

# TÉCNICAS DE DESINFESTACIÓN Y SIEMBRA *in vitro* DE EMBRIONES MADUROS DE FALSO PEYOTE (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) Shumann), (Cactaceae).

A. Medel-Narváez<sup>1</sup>; A. Flores-Hernández<sup>1</sup>; S. Armendáriz-Erivez<sup>1</sup> y E. Santamaría-César<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. Apartado Postal 8. Bermejillo, Dgo. 35230, México. moncho08@yahoo.com

## RESUMEN

La cactofilia ha provocado que *Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* esté en la lista de especies en peligro de extinción. Existen inconvenientes para propagar esta especie, por lo que se pretende buscar nuevas alternativas para incrementar su número y evitar su desaparición. El objetivo fue obtener una técnica para propiciar la rápida emergencia de plántulas en condiciones asépticas. Para ello se evaluaron 8 variantes de desinfestación de la semilla, cinco medios de cultivo utilizando arena como sustrato y MS-62 en diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 %) y dos tipos de siembra. Se evaluó la incidencia de contaminantes, rapidez y porcentaje de germinación. El análisis de varianza en ambas pruebas mostró que solo hay significancia entre los factores técnica de desinfección y tipo de siembra, pero no en los medios de cultivo. Se adoptó la técnica de desinfestación con más éxito, la siembra de embriones maduros y la utilización de arena como medio de soporte para inducir la germinación de la especie.

**Palabras clave:** Cactáceas, contaminación, germinación.

## SUMMARY

The extensive use of cactus as ornament plants has caused that some species, such as *A. fissuratus* var. *fissuratus* are in great risk of extinction. *A. fissuratus* has several problems to be propagated. Therefore, it is important to explore alternative ways that allow increase its abundance and avoid its disappearance. The objective of this study was to obtain a method for inducing fast emergence of seedlings under aseptic conditions. Eight seed disinfestations methods, five MS-62-derived culture media (0, 25, 50 and 100%), and two sowing techniques (embryo and seeds) were tested. Rate and percentage of germination and incidence of contaminant agents were measured. The analysis of variance showed significant differences for disinfestation and sowing methods. The best disinfestation method for mature embryos cultured in sand were adopted to induce germination of this species.

**Key words:** Cactus, contamination, germination.

## INTRODUCCIÓN

Las cactáceas por la hermosura de sus flores y formas bizarras, han sido objeto de una nefasta cactofilia. Desde el siglo pasado los traficantes extranjeros en plantas, las han arrancado de su hábitat exportándolas por toneladas para su venta. El saqueo ha sido tan brutal que muchas especies como *Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* están siendo amenazadas (Franco, 1997) y muchas más están en peligro de extinción (Bravo-Hollis, 1997).

Esta especie se ha catalogado como endémica del estado de Coahuila (Bravo y Sánchez, 1991), pero se ha encontrado una colonia de esta especie en las sierras de Bermejillo, al

Noreste del estado de Dgo.; razón por la que se pretende dar a conocer la existencia de *A. fissuratus* var. *fissuratus* en este estado.

La técnica de desinfestación de la semilla para la siembra de embriones maduros es una técnica prometedora para inducir rápida germinación y plántulas libres de patógenos, además de tener bajos costos y estar al alcance de los viveristas.

Los cactus pueden ser reproducidos de muy distintas maneras incluyendo la reproducción sexual y diversas formas asexuales, como la propagación por injertos, hijuelos y de más reciente uso las técnicas *in vitro*. La reproducción vegetativa es el único medio para obtener plantas que no

tienen flores, que dan flores estériles. De este modo, las cactáceas de desarrollo anormal, monstruosas, o de lento crecimiento solo se reproducen de este modo, ya que las plantas provienen de mutaciones genéticas y no pueden reproducirse normalmente por semillas (Nessmann, 1994).

La reproducción de cactáceas constituye uno de los principales mecanismos para contribuir a su conservación; entendida esta como el logro de la preservación de las especies que integran esta familia y su uso racional en la actividad económica (Sánchez, 1991).

Actualmente el género *Ariocarpus* se propaga por medio de semillas y por injertación, de esta segunda modalidad se pierde gran número de especies, por que el éxito de prendimiento del injerto no es del 100 %, además de que se pueden degenerar las especies o morir.

El éxito del cultivo *in vitro* de plantas como un método de propagación para estudios morfogénéticos, mejoramiento genético y crecimiento de células para diversos tipos de estudio, morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y otros, está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y otros parámetros ambientales (López, 1985).

Para cultivar células, semillas, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos simples. En primer lugar es necesario seleccionar y separar de la planta el material con el que se va a trabajar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuada. Tanto la asépsia como la incubación del material vegetal se lleva a cabo en ambiente estéril (Ochoa, 1985).

La excisión de embriones provenientes de óvulos y semillas, y su cultivo en un medio nutritivo definido, permite investigar los factores que influyen en el crecimiento embrionario bajo condiciones controladas y además definir químicamente el medio ambiente del saco embrionario el cual alimenta al embrión (López, 1985).

El cultivo *in vitro* de embriones facilita experimentos para determinar los factores que regulan el crecimiento de los órganos primordiales

de una plántula y estudiar los aspectos metabólicos y bioquímicos de la germinación, los cuales son difíciles de estudiar cuando el embrión se encuentra dentro de la semilla, en donde existe interferencia de los tejidos adyacentes (López, 1985).

El primer trabajo de cultivo de embriones *in vitro* se llevó a cabo en 1904, y fue obtenido de embriones maduros extirpados de semillas y no inmaduros, la razón es por que el embrión en las semillas se encuentra totalmente desarrollado en una estructura bipolar, la cual contiene un meristemo en cada polo, además de los cotiledones. Por esto, al momento de cultivar al embrión, este contiene células que potencialmente están preparadas para efectuar la división, alargamiento y diferenciación, permitiendo el desarrollo progresivo de la raíz y los brotes axilares de la plántula. De esta manera los requerimientos nutricionales son mínimos (López, 1985).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Área de Sistemas Agrícolas de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), localizada a en el paralelo 25° 52' 28" latitud Norte y 103° 37' 07' longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, con una altitud de 1119 msnm. Ubicada a 3 Km de la ciudad de Bermejillo, Dgo.

Las semillas de la especie fueron colectadas de la parte Norte de la Sierra de Bermejillo, municipio de Mapimí, Dgo.; donde se encontró una sola colonia en un área de 1 km<sup>2</sup> por el rumbo a una presa, la fecha de colecta fue el día 24 mayo de 1999.

Las plantas se encontraban en un proceso de marchitamiento por la extrema sequía que asolaba en los últimos dos años a la colecta, esto fue notable por que en la colonia muchas de ellas estaban muertas, en su mayoría las más jóvenes, otras tenían una tonalidad rojiza que toman cuando existe excesiva insolación y escasez de agua, las que se encontraban debajo de arbustos y en medio de piedras son las de mejor coloración verde.

La semilla se seleccionó utilizando con la prueba de flotación en agua, descartándose las semillas que flotaron, ya que representan semillas vanas o secas. Se seleccionaron 600 semillas y se colocaron en 200 ml de agua destilada con detergente, para eliminar los restos de tricomas y

suciedad que cubrían a las semillas dentro de las axilas de la planta.

Se colocaron en una malla de tela de 9 cm<sup>2</sup> amarradas para evitar el maltrato en la parrilla de agitación. Todos los enjuagues utilizados en las técnicas de desinfestación se realizaron con agua destilada estéril. En las primeras 7 técnicas se utilizaron en cada morralito 120 semillas, en la siguiente 120 semillas para la siembra de semillas y 160 para la siembra de embriones. Para el caso de la siembra de embriones se procede a realizar la técnica de eliminación de la testa.

El trabajo se dividió en dos etapas:

**Etapla I.** Se realizaron pruebas de desinfestación que consistió en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 8 x 2, se evaluaron 16 tratamientos de naturaleza factorial considerando a 8 tratamientos de desinfestación como Factor A y dos tipos de medio (OMS y 100%MS -1MS-) como Factor B, esto con el fin de evaluar la incidencia de patógenos en los diferentes medios, se tuvo como unidad experimental a una semilla sembrada en un frasco.

La exposición de las semillas con los reactivos fue a través de una parrilla de agitación, después de la utilización de cada reactivo se realizaron enjuagues con agua destilada estéril. Las técnicas de desinfestación utilizadas se muestran a continuación,

#### Técnica 1.

- Agua con jabón por 2 horas.
- En la campana de flujo laminar: 2 min con alcohol 70 %.
- 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 %.

#### Técnica 2.

- Agua con jabón por 2 horas.
- En la campana de flujo laminar: 2 min con alcohol 70 %.
- 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % + Tween 20 al 0.2 %.

#### Técnica 3.

- Agua con jabón por 2 horas.
- Solución de Captán PH 0.002 g litro<sup>-1</sup> por 20 min.
- En la campana de flujo laminar: 2 min con alcohol 70 %.
- 20 min en una solución de hipoclorito comercial al 20 % + Tween 20 al 0.2 %.

#### Técnica 4.

- Agua con jabón por 2 horas.
- Se agitan por 2 min en alcohol 70 %.
- Solución de Captán PH 0.002 g litro<sup>-1</sup> + Tween 20 al 0.3 % por 20 min.
- En la campana de flujo laminar: 2 min En alcohol 70 % por 5 min.
- 20 min. en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % + Tween 20 al 0.2 %.

#### Técnica 5.

- Agua con jabón por 2 horas.
- Se agitan por 5 min. en alcohol 70 %.
- Solución de Captán PH 0.002 g litro<sup>-1</sup> + Tween 20 al 1 % por 1 h.
- En la campana de flujo laminar: por 2 min. en alcohol 70 %
- 30 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % mas Tween 20 al 0.2 % en agitación.

#### Técnica 6.

- Agua con jabón por 2 horas.
- En la campana de flujo se limpia el hilium de la semilla con una aguja de disección.
- Solución de Captán PH 0.002 g litro<sup>-1</sup> + Tween 20 al 0.5 % por 30 min.
- En la campana de flujo laminar: 2 min en alcohol 70 %.
- 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % + Tween 20 al 0.2 %.

#### Técnica 7.

- Agua con jabón por 2 horas.
- En la campana de flujo laminar se limpia el funículo de la semilla con una aguja de disección.
- Solución de Captán PH 0.002 g litro<sup>-1</sup> + Tween 20 al 1 % por 2 h.
- En la campana de flujo: alcohol 70 % por 4 min.
- 30 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % + Tween 20 al 0.2 %.

#### Técnica 8.

- Agua con jabón por 2 horas en agitación.
- Se colocan en una solución de 1 g de Captán PH en 500 ml de agua con Tween 20 al 1 % por 6 h.
- En la campana de flujo laminar: alcohol 70 % por 5 min.
- 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 100 % mas Tween 20 al 1 % en agitación.

**Cuadro 1. Tratamientos utilizados con diferentes técnicas para el establecimiento del cultivo aséptico en dos medios de cultivo.**

Tratamiento	Factor A Técnica	Factor B Medios
T1	1	OMS y 1MS
T2	2	OMS y 1MS
T3	3	OMS y 1MS
T4	4	OMS y 1MS
T5	5	OMS y 1MS
T6	6	OMS y 1MS
T7	7	OMS y 1MS
T8	8	OMS y 1MS

Las pruebas de contaminación consistieron en evaluar el índice de contaminación de las semillas en los diferentes medios de cultivo, las evaluaciones se realizaron cada 24 h por diez días a las 12 p.m.

En estas las pruebas se obtuvo el análisis de varianza de incidencia de contaminación por hongos, bacterias y oxidación de la semilla y cuando resultó pertinente se utilizó el agrupamiento de medias Tukey.

**Etapa II.** Consistió en utilizar la técnica 8 de desinfección como condición única, teniendo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 2 x 5, se evaluaron 10 tratamientos de naturaleza factorial considerando dos tipos de siembras, de semilla y de embriones (estos se obtienen por la eliminación de la testa) como Factor A y cinco tipos de medio de cultivo con sales de MS-62 (0, 0.25, 0.5 y 100 %) y arena esterilizada como Factor B, se tuvo como unidad experimental a una semilla y a un embrión sembrado en un frasco.

**Cuadro 2. Tratamientos para evaluar el tipo siembra en cinco medios de cultivo.**

Tratamiento	Factor A Tipo de siembra	Factor B Medios
T9	Embrión y semilla	0 MS, 0.25 MS, 0.5 MS, 1 MS y arena

Las semillas se sembraron en los siguientes medios:

- Medio OMS.- Agar 0.6 % (6 g litro<sup>-1</sup>).
- Medio 1MS.- Agar 0.6 % (6 g litro<sup>-1</sup>) + 100% de la concentración del sales MS.

Los parámetros evaluados fueron:

- Índice de contaminación por hongos.
- Índice de contaminación por bacterias.
- Índice de oxidación.

Las pruebas de germinación consistieron en colocar las semillas y embriones en los siguientes medios para su germinación:

- Medio OMS. Agar 0.6 % (6 g litro<sup>-1</sup>).
- Medio 0.25MS. Agar 0.6 % + ¼ de concentración de sales MS.
- Medio 0.5MS. Agar 0.6 % + ½ de concentración del sales MS.
- Medio 1MS. Agar 0.6 % + 100% de concentración del sales MS.
- Medio Arena. Limpia esterilizada cribada en malla de 2 mm<sup>2</sup>

Las evaluaciones se realizaron cada 24 h durante 15 días a partir de la primer semilla o embrión germinado. Se consideró germinada cuando presentó una radícula de 2 mm de longitud.

Parámetro evaluado:

- Velocidad y porcentaje de germinación (valor germinativo).

Los datos que arrojaron los tratamientos fueron evaluados usando un análisis de varianza haciendo comparaciones del valor germinativo (VG).

Este valor es una medida de la calidad de germinación como resultado de combinar y ponderar la capacidad germinativa (% final de germinación), velocidad germinativa (tiempo transcurrido desde la siembra hasta un punto arbitrario sobre la curva de germinación) y uniformidad germinativa (magnitud de las diferencias de tiempo de germinación de las semillas individuales de una muestra).

Se obtuvo un solo valor numérico, de acuerdo a la suma acumuladas de los cocientes obtenidos de dividir el porcentaje de germinación sencillo alcanzado en cada conteo, entre los días transcurridos desde la siembra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$VG = C * Gi/Di$$

Donde :

C = Constante de transformación porcentual, se calcula mediante la fórmula:

$C = 100 / \text{No. de semillas utilizadas como tamaño de muestra por repetición.}$

G = Semillas germinadas en la evaluación el día que indica el subíndice *i*.

D = Días transcurridos desde la siembra hasta el día evaluado que indica el subíndice *i*.

Para detectar diferencias entre las medias, se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.01$  (Camacho y Morales, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Pruebas de desinfección

En esta prueba se aprecia que el factor técnica fue altamente significativo con respecto a los otros factores en cuanto a las variables estudiadas; se observa, dentro de las técnicas que la significancia de los cuadrados medios de la presencia de hongos está influenciada mayormente por el tipo de técnica utilizada, las otras variables, esto confirma que dependiendo de la técnica de desinfección utilizada será el grado de incidencia de hongos que se tengan en las semillas. (Cuadro 3 y 4)

**Cuadro 3. Cuadros medios y significancia estadística en el análisis de varianza para las variables incidencia de hongos (H), bacterias (B), oxidación (O) y plántulas (P), en pruebas de desinfección**

Factor	G.L.	Cuadros		Medios	
		H	B	O	P
Técnica	7	5.01**	1.04**	1.84**	0.07**
Medio	1	0.14NS	0.14NS	0.03NS	0.03NS
Téc*Med	7	0.14NS	0.29NS	0.01NS	0.01NS
Error	432	0.10	0.16	0.06	0.01

**Cuadro 4. Pruebas Tukey ( $\alpha = 0.01$ ) del factor técnica para la incidencia de hongos (H), bacterias (B), oxidación (O) y plántulas (P).**

H Técnica	B Técnica	O Técnica	P Técnica
1 a	7 a	7 a	8 a
4 a	1 ab	6 b	1 b
3 a	6 abc	5 b	4 b
2 a	8 abc	8 b	3 b
5 ab	2 bc	1 b	5 b
6 bc	4 bc	2 b	2 b
7 c	5 bc	3 b	7 b
8 d	3 c	4 b	6 b

La prueba Tukey muestra cuál de las ocho diferentes técnicas fue significativa para las diferentes variables estudiadas, se observa con respecto a la incidencia de hongos que la técnica 8 la agrupa sola por presentar medias muy inferiores al resto, la mejor técnica para la eliminación de bacterias fue la 3 y para baja incidencia de oxidación las mejores técnicas son la 2, 3, 4, 5, 6 y 7, pero para poder inducir el desarrollo de plántulas solo la técnica 8 es la idónea. Esto se relaciona con la incidencia de hongos, a menor incidencia de hongos hay más posibilidades de que germine una plántula. Al iniciarse la presencia de hongos llega a matar a la semilla evitando su germinación.

### Pruebas de germinación

En estas pruebas se observa que la presencia de hongos, bacterias, plántulas y el valor germinativo de las mismas esta influenciada significativamente por el tipo de siembra. No se realizó el análisis para la variable oxidación ya que no se detectó su presencia (Cuadro 5 y 6).

**Cuadro 5. Cuadros medios y significancia estadística en el análisis de varianza para las variables incidencia de hongos (H), bacterias (B), plántulas (P) y valor germinativo (VG) en las pruebas de germinación.**

Factor	G.L.	Cuadros Medios			
		H	B	P	VG
Siembra	1	0.45**	0.31**	42.21**	16391.28**
Medio	4	0.15NS	0.03NS	0.029NS	72.88NS
Téc*Med	4	0.10NS	0.03NS	0.050NS	75.96NS
Error	253	0.08	0.03	0.084	50.19

**Cuadro 6. Media (Med.) y Desviación Estándar (D.S) para la incidencia de plántulas (P), proliferación por hongos (H) y bacterias (B).**

Tipo de siembra	Obs	P		H		B	
		Med.	D. S.	Med.	D. S.	Med.	D. S.
Embriones	123	0.894	0.308	0.048	0.216	0.000	0.000
Semillas	140	0.078	0.270	0.128	0.335	0.071	0.258

El Cuadro 6 muestra para el caso de presencia de plántulas la siembra por embriones presenta medias más altas respecto a las semillas, y viceversa, para la presencia de hongos y bacterias es donde se obtuvieron medias mas bajas, y es de esperarse, por que la testa es fuente de acumulación de contaminantes, y al eliminarse, los índices de contaminación bajan considerablemente.

**Cuadro 7. Medias de Mínimos Cuadrados del Valor Germinativo.**

Tipo de siembra	Medias
Embriones	16.950
Semillas	0.6335

Existe una gran diferencia entre las medias, que indican un alto valor germinativo para las plántulas germinadas a partir de embriones.

### Contaminación

Se han desarrollado diferentes técnicas para la desinfestación de semilla de cactáceas que se pueden considerar estándares, sin embargo las técnicas descritas (Elías, 1997; Martín Del Campo, 1997 y Ojeda, 1993) no se adaptaron a las necesidades requeridas para la desinfestación de las semillas de la especie estudiada, por ello se optó por realizar una modificación a la técnica descrita por Villavicencio (1998), y modificar la concentración de hipoclorito de sodio del 20 % al 100 %.

Los resultados del análisis de varianza demuestran que a mayor concentración de hipoclorito de sodio menor es el índice de contaminación por hongos y bacterias, más no por la incidencia de oxidación.

No fue significativa la presencia de contaminantes con respecto a los diferentes medios de cultivo y la arena utilizados, se esperaba que en los medios en donde la concentración de sales y nutrientes fuera mayor, hubiera mayor contaminación.

### Germinación

El alto valor significativo obtenido en el análisis de varianzas de las variables contaminantes con respecto a los factores tipo de siembra se debe precisamente a la presencia de testa, aún teniendo altas concentraciones de hipoclorito de sodio existe presencia de los agentes en el medio, y es que la estructura externa de las semillas es tan verrucosa, que es una fuente de hospedaje para dichos contaminantes.

En las técnicas 6 y 7 se describe un proceso de limpieza del funículo de la semilla, se observó que es una estructura que alberga patógenos que originan la contaminación, por ello se optó por su limpieza, pero no se tuvieron resultados favorables por lo complicado de esta

operación, por lo que se decidió por eliminar toda la testa para dicho fin, así se eliminó casi en la totalidad la contaminación detectada en los anteriores tratamientos

Este suceso propició un proceso de escarificación a la semilla, y eso lo demuestran los datos del análisis de varianza, los cuales indican una germinación cercana al 90 por ciento de los embriones, mientras que de las semillas solo el 7 por ciento.

Los análisis de varianzas utilizados en la presencia de contaminantes muestran no significancia entre los diferentes medios de cultivo, mas bien por los dos tipos de siembra, la de semillas y embriones.

No se tienen datos del periodo en que una semilla de esta especie germine, solo se cuenta con información que en semillas de otras especies como *A. retusus* que germina de 11 a 40 días, *A. agavoides* de 10 a 23 días (Raya y Nava, 1997); *Mammillaria candida* de 6 a los 21 días (Elías, 1997), y *Astrophytum myriostigma* de 5 a 6 días (Martín Del Campo, 1997).

El tiempo de germinación en semillas de esta especie fue a partir del día 11 de la germinación y hasta el día 21 solo habían germinado el 9.8 % del total. Sin embargo, la germinación de embriones empezó a partir del segundo día después de la siembra y para el día 21 había germinado el 94 % del total.

Los resultados presentados en este trabajo indican que es posible generar plántulas de especies en peligro de extinción a través de la metodología descrita utilizando técnicas de cultivos *in vitro*.

### CONCLUSIONES

La mejor técnica de desinfección consiste en mantener la semilla en agitación por 2 h en agua con jabón, 6 h en captan (2g/l), 4 min. En alcohol 70%, 20 min. en hipoclorito de sodio 100%.

La técnica de desinfección anterior es efectiva solo si se elimina la cubierta o testa de la semilla, prosperando en cualquier medio de cultivo ensayado e incluso en arena lavada y desinfectada.

## LITERATURA CITADA

- BRAVO-HOLLIS, H.** 1997. Suculentas mexicanas, Cactáceas. CONABIO, UNAM y SEMARNAP. CVS publicaciones. México.
- BRAVO-HOLLIS, H. y SÁNCHEZ-MEJORADA.** 1991. Las Cactáceas de México. Tomo II. Universidad Autónoma de México. México. 252-263 p.
- CAMACHO M., F. y G. MORALES V.** 1987. Anexo I Formato y recomendaciones para evaluar germinación, p. 157-170. *In: Dormición de semillas: Aspectos generales y tratamientos para eliminarla.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.
- ELÍAS R., M.** 1997. Propagación de *Mammillaria candida* (Cactaceae) por técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Tesis de Licenciatura. UASLP. San Luis Potosí. México.
- FRANCO M., S.** 1997. Legislación y conservación, pp. 101-112. *In: Suculentas mexicanas, Cactáceas.* CONABIO, UNAM y SEMARNAP. CVS publicaciones. México, D.F.
- LÓPEZ P., C.** 1985. Fundamentos teóricos - Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales: Medios de cultivo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- MARTÍN DEL C., M. J.** 1997. Propagación de *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae) mediante el cultivo de tejidos vegetales. Tesis de Licenciatura. UASLP. San Luis Potosí, México.
- NESSMANN, J. D.** 1994. Plantas crasas y cactus. Edit. Susaeta. España.
- OCHOA, A. N.** 1985. Cultivo de embriones y óvulos, p. 115-121. *In: Fundamentos teóricos - Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales: Colegio de Postgraduados.* Montecillo, Texcoco. México.
- OJEDA Z., M. DEL C.** 1993. Técnicas de desinfección y micropropagación de *Astrophytum capricorne* (Dietrich). Tesis de Licenciatura. Facultad de Agricultura. UANL. N. L. México.
- RAYA, G. G. y NAVA-CEDILLO, A.** 1997. Obtención de brotes in vitro de dos especies de cactáceas del género *Ariocarpus*: *A. agavoides* y *A. retusus*. CIGA – ITA 20. Ags., México.
- SÁNCHEZ, M. E.** 1991. Retos y oportunidades en la comercialización de cactáceas mexicanas: reflexiones para la acción. Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro – COCYTEQ. Qro., México.
- VILLAVICENCIO, G. E.** 1998. Cultivo *in vitro* de dos especies de cactáceas (*Astrophytum myriostigma* Lem. y *Astrophytum capricorne* (Dietr.) Britton y Rose) amenazadas de extinción. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.

