Cactaeae
GENERO:	<i>Astrophytum</i>
ESPECIE:	<i>myriostigma</i>

Forma de la planta.-Solitarias o cespitosas, globulares a cilíndricas usualmente 5 a 8 costillas, raramente 10 en forma de estrella prominentes y agudas. Al borde de las costillas presentan areolas lanosas pequeñas y muy juntas. Son completamente inermes y están cubiertas generalmente de pelos parduscos y carecen de espinas.

Altura y diámetro.- 10 a 60 cm de altura x 10 a 20 cm de diámetro.

Tallo.- Simple con epidermis gruesa y dura debido a dos estratos de células esclerenquimatosas.

Epidermis.- Verde presentando tricomas que lo cubren como una lana dando un aspecto grisáceo a blanco. **Flores.**- Surgen en el ápice de la planta como grandes margaritas de muchos pétalos y su tamaño va de 3 a 8 cm de diámetro. Son de color amarillo, ocasionalmente con el centro rojo, éstas brotan de areolas jóvenes, son campanuladas diurnas y presentan un brillo sedoso. Aunque florecen durante todo el verano sus flores duran pocos días. **Estambres.**- Inferiores se encuentran cerca de la base del estilo, siendo el anillo nectario muy corto, otros se insertan uniformemente en el resto del tubo floral. **Ovario.**- Grande y los óvulos están insertos en la placenta. **Fruto.**- Globular color castaño o rojizo, dehiscente, escamoso y en su parte axilar presenta una lana más o menos ocre; algo carnoso y conserva adheridos restos del perianto. **Semillas.**- Brillosas naviculares y en la región aquillada se encuentra el embrión. Este es ovoide o recto con cotiledones pequeños. El micrópilo es pequeño y se localiza cercano a la región aquillada. La testa es lisa y quebradiza. En la diseminación de las semillas intervienen activamente las hormigas. (Britton y Rose, 1963; Sánchez, 1987; Bravo-Hollis y Sánchez 1991; Moeller-Villar, 1993).

Distribución.- Existen diversas variedades, entre ellas, quadricostatum, con sólo 4 costillas y nudum, de tallo color verde, sin restos de escamas. La especie *A. myriostigma* se distribuye en las regiones montañosas del centro y norte de México abarcando los estados de San Luis Potosí (mpio. de Matehuala); Coahuila (mpio. de Saltillo y Ramos Arizpe), Nuevo León (mpio. Dr. Arroyo) y Tamaulipas (mpio. Jaumave y Tula) (Anderson, 2001).

Hábitat.- Suelos pedregosos calcáreos de matorral desértico rosetófilo localizadas entre las grietas de las piedras, asociada con *Opuntia leptocaulis*, *Agave lechuguilla*, *Euphorbia antisyphilitica*.

Sinónimos

Echinocactus myriostigma Salm-Dyck

Cereus callicoche Galeotii

Astrophytum prismaticum Lemaire

Echinocactus myriostigma columnaris Shumann Gesamtb

Echinocactus myriostigma nudus R. Meyer.

ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS

Los primeros estudios de cultivo *in vitro* en cactáceas fueron realizados por Minocha y Mehra (1974), quienes intentaron generar brotes adventicios de *Mammillaria woodsii* mediante la formación de callo a partir de yemas, plántulas y partes florales, sin obtener resultados positivos. Posteriormente, Mauseth y Halperin (1975) y Mauseth (1976), abordaron el control hormonal durante la diferenciación, demostrando que los brotes adventicios de *Opuntia polyacantha* podían forzarse y crecer hasta generar una plántula. Dos años después estos autores propusieron la generación de brotes adventicios como la vía de regeneración en *Echinocereus*, método que posteriormente fue probado por Johnson y Emino (1979 b) en *M. elongata* encontrando una eficiencia baja en el número de brotes.

Subhash y Mehra (1974) estudiaron el aspecto nutricional y morfogénico del callo, mientras que Mauseth y Halperin (1975) y Mauseth (1979 b) el control hormonal durante la organogénesis. Ellos encontraron que la respuesta morfogénica está fuertemente influenciada por las fitohormonas y que ésta depende del tipo y concentración que se utilice.

Mauseth (1976, 1978 y 1979 a) fue el primero en micropropagar cactáceas mediante el cultivo de yemas axilares en letargo, mencionando que el meristemo apical de la mayoría de las espermatofitas está compuesto por túnica y corpus; este último organizado en tres zonas, a) célula madre central, b) zona periférica y c) meristemo. Este autor agrega que la mayoría de los meristemos axilares son quiescentes y que algunos pueden tener un primordio axial localizado entre el meristemo y la espina. Añade que la actividad mitótica de cada una de las zonas difiere significativamente, con la influencia de las fitohormonas, encontrando que con ácido giberélico el meristemo es también mitóticamente activo pero no incrementa su tamaño; en cambio, con BA (bencilaminopurina) se desarrollan primordios fotosintéticamente normales a partir del meristemo axilar, el cual incrementa su tamaño y llega a ser mitóticamente activo desarrollándose como brote.

Entre los trabajos sobre los factores que inciden en la activación de areolas se tiene el de Vyskot y Jara (1984), Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), Clayton *et al.*, (1990) y Dabekaussen *et al.* (1991). Todos ellos han encontrado diferencias en la eficiencia del método de propagación, la cual se expresa en el número de brotes/explante.

APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS

El cultivo de tejidos no sólo se ha utilizado para micropropagar y estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento durante la morfogénesis, sino también para estudiar la fotosíntesis siguiendo la ruta del metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) (Seeni y Gnanam, 1980), describir la estructura del ápice (Mauseth, 1983 a), investigar la respuesta nutricional y morfogénica del callo embriogénico (Subhash y Mehra, 1974),

analizar isoenzimáticamente este tipo de tejido (Machado *et al.*, 1993), eliminar enfermedades causadas por hongos y bacterias (Gratton y Fay, 1990), investigar la variación somaclonal (Corneau *et al.*, 1990) y la producción de fitoalexinas (Paré *et al.*, 1991).

Micropropagación

A nivel comercial los métodos de propagación convencional en cactáceas son inadecuados, debido a bajos porcentajes de germinación, lenta tasa de crecimiento y reducida cantidad de brotes laterales (Zachary, 1981; Ault y Blackmon, 1987; Hubstenberger *et al.*, 1992; Montaña *et al.*, 1993).

Al respecto, Yassen-Mohamed *et al.*, (1995 a) mencionaron que la propagación sexual tiene algunos inconvenientes comparada con la asexual, en cuanto a segregación genética y estado juvenil largo, por lo que Hubstenberger *et al.*, (1992) propusieron la propagación clonal a través de la micropropagación como una vía factible en cactáceas. Ellos agregaron que, a través de la micropropagación, se puede satisfacer la demanda de plantas, haciendo que la extinción de las que ahora se encuentran catalogadas como amenazadas sea injustificable.

La micropropagación se refiere a la propagación vegetativa de plantas *in vitro*; en este sistema se utilizan como inóculos o explantes tejidos u órganos que se toman de una o más plantas donadoras, los cuales tienen meristemos preexistentes y a partir de ellos se generan uno o más brotes (Murashige, 1974; Villalobos y Thorpe, 1985; Pierik, 1987).

Los brotes se obtienen de yemas axilares que se desarrollan *in vitro*; estas estructuras están contenidas en areolas o mamilas y pueden provenir de segmentos de plantas de vivero (Vyskot y Jara, 1984; Escobar, 1985; Yassen-Mohamed *et al.*, 1995a), campo (Clayton *et al.*, 1990) y de plántulas germinadas *in vitro* (Fay y Gratton, 1992).

Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) y Hubstenberger *et al.*, (1992) señalan que en el cultivo de yemas axilares aún existen varias incógnitas por resolver; sin embargo, este método de clonación puede ser eficiente en especies útiles.

En la micropropagación existen ventajas sobre los sistemas convencionales de propagación; sin embargo, es importante mencionar que estas ventajas dependen fuertemente de la infraestructura con que se cuente, del valor agregado que tenga en el mercado la especie que desea propagarse, el nivel de producción que pretenda generarse y de factores inherentes al método, como la condición fitosanitaria de las plantas donadoras de inóculos o explantes (presencia de alguna enfermedad), la edad fisiológica (juvenil, maduro), deficiencias nutricionales, tamaño y tipo de tejido seleccionado como explante, los constituyentes del medio de cultivo, las condiciones de incubación, la interacción entre factores fisicoquímicos y eficiencia en el número de brotes generados/explante (Escobar, 1985; Villalobos y Thorpe, 1985).

Desde el punto de vista científico, la micropropagación (cultivo de órganos o tejidos) es una opción para multiplicar rápidamente variedades o especies que cuentan con pocos individuos o que tienen dificultades para propagarse por métodos convencionales. A través de esta herramienta de propagación, se puede tener un mayor control fitosanitario, generar plantas libres de virus (cultivo de meristemos) y puede acelerarse el mejoramiento genético proliferando en corto tiempo genotipos sobresalientes.

Además de la micropropagación, en el cultivo de tejidos *in vitro*, pueden inducirse otras respuestas morfogénicas como embriogénesis somática (Subhash y Mehra, 1974; Machado *et al.*, 1993) y organogénesis (Minocha y Mehra, 1974; Sarling y Dodds, 1983).

Propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos

La propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo y para que la célula pueda expresar este potencial es necesario que se le proporcionen las condiciones medio ambientales adecuadas, utilizando principalmente medios nutritivos de composición definida en recipientes de vidrio y condiciones asépticas en todas las etapas de propagación.

Estas condiciones han sido agrupadas de la forma siguiente:

a) Condiciones químicas o de medio de cultivo: compuestos inorgánicos como macro nutrientes y micronutrientes; compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos reguladores del crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico (agar).

b) Condiciones físicas: temperatura, iluminación, humedad relativa y gases atmosféricos.

Ventajas y desventajas de la propagación

Villalobos y Thorpe (1985), citados por Estrada (1988) y Sagawa y Kunisaki (1990), señalan algunas ventajas del cultivo de tejidos con respecto a otros sistemas de propagación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Consideraciones del sistema de micropropagación.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
✓ Con una pequeña cantidad de tejido, que constituye un explante inóculo, potencialmente se pueden regenerar millones de plantas. El explante es un fragmento de la planta que es establecido <i>in vitro</i> .	✓ La micropropagación requiere técnicas avanzadas e instalaciones y equipo especializados.
✓ Esta técnica permite multiplicar especies con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales.	✓ Se requiere desarrollar métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie.
✓ El número de plantas del genotipo de interés puede incrementarse rápidamente y en un tiempo más corto que la propagación convencional.	✓ Las plántulas inicialmente son muy pequeñas.
✓ Los niveles de nutrimentos, luz, temperatura y otros factores pueden ser fácilmente controlados para acelerar la multiplicación vegetativa y regeneración.	✓ Para que sea factible su aplicación se requiere que la propagación <i>in vitro</i> del genotipo de interés sea rápida, más eficiente y menos costosa que la propagación convencional o comercial que se tenga registrada, destacando sus diferencias en cuanto a su volumen de producción, calidad y uniformidad.
✓ Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajo costo y en tiempos económicamente costeados.	
✓ Se puede controlar la sanidad del material propagado.	
✓ Los materiales se pueden transportar bajo las condiciones <i>in vitro</i> a otros países con menos restricciones.	

MÉTODOS USADOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES

- a) Obtención de embriones somáticos a partir de callos o células en suspensión.
- b) Obtención de brotes adventicios a partir de callos o células en suspensión, para su posterior enraizamiento.
- c) Formación de brotes adventicios directamente del tejido, sin pasar por la etapa de callo. Los brotes son posteriormente enraizados.
- d) Inducción de brotes a partir de ápices o yemas axilares, para su posterior enraizamiento.

Generalmente, un medio que contenga altos niveles de auxinas inducirá la formación de callos. También la combinación de auxinas y citocininas pueden promover la formación de callos, pero si se reduce la concentración de auxinas y se incrementa la concentración de citocininas se induce la formación de brotes (Dixon, 1985).

Para el caso de la regeneración *in vitro* de cactáceas, la cantidad de callo producido y la eficiencia de organogénesis depende de las variables siguientes:

- ✓ Tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.
- ✓ Condiciones de crecimiento de la planta donadora.
- ✓ Edad de la planta donadora.
- ✓ Inóculo seleccionado.
- ✓ Porción y edad del tejido donador.
- ✓ Genotipo de la planta donadora (Kut *et al.*, 1984).

ESQUEMA DE MICROPROPAGACION PARA EL BIRRETE O BONETE DE OBISPO

De acuerdo con Litz y Gray (1992), la micropropagación es una técnica para multiplicar especies o variedades en un tiempo más corto, comparado con el método de propagación tradicional (vía sexual o asexual), por lo que se ha considerado como una opción para producir plantas del birrete (*A. myriostigma* Lem.) de manera intensiva en cantidades suficientes, mismas que pueden utilizarse con diferentes propósitos.

Las diferentes etapas de la micropropagación han sido descritas por Pierik (1987) y Margara, (1988), y fueron evaluadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP para determinar el esquema y técnica de micropropagación para esta especie. Se determinó que el esquema abarca cuatro etapas que, en conjunto, implican un período de ocho meses para la producción de vitroplantas.

La primera etapa es la de establecimiento, en donde las semillas se establecen en un cultivo aséptico *in vitro*. La segunda etapa es la de multiplicación, en donde se promueve la inducción de brotes a partir de explantes tomados de epicotilos. El enraizamiento y aclimatación son las etapas siguientes, en donde se promueve la elongación de los brotes y la inducción de raíces.

Después que los brotes forman su sistema radical, se ha completado la formación de las nuevas plantas, las cuales pueden posteriormente aclimatarse en invernadero (Figura 2).

Para la producción intensiva de vitroplantas de esta cactácea, se requieren de segmentos de una o más plantas donadoras, mismas que se utilizan para obtener brotes los cuales, al desarrollarse, formarán nuevas plantas.

De esta manera se puede continuar con la etapa de multiplicación, subcultivando los brotes en un medio de cultivo definido para que éstos se incrementen y continúe su proliferación. Así es como el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo (LACUTEV-CESAL), ofrece a los productores una nueva opción rentable para impulsar el desarrollo productivo en la región.

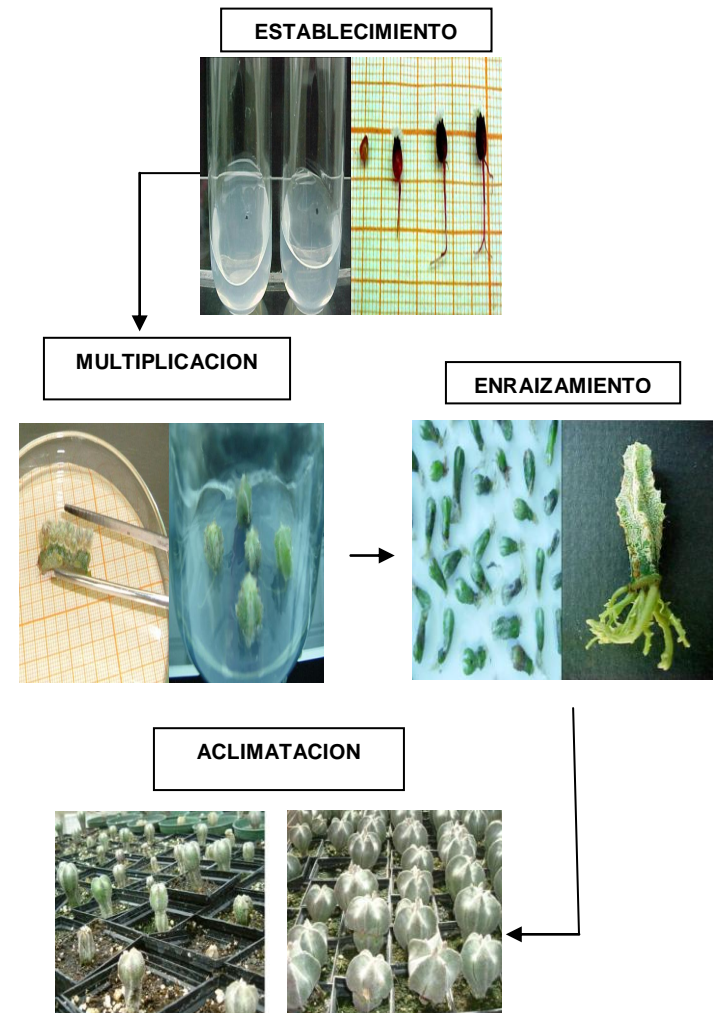


Figura 2. Esquema para la producción de vitroplantas del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.).

Medio Nutritivo Base

Existen diferentes medios de cultivo, por lo que su selección depende del objetivo que se persiga, ya sea para el establecimiento *in vitro* ó multiplicación.

Los explantes requieren de un medio que suministre un balance nutricional adecuado para que a corto plazo se obtenga un crecimiento óptimo.

El medio base que más se ha utilizado para la producción de plántulas *in vitro* de cactáceas es el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se complementa con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de *A. myriostigma* Lem.

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio	
		Milimoles (mM)	Micromoles (µM)
Macroelementos			
NH ₄ NO ₃	80.40	20.60	
KNO ₃	101.11	18.80	
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	1.50	
KH ₂ PO ₄	136.09	1.25	
Ca(NO ₃) ₂	236.15	3.00	
Microelementos			
IK	166.01		1.00
H ₃ BO ₃	61.83		1.00
MnSO ₄ .4H ₂ O	228.00		0.10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54		0.30
Na ₂ MoO ₄ .2H	241.95		0.01
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68		0.001
CoCl.6H ₂ O	239.93		0.001
Quelatos			
Na ₂ EDTA	372.24		1.00
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.28		0.90
Vitaminas			
Acido	123.10		4.06
Piridoxina	205.60		2.43
Tiamina	337.30		0.29
Myoinositol	180.20		5.54
Aminoácidos			
Glicina	75.07		0.26
Acido	238.30		0.49
Medio de Cultivo			
Sacarosa	342.30	87.64	
Agar (6.0 g/l)			

Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo

- 1) En un vaso de precipitado añadir la cuarta parte de agua destilada de la cantidad que se desea preparar de medio.
- 2) Disolver la cantidad de sacarosa.
- 3) Añadir el volumen correcto de cada una de las soluciones de microelementos y macroelementos (Figura 3 c).
- 4) Añadir el volumen correcto de quelatos, vitaminas, y aminoácidos.
- 5) Añadir las fitohormonas si el medio nutritivo lo requiere.
- 6) Mezclar estos componentes y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio (Figura 3 e).
- 7) Introducir el electrodo del potenciómetro en la muestra, esperar que el aparato tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajarlo agregar algunas gotas de HCl 1N y para subirlo aplicar algunas gotas de NaOH (Figura 3 d).
- 8) Colocar el medio en una parrilla para calentar y agregar el agar, mezclar hasta diluirlo, antes de ebullición.
- 9) Vaciar el medio en los recipientes, ya sean frascos, tubos o envases y esterilizar por 20 minutos en autoclave, considerando una temperatura de 120 °C y 4 libras de presión (Figura 3 g).
- 10) Ya esterilizados, los recipientes se colocan en un lugar limpio (Figura 3h).



Figura 3. Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).

Vida del medio

El medio de cultivo se puede almacenar a temperatura ambiente por una semana. Si se requiere aumentar el tiempo de almacenamiento el medio de cultivo tendrá que refrigerarse. Sin embargo, de preferencia se debe usar medio fresco, siempre que sea posible.

PROCESO DE MICROPROPAGACION

ETAPA 1. ESTABLECIMIENTO DEL INOCULO EN UN CULTIVO ASEPTICO

El propósito de esta etapa es establecer *in vitro* un explante estéril en un medio de cultivo aséptico. Esta es una etapa crítica de gran importancia, dado que en este proceso intervienen factores que determinan su éxito, como la contaminación endógena o exógena causada por bacterias y hongos (Hubstenberger *et. al.*, 1992). Este efecto puede evitarse si se realiza una buena desinfección en la que se involucran diferentes tipos y concentraciones de agentes desinfectantes, los cuales no deben ser tóxicos y pueden seleccionarse en función del tipo de explante que vaya a utilizarse. Asimismo, debe evitarse aplicar una alta concentración de productos, ya que estos pueden inhibir la germinación o, la brotación de yemas. El protocolo de desinfección es muy importante, ya que de él depende el establecimiento *in vitro* del explante.

En esta etapa se utilizan semillas del birrete como explante, mismas que se desinfectan obteniendo en la etapa de establecimiento el 1% de contaminación, lo que equivale a obtener 1 tubo contaminado por bacterias u hongos por cada 100 tubos establecidos, lo cual indica que la desinfección realizada es satisfactoria eliminando las partículas de polvo y microorganismos sin provocar la muerte del tejido vegetal (Figura 4).

Villegas (1996) y Páques (1991), agregan que, además de eliminar la contaminación, en esta etapa se debe evitar la sobrehidratación, malformación y oxidación del tejido, ya que esto puede generar plántulas o brotes anormales que difícilmente podrán multiplicarse.

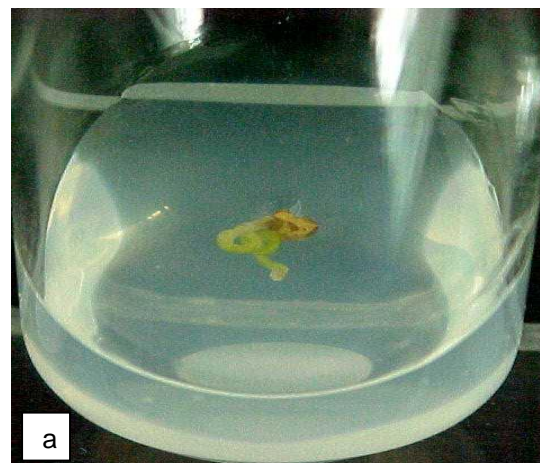


Figura 4. a.- Contaminación de semillas del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem). b.- Establecimiento de la vitroplanta en un cultivo aséptico en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).

Semillas como fuente de inóculo

Se tienen referencias de que en diferentes semillas de cactáceas se ha logrado establecer un cultivo *in vitro* sin bacterias y hongos sumergiéndolas en etanol al 95 % por 2 min., luego en hipoclorito de sodio al 2% (a partir de la concentración comercial) por 7 min. y enjuagándolas tres veces con agua estéril (Clayton *et al.* 1990). Otros autores han utilizado hipoclorito de sodio al 1%, más unas gotas de surfactante por 10 min. obteniendo también resultados satisfactorios (Hernández, 1994).

Mauseth (1979 b) utilizó la misma concentración de hipoclorito de sodio que Hernández y Godínez (1994); sin embargo, él enjuagó las semillas con HCl al 0.01 N estéril en lugar de agua. Por su parte Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) no utilizaron etanol y aumentaron la concentración de hipoclorito de sodio al 6% por 20 min. y posteriormente las enjuagaron tres veces con agua doblemente esterilizada.

Como se observa, todos han generado para el establecimiento aséptico diferentes protocolos de desinfección y han utilizando agua destilada o bidestilada estéril, diferentes concentraciones de etanol, hipoclorito de sodio (ingrediente activo de muchos blanqueadores comerciales) o hipoclorito de calcio más un surfactante para mejorar el contacto entre el explante y el producto desinfectante.

Las diferencias encontradas en la eficiencia del protocolo de desinfección de las semillas depende del tipo y tiempo de exposición de los reactivos empleados. La selección de éstos debe ser en función de la consistencia de la testa, pues altas concentraciones pueden dañarla, necrosar el micrópilo e impedir la emergencia de la radícula y, en caso extremo, matar al embrión.

Del éxito que se tenga en la desinfección dependerá el desarrollo futuro de la micropropagación. Para el caso de esta cactácea se logró establecer un cultivo aséptico, mostrando que la eficiencia de un protocolo de desinfección depende del tipo de tejido vegetal que se maneje y del tiempo de exposición de los reactivos empleados.

Protocolo de desinfección

En la etapa de establecimiento *in vitro* se generó una técnica de desinfección para las semillas de *A. myriostigma* Lem. en la que es importante considerar el tiempo de inmersión y concentración de agentes desinfectantes, para lo cual se evaluaron ambos parámetros seleccionando el siguiente protocolo de desinfección (Cuadro 4).

Cuadro 4. Protocolo de desinfección optimizado para las semillas de *A. myriostigma* Lem. utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

ANTES * ¹	MODIFICADO ²
-Lavar agua estéril y jabón 3 min.	-Lavar con agua estéril y jabón 5 min.
-Sumergir en alcohol 70 % 3 min.	-Sumergir en alcohol 70 % 6 min.
-Sumergir en Hipoclorito de sodio al 100%. (6% concentración comercial) por 10 min.	-Sumergir en Hipoclorito de sodio al 100 %. (6% concentración comercial) por 5 min. más unas gotas de tween 20.
-Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.	-Enjuagar 5 veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar.
-Establecer en tubo.	-Establecer las semillas en tubo o frasco con 5 y 15 mL de medio respectivamente.

*.- Hernández y Godínez (1994) y Villegas (1996).

¹.- 90 a100 % de contaminación.

².- 1 a 5 % de contaminación.

Con este protocolo de desinfección no se dañó ni quemó la testa de las semillas del birrete, tampoco se necrosó el micrópilo y mató el embrión, permitiendo la emergencia de la radícula durante la germinación (Figura 4b).

Germinación *in vitro*

Las semillas de esta cactácea están formadas por un embrión, material de reserva y tejidos de protección, estos tegumentos forman una cubierta protectora llamada testa que en el caso del birrete es cerosa e impermeable al paso del agua. Como ocurre con todas las especies de propagación sexual la germinación de esta especie consiste en la reanudación del crecimiento del embrión, el cual ha permanecido en estado latente.

Durante el proceso de germinación el metabolismo celular de la semilla se incrementa, el embrión activa su crecimiento, la cubierta de la semilla se rompe y emerge la plántula (Besnier, 1989).

En la etapa de establecimiento se evaluó el efecto de seis diferentes medios de cultivo en la germinación *in vitro* (Medio Base de Germinación MBG), seleccionando el que registró mayor porcentaje de germinación y altura de las vitroplantas.

En el caso del birrete, se encontró que el 100% de las semillas de esta especie establecidas en el MBG son quiescentes y viables presentando un embrión vivo con capacidad para germinar (Figura 5).

Los resultados mostraron que esta cactácea no requiere promotores de la germinación para romper el letargo morfológico que se presenta cuando las semillas se hacen germinar en invernadero.



Figura 5. Aspecto del hipocotilo y epicotilo de las semillas del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.), a los 30 días de germinadas *in vitro* en el LACUTEV-CESAL.

Velocidad de emergencia

La emergencia de las plántulas de esta especie obtenida en el LACUTEV-CESAL es más rápida bajo condiciones asépticas, que en condiciones *ex vitro*, siendo el tipo de medio de cultivo y condiciones de incubación *in vitro* lo que favorece este proceso, inhibiendo el característico letargo morfológico que se observa cuando las semillas germinan en condiciones naturales, o cuando éstas se hacen germinar en invernadero o vivero.

Del análisis realizado se determinó que la germinación es epigea y que la emergencia de las vitroplántulas se registra desde los siete días de incubación *in vitro*, observándose un hipocotilo pivotante fuerte, con un epicotilo compuesto por dos hojas rudimentarias. En condiciones controladas, el MBG que influye en la velocidad de germinación de esta cactácea fue adicionado con osmocondicionadores (Tratamiento T5, ver cuadro 5).

En este medio, desde los siete días de incubación se registró la mayor velocidad de emergencia superando al resto de los medios de cultivo utilizados en la etapa de establecimiento (Cuadro 3). Esta tendencia se mantuvo hasta el final de la evaluación, aun cuando no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, mostrando que *in vitro* esta cactácea requiere de hasta 42 días para que las semillas completen su proceso de emergencia, registrando en promedio 67 % de germinación (Figura 6).

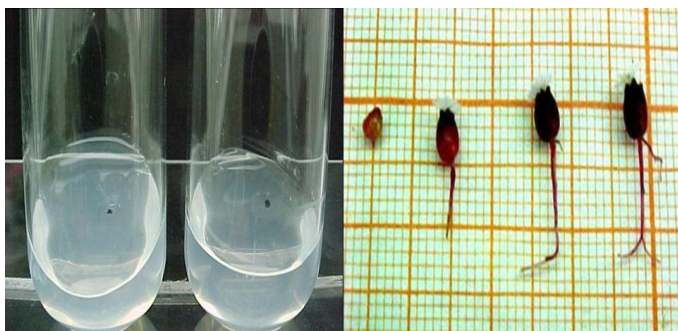


Figura 6. Velocidad de emergencia de las plántulas del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.), después de 42 días de establecidas *in vitro* en el LACUTEV-CESAL-INIFAP.

Porcentaje de germinación

En los primeros 28 días de incubación se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los MBG evaluados, siendo el medio adicionado con osmoacondicionadores el que registró el mayor porcentaje de germinación (67.5%); sin embargo, al final de la evaluación todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales, encontrándose que en condiciones *in vitro* esta especie puede alcanzar, un porcentaje de germinación superior a 65 % a los 42 días de incubación (Cuadro 5).

Las diferencias entre los MBG evaluados se encontraron solamente en la altura y aspecto de las vitroplántulas.

Aún cuando no hubo diferencias estadísticas, los medios de cultivo adicionados con ácido giberélico, en general presentaron menores porcentajes de germinación que sus homólogos que no fueron adicionados con este componente, registrando un efecto inhibitorio. Esta respuesta indica que esta especie no requiere promotores para la germinación y que la relación endógena de giberelina-citocinina promueve este proceso.

Cuadro 5. Porcentaje de germinación de *A. myriostigma* Lem. en diferentes medios de cultivo *in vitro* evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

TRAT	DIAS					
	7	14	21	28	35	42
T1	5.9 ^b	32.5 ^a	49.2 ^{ab}	55.7 ^{ab}	65.5 ^a	68.4 ^a
T2	8.8 ^{ab}	30.0 ^a	43.2 ^{ab}	56.4 ^{ab}	57.6 ^a	62.3 ^a
T3	3.6 ^b	20.8 ^{ab}	36.6 ^b	44.9 ^b	61.0 ^a	67.0 ^a
T4	0 ^b	4.0 ^b	12.0 ^c	45.0 ^b	68.0 ^a	68.4 ^a
T5	20.5 ^a	37.5 ^a	59.3 ^a	67.5 ^a	70.3 ^a	70.3 ^a
T6	3.3 ^b	33.3 ^a	46.5 ^{ab}	55.7 ^{ab}	65.6 ^a	66.8 ^a
μ	6.7	29.2	44.2	58.0	64.6	67.2

MS= Medio Murashige-Skoog. AG₃=Acido giberélico. MAAA = Medio agar y osmoacondicionadores

T1.- MS; T2.- MS + AG₃; T3.- MS ½; T4.-MS ½ + AG₃; T5.- MAAA; T6.- MAAA + AG₃ Medias con la misma letra en cada columna difieren significativamente (Tukey $P \leq 0.05$).

Altura y aspecto de las vitroplantas

Entre los MBG existieron diferencias en el desarrollo de las vitroplantas, los medios adicionados con el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con y sin promotores de la germinación (T1 (MS) y T2 (MS + AG₃), registraron la mayor altura de las vitroplantas (12 mm); sin embargo, el 90% de estas se sobrehidrataron o vitrificaron, efecto que es negativo para la micropropagación de esta cactácea porque origina mayor acumulación de agua en el tejido parenquimático, desdiferenciándolo a callo, efecto que también se ha observado en otras cactáceas en donde la

concentración total de sales y la relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ del medio es alta.

Las vitroplantas desarrolladas en el MBG adicionado con los nutrimentos del medio MS $\frac{1}{2}$ (Murashige y Skoog, 1962) con y sin promotores de la germinación (T3 y T4), no presentaron este efecto registrando una altura de las vitroplantas de 9 mm. Las vitroplantas que se desarrollaron en los MBG adicionados con osmoacondicionadores con y sin promotores de la germinación (T5 y T6) registraron una altura 50% menor que en los demás medios evaluados.

De los resultados encontrados en la etapa de establecimiento *in vitro* del birrete, se determinó que, en el proceso de germinación y desarrollo de las vitroplantas, la selección del medio de cultivo es importante y que el MBG adicionado con el medio MS $\frac{1}{2}$, fue el que mejor promueve la germinación y la altura de las vitroplantas de *A. myriostigma* Lem., con las que se puede continuar con las siguientes etapas del proceso de micropropagación de esta especie.

ETAPA 2. MULTIPLICACIÓN O INDUCCIÓN DE BROTES

En esta etapa se busca producir un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente pueden dar origen a brotes.

El desarrollo de estos brotes puede ser obtenido a partir de la inducción de yemas axilares, órganos o la inducción de embriones, considerando un determinado tipo de explante y una determinada concentración de reguladores de crecimiento aplicados a un medio de cultivo base de multiplicación (MBM).

De las condiciones del medio de cultivo se obtiene una tasa de multiplicación que puede variar dependiendo de la especie.

Con esta cactácea el desarrollo de brotes se logró mediante organogénesis directa y activación de areolas. La inducción de brotes del birrete se obtuvo a partir de tres tipos de explante, considerando un período de incubación de 8 semanas (Figura 7).

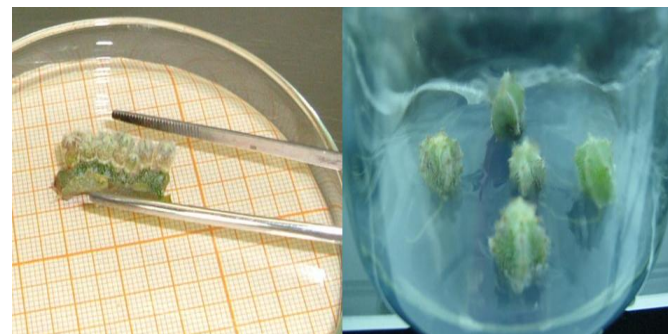
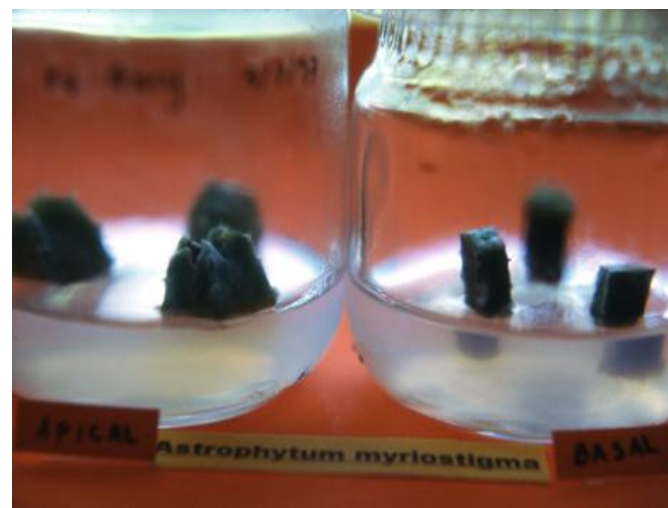


Figura 7. Establecimiento de explantes en la etapa de multiplicación para la inducción de brotes del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.), en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP

Los explantes incubados en un MBM elaborado con los componentes del medio MS, adicionado con una relación de citocinina- auxina de 10:1 pueden producir dependiendo del tipo de explante de 4 hasta 16 brotes por explante (Cuadro 6).

Cuadro 6. Respuesta morfo genética de diferentes tipos de explante de *A. myriostigma* Lem. utilizados en la inducción de brotes (MBM) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

TIPO DE EXPLANTE	NUMERO DE BROTES/EXPLANTE	ALTURA (mm)
BASAL	4.2	5.7
APICAL	3.6	5.5
SEGMENTOS AXILARES	4.0	6.0

La tasa de multiplicación para explantes basales y apicales es similar a la reportada para los géneros *Coryphantha*, *Echinocereus* y *Mammillaria*, por lo que la tasa de multiplicación es exponencial manteniendo una relación 1:4:4:4; sin embargo, con los explantes tomados de las costillas de la planta esta proporción se incrementa hasta 16 nuevos brotes, que representa obtener por planta fraccionada una relación 1:16:16:16. Los brotes generados en dichos explantes registran, en promedio, una altura de 6 mm requiriéndose de un subcultivo en medio fresco sin fitohormonas para promover su elongación y posterior enraizamiento.

Si se establecen 100 explantes, en un período de ocho semanas se pueden producir de 400 a 1600 nuevos brotes, mismos que formarán las nuevas vitroplantas. Esta producción triplica el volumen de plantas que pueden obtenerse por métodos convencionales.

ETAPA 3. ENRAIZAMIENTO

En esta etapa se pretende promover la rizogénesis mejorando la acción de las auxinas endógenas.

Algunas especies de cactáceas presentan una alta concentración endógena de auxinas, que promueve el enraizamiento de los brotes en el mismo medio de cultivo utilizado para la multiplicación (MBM), sin necesidad de aplicar esta fitohormona. En algunas especies el proceso de enraizamiento puede realizarse directamente *in vivo* en invernadero, mientras que en otras se requiere que los brotes desarrollados sean subcultivados en medios específicos para la inducción de raíces.

En todos los casos referidos, el proceso de rizogénesis es mediado por dicha fitohormona siguiendo tres etapas:

- Etapa de los fenoles.- Estos tienen un efecto sinérgico, inhibiendo la enzima AIA oxidasa. Esta inhibición permite que la auxina se acumule en la parte basal del brote, promoviendo la división celular e induciendo la formación de raíces.
- Etapa de Inducción Temprana.- Los monofenoles se cambian a polifenoles e inactivan a la auxina dando comienzo a la tercera etapa.
- Etapa Iniciación Tardía.- Los primordios se organizan y finalmente se da el crecimiento y diferenciación de raíces.

El enraizamiento *in vitro* puede ser afectado por la especie, tipo y tamaño del explante, estado fisiológico del tejido, número de subcultivos, composición del medio de cultivo y condiciones de incubación.

Starling y Dodds (1983) y Roberts y Matthews (1995), señalan que el sistema radical desarrollado *in vitro* no es completamente funcional, por lo cual sugieren el enraizamiento *in vivo*; sin embargo, Cabaleiro (1991), demostró que a pesar de que las raíces generadas *in vitro* son más delgadas que las generadas *in vivo*, ambas tienen la misma capacidad para absorber nutrientes. El problema del enraizamiento *in vitro* consiste en que las raíces llegan a ser largas y numerosas, haciéndose sensibles al daño mecánico cuando se realiza el trasplante al suelo.

Con esta cactácea se evaluó la inducción de raíces en un medio base (MIR) adicionado con tres niveles de osmocondicionadores (1= 8.76, 2= 11.6 y 3= 14.6 μM) y cuatro niveles de auxinas (a= 0.0, b= 12.43×10^{-1} , c= 18.64×10^{-1} d= 24.86×10^{-1} de AIB). Para el enraizamiento *in vitro*, se utilizaron brotes elongados de 15 mm de altura de *A. myriostigma*, encontrándose que el proceso de rizogénesis se presenta desde las cuatro semanas de incubación y que en todos los tratamientos existieron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en altura de las plantas y número de raíces, así como diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en longitud de raíces.

Número de raíces

El medio MIR adicionado con el tratamiento T7 (11.6 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 18.64×10^{-1} de AIB) resultó significativo en el proceso de inducción radicular, registrando, en promedio 3.4 raíces por planta sin la presencia de callo (Cuadro 7).

El MIR adicionado con los tratamientos T10, T11 y T12, registraron un efecto negativo desdiferenciando el tejido parenquimático formando callo y raíces.

La presencia de tejido desdiferenciado afectó el número y longitud de raíces, quienes registraron valores menores al tratamiento T7.

El tratamiento T9 tuvo un efecto negativo en los tres parámetros evaluados, incidiendo fuertemente en el número de raíces el cual fue el más bajo (0.3) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *A. myriostigma* Lem. obtenido en medio MIR con diferentes concentraciones de auxinas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

TRATAMIENTO	ALTURA PLANTA (mm)	NÚMERO RAÍCES /PLANTA	LONGITUD RAIZ (mm)
T1 (1 + a)	16.8 abc	1.92 abc	7.7 ab
T2 (1 + b)	19.5 a	2.7 ab	5.4 ab
T3 (1 + c)	17.5 abc	1.3 abc	3.0 ab
T4 (1 + d)	17.8 abc	2.4 abc	5.0 ab
T5 (2 + a)	15.6 bc	1.1 abc	9.1 a
T6 (2 + b)	17.5 abc	1.9 abc	6.3 ab
T7 (2 + c)	18.2 ab	3.4 a	5.0 ab
T8 (2 + d)	17.8 abc	2.0 abc	2.6 ab
T9 (3 + a)	14.2 c	0.3 c	2.9 ab
T10 (3 + b)	16.7 abc	0.6 bc	2.9 ab
T11 (3 + c)	16.2 abc	1.0 bc	1.7 b
T12 (3 + d)	18.0 ab	1.6 abc	3.6 ab

1.- 8.76; 2.-11.6; 3.-14.6 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
a.- 0.0; b.- 12.43×10^{-1} ; c.- 18.64×10^{-1} ; d.- 24.86×10^{-1} de AIB)
Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey $P \leq 0.05$).

Longitud de raíces

La concentración de auxinas tiene un efecto sinergista en el número y longitud de raíces. Al respecto, se encontró un efecto inverso en los tratamientos T5 (11.6 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 0.0×10^{-1} de AIB) y T7 (11.6 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 18.64×10^{-1} de AIB).

El primero registró un número de raíces bajo (1.1 raíces por planta) pero mayor longitud radicular (9.0 mm) que el resto de los tratamientos. En cambio, con el tratamiento T7 el número de raíces registró la media más alta (3.4 raíces por planta) con una longitud de 5.0 mm, la cual fue a excepción de los tratamientos T5 y T11 estadísticamente igual al resto de los tratamientos (Cuadro 7).

Altura de la planta

En altura de la planta el tratamiento T2 (8.76 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 12.43×10^{-1} de AIB) registró la media más alta (19.5 mm), siguiéndole en orden de importancia los tratamientos T7 y T12, quienes registraron una media estadísticamente igual (18.0 mm). Una altura inferior la registraron el resto de los tratamientos, siendo el tratamiento T9 el que presentó la media más baja (14.2 mm) (Cuadro 7).

Del análisis realizado se determinó que el tratamiento que promueve el enraizamiento *in vitro* de los brotes de *A. myriostigma* Lem. es el MIR adicionado con (11.6 μM de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ y 18.64×10^{-1} de AIB) obteniendo en 7 semanas plantas con 3.4 raíces, con una longitud mayor o igual a 5.0 mm.

Estas nuevas vitroplántulas pueden aclimatarse y seguir su fase de invernadero (Figura 8).



Figura 8. Número y longitud de raíces de las vitroplantas del bonete o birrete de obispo (*A. myriostigma* Lem.), generados en el medio de cultivo MIR en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.

ETAPA 4. ACLIMATACION

La etapa de aclimatación es la culminación del proceso de micropropagación, donde se debe de producir el mayor número de plantas como producto terminado con alta calidad fitosanitaria a bajo costo.

En la etapa de endurecimiento o aclimatación, se requiere que las plantas pasen de su condición heterótrofa a autótrofa. El endurecimiento puede realizarse en una cámara de crecimiento o en invernadero; en ellos, se someten las plantas a una atmósfera de alta humedad relativa, temperatura de 20 a 25 °C y puede aplicarse algún tipo de enraizador comercial. En esta etapa, las plantas se preparan para un cambio ambiental y fisiológico, en donde se requiere que el tallo y hojas generen una capa de cera, los estomas sean fisiológicamente funcionales para que puedan controlar la transpiración y el aparato fotosintético genere sus propios carbohidratos.

Dumas y Monteouis (1995), señalan que el paso de la condición *in vitro* al invernadero es esencial para el éxito en la micropropagación. Este se logra manteniendo el material en áreas con alta humedad relativa (90 - 100%) por un período de tiempo determinado, reduciendo las sales durante los subcultivos previos a la aclimatación e incrementando la concentración de sacarosa para que los carbohidratos sirvan de fuente de energía durante el enraizamiento.

La aclimatación consistió en lavar con agua corriente las vitroplantas de esta cactácea y posteriormente aplicar una solución 1:1 de fungicidas y bactericidas previo a su establecimiento en el invernadero del CESAL.

Las vitroplantas se establecieron en charolas con diferentes mezclas de sustrato esteril: S1=Peatmoss (P)+Agrolita (A)+Humus (H); S2= Suelo orgánico+A+H; S3= Suelo arenoso+A+H; S4= Arena fina+P+A y S5= Gravilla+P+H, todos en una relación 75:20:5. Las plántulas se mantuvieron 8 semanas en invernadero, manteniendo la humedad relativa del 90% aplicando un riego diario por nebulización, durante los primeros quince días, logrando de este modo su aclimatación.

Porcentaje de supervivencia

Entre sustratos se encontraron diferencias significativas, siendo los sustratos arenosos S3 y S4, donde se obtuvo el mayor porcentaje de plantas aclimatadas (96.5 %, en comparación con las plantas establecidas en sustrato orgánico (S2), donde la mortalidad de las plantas fue mayor. En otras especies de cactáceas, Vyskot y Jara (1984), obtuvieron porcentajes de supervivencia similares, mostrando que el tipo de sustrato influye significativamente en este proceso. A nivel comercial el sustrato S1 ha sido utilizado para el endurecimiento en otras especies ornamentales de tallo suculento; sin embargo, la alta capacidad de

retención de humedad de este y del sustrato S2 afecto la supervivencia de las plantas del birrete.

Los tratamientos S3 y S5 registraron una supervivencia estadísticamente igual, pero este último resultó más poroso afectando negativamente el desarrollo de las plantas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de supervivencia e incrementos en la altura de las plántulas de *A. myriostigma* Lem. en el invernadero del CESAL-CIRNE-INIFAP.

TRAT.	S (%)	AI (mm)	DIAS				AF (mm)
			7	14	21	28	
S1	75.00 c	13.4	2.2	4.1	7.8	10.2 a	23.6 a
S2	81.39 bc	9.7	1.8	3.6	6.3	7.4 a	17.2 a
S3	94.44 ab	12.4	1.2	2.1	2.6	4.1 ab	16.6 ab
S4	99.17 a	14.5	0.3	0.2	0.2	1.3 ab	15.9 ab
S5	89.08 abc	13.9	-1.3	-1.0	-0.2	-5.8 c	8.1 c
X	87.82	12.7	1.3	2.5	4.1	5.7	18.3

S= Supervivencia; AI= Altura inicial; AF= Altura final.

Sustratos: S1.- Peatmoss (P)+Agrolita (A)+Humus (H); S2.- Suelo orgánico+A+H; S3.- Suelo arenoso+A+H; S4.- Arena fina+P+A y S5. Gravilla+P+H.

Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey $P \leq 0.05$).

Incrementos en Altura

Las plantas que fueron establecidas en los sustratos S1 y S2 duplicaron su altura inicial superando al resto de los tratamientos; sin embargo, ambos presentaron una supervivencia menor al 81%. Johnson y Emimo (1979) proponen que en cactáceas, se utilicen sustratos porosos como los sustratos S3 y S4, los cuales fueron estadísticamente iguales; sin embargo, las plantas crecidas en el sustrato S4 presentaron menor desarrollo que las plantas establecidas en el sustrato S3 (arena+A+H) en relación 75:20:5 por lo que este último es el tipo de sustrato requerido para

la aclimatación de las plantas generadas por cultivo de tejidos del birrete, debido a que pueden obtenerse altos porcentajes de supervivencia (94%) e incrementos en altura de las plantas.

CONCLUSIONES

Bajo el esquema laboratorio-invernadero esta tecnología puede aumentar la producción de este tipo de especies en más del 400%, en comparación con la producción convencional.

En el mercado de las ornamentales, la producción de especies de cactáceas en estatus de riesgo no supera el 5% de las 100 mil plantas anuales que se producen a nivel nacional, por lo que existe interés en incrementar la producción con especies de cactáceas de alto valor agregado producidas bajo este esquema.

Esta tecnología generada para la micropropagación de esta cactácea (*A. myriostigma*) puede aplicarse en laboratorios e invernaderos comerciales con registro dedicados a la producción de plantas de ornato que se localizan en Coahuila, Morelos, Jalisco, Estado de México, San Luís Potosí y Nuevo León.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson F. E. 2001. La Familia de Cactus. Timber pp. 665-673.
- Ault, J. R. and W. J. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). Hort. Sci. 22(1): 126-127.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas Biología y Tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 637p.
- Bravo-Hollis, H. y R. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. UNAM, Vol. II pp. 85-101.

- Britton, N. L. and J. N. Rose. 1963. The cactaceae. Description and illustrations of plants of the cactus family. Vols. I y II: 3-8, Vols. III y IV:181-185.
- Cabaleiro, C. 1991. Effect of light on rooting *in vitro* of petunia microshoots. Acta Hort. 300:189-195.
- Clayton, P. W.; J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hor. Sci.155(2):337-343.
- Corneau, M. G., C. Corneau and S. N. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. *In*: Abstracts VIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-66 p 99.
- Dabekaussen, M. A. A.; R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Sci. Hort. 46:283-294.
- Debergh, P.C. and L.J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae 14:335-345.
- Dixon, R.A. 1985. Plant cell culture: a practical approach. IRL Pres. Oxford. 236 p.
- Dumas, E. and O. Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoot from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants; influence of activated charcoal. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 40:231-235.
- Escobar H., A., 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 80 p.
- Estrada L., A. A. 1988. Producción de brotes e injertos *in vitro* de seis especies de nopal (*Opuntia* spp.) originarias del altiplano potosino zacatecano. Tesis maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México 95 p.

- Fay, M. F. and J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya*(10): 33-48.
- Gratton, J., and M. F. Fay. (1990). Vegetative propagation of cacti and other succulent *in vitro*. In: Pollard, J. W. and Walker, J. M.(eds), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6 Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. pp: 219-225.
- Hernández, H. M. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Herbario Nacional. Instituto de Biología, UNAM. [http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta26\(33-52\).pdf](http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/ABM/ABM.26.1994/acta26(33-52).pdf). (25 Septiembre 2008).
- Hubstenberger, J. F.; P. W. Clayton and G. C. Phillips. 1992. IV Micropropagation of Cacti (Cactaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 20:49-68.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1979b. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *Hort. Sci.* 4(5):605-606.
- Kut, S.A., J.E. Bravo and D.A. Evans. 1984. Tomato. In: *Handbook of plant cell culture. Crop species*. McGraw-Hill. New York. Vol. 3:247-289.
- Litz, E. R., and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Ed. by F. A. Hammerschlag and Relitz. *Biotechnology of perennials fruit Crops*. Cab International pp: 3-25.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Anexo Normativo II. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/normas/rec_nat/no_059_a2g.html.(20/Octubre /2008).
- Machado M., H. S.; A. J. Prioli and C. A. Mangolin. 1993. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) Isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvians* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*, Vol. 31. (3-4):167-172.
- Martínez-Vázquez, O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hort. Sci.* 61(1):99-105.
- Mauseth, D. J. 1976. Cytokinin and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems In: *Opuntia polyacantha* (cactaceae). *Amer. J. Bot.* 63 (10): 1295-1301.
- Mauseth, D. J. 1979a. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. and Succ. J.* (51): 186-187.
- Mauseth, D. J. 1978. An investigation of the phylogenetic and ontogenetic variability of shoot apical meristems in the Cactaceae. *Amer. J. Bot.* 65(3): 326-333.
- Mauseth, D. J. 1979b. Cytokinin-elicited formation of the pith-rib meristem and effects of growth regulators on morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) seedling shoot apical meristems. *Amer. J. Bot.* 66(4):446-451.
- Mauseth, D. J. 1983a. Introduction to cactus anatomy. Part 2. Apical meristems. *Cact. and Succ. J.* (55):18-21.
- Mauseth, D. J. and W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* Cactaceae. *Amer. J. Bot.* 62(8): 869-877.
- Minocha, C. S. and P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria proflera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61 (2):168-173.
- Moeller-Villar, G. 1993. Notas sobre la Sierra de la Paila. *Cact. Suc. Mex.* XXXVIII. No. 3:57-60.

- Montaño M., C.; F. Vega V. y H. Nolasco S. 1993. Aspectos ecológicos y económicos de las cactáceas mexicanas. *Cact. Suc. Mex.* XXXVIII. No. 4 pp. 89-92.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Newland, C.; K. S. Ives; G. E. Joseph; M. Mittleman, R. E. Foster; C. Scannell; W. R. Feldman; F. S. Crosswhite and C. Hansen. 1980. Propagation techniques for desert plants. *Desert Plants.* Vol. 2 (4): 205-217.
- Nobel, P. S. 1998. *Los Incomparables Agaves y Cactus.* Ed. Trillas. México. 211 p.
- Paré, P. W.; N. Dimitrievna and T. J. Mabry. 1991. Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture. *Phytochemistry* 30:1133-1135.
- Páques, M. 1991. Vitrification and micropropagation; Causes, remedies and prospects. *Acta Hort.* 283-289.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers pp: 54-82.
- Roberts, A. and D. Matthews. 1995: The preparation *in vitro* of chysanthemum for tranplantation to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 40: 191-193.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cact. Succ. J.* 64 (3):116-119.
- Sánchez M., H. 1987. Observaciones sobre el estado y conservación de doce especies de cactáceas amenazadas del noreste de México. *Cact. Suc. Méx.* 32(3):61-67.
- Seeni, S. and A. Gnanam. 1980. Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant *Chamaecereus sylvestrii* (Cactaceae). *Physiol. Plant.* 49:465-472.
- Sagawa, Y. and J. T. Kunisaki. 1990. Micropropagation of floriculture crops. *In: P.V. ammirato, D.A. Evans, W.R. Shar and Y. P. S. Baja (eds) Handbook of plant cell culture. Ornamental species.* McGraw-Hill New York. Vol. 5: 32-39
- Starling, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. and Succ. J.* (57):114-115.
- Starling, R. J. and J. H. Dodds. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya.* pp:84-90.
- Subhash, C. M., and P. N. Mehra N. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria proflera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2):168-173.
- Villalobos A., V. y M. Thorpe. 1985. La micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados, *En: Fundamentos y Aplicaciones del cultivo de tejidos en la Agricultura.* W. Roca CIAT. Colombia pp: 67-85.
- Villegas M., A. 1996. Desinfección y establecimiento *in vitro* del explante. Laboratorio de Biotecnología Especialidad Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México 5 p.
- Vyskot, B. and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59(3): 449-452.
- Yassen-Mohamed, Y.; S. Barringer A., W. Splittstoesser E. and R. J. Schnell. 1995 a. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 42:117-119.
- Zachary, S. W. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biol. Conservation.* 20: 83-89.

