Germinación *in vitro* de *Mammillaria sartorii* J. A. Purpus e inducción a brotes de vitroplántulas

B. López-Isabel[1], A.I. Suárez-Guerrero[1], R.V. Ortega-Ortiz[1], J.A. García-Pérez[1], B. L. Náder-García[1]*

[1]Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C.P.91090, Xalapa, Veracruz, México

napz_bet@hotmail.com

***Área de Participación**: Ingeniería Química*

Resumen

Se germinaron semillas de *Mammillaria sartorii* en medio de cultivo Murashige y Skoog [1962] (MS) con 30g/L de sacarosa y 4.5g/L de fitagel como solidificante, libre de reguladores de crecimiento. Se obtuvo un 96.62% de germinación total, de modo que la técnica de desinfestación fue satisfactoria. El enraizamiento de las plántulas fue espontáneamente a los 8 días después de la germinación. Las semillas de *M. sartorii* resultaron ser fotoblásticas positivas. La inducción a brotes resultó positiva para la primera etapa, usando medio MS + 1.5mg/L de BAP y 0.5mg/L de AIA. Posteriormente, la realización de cortes a las plántulas mostró que el corte longitudinal fue exitoso para la inducción callo usando medio MS adicionado con 1.5mg/L de BAP, 0.5mg/L de AIA y 1.0mg/L de AS. Se necesitan 5 semanas promedio obtener un individuo completo de *M. sartorii* a partir de la individualización de un brote en medio MS basal.

***Palabras clave:** Germinación, callogénesis, reguladores de crecimiento.*

Abstract

Seeds of Mammillaria sartorii were germinated on Murashige & Skoog [1962] (MS) culture media with 30g/L sucrose and 4.5g/L fitagel as a solidifying, free of growth regulators. We obtained 96.62% of total germination. In that germination did not show any contamination, because the technique used for disinfestation of the seed proved to be satisfactory. The rooting of the seedlings was spontaneously 8 days after germination. The seeds of M. sartorii proved positive photoblastic. Seedlings were induced to form shoots, positive results for the first stage using MS medium supplemented 1.5mg/L BAP plus 0.5mg/L IAA. Subsequently, there were two types of cuts to the seedlings out to be slitting the propitious to induce the formation of a greater number of shoots when placed on MS basal medium and found to placing the explant longitudinal on MS medium supplemented with 1.5mg/L BAP, 0.5mg/L IAA and 1mg/L of AS. This produces callus. It only takes 5 average weeks obtain a complete individual of M. sartorii from the individualization of an outbreak in basal MS médium.

***Key words:** Germination, callogenesis, growth of regulators.*

Introducción

Mammillaria sartorii es una cactácea endémica de México, que posee flores muy llamativas por lo que es muy demandada y sus poblaciones naturales están en riesgo. Las especies de la familia *Cactaceae* son de lento crecimiento y germinación escasa, y, aunque tradicionalmente han sido propagados a partir de semillas o cortes, estos suelen ser susceptibles a pudriciones por lo que el cultivo *in vitro* es una herramienta alternativa para su propagación [Ojeda y col. 2008]. A partir de las plántulas producidas de la germinación de semillas *in vitro*, la desdiferenciación de células u órganos puede ayudar a la propagación masiva de esta especie si se cuenta con sólo unas cuantas semillas. A partir de la generación de callo en las vitroplantas, se pueden producir múltiples brotes que generarán nuevos individuos con características genéticas y fenotípicas similares y deseadas. No obstante que se domina la técnica de cultivo de tejidos vegetales, se ha observado que la tasa de multiplicación y el rendimiento de las plantas varían con la especie, por lo que se requieren de ensayos particulares para desarrollar una técnica de cultivo específica [Andrade-Rodríguez y col. 2015]. La propagación *in vitro* usa hormonas como las citocininas y las auxinas cuyo equilibrio induce callo, mientras que una alta proporción de citocininas inducirá brote y una baja proporción inducirá la formación de raíces adventicias. Varios estudios con cactáceas han utilizado alguna, o una combinación de este tipo de hormonas. Por ejemplo, se han utilizado simultáneamente la citocicinina sintética Bencilamina purina (BAP) y la auxina Ácido naftalen acético (ANA) para la inducción de brotes a partir de vitroplantas, usando concentraciones de 0.1mg/L y 0.01mg/L; 1.0mg/L y 0.1mg/L; o 2.5mg/L y 1.0mg/L respectivamente [Loeza, 2002; Ordoñez, 2003; Papafotiou y col. 2003; Seemann y col. 2007; Ángeles, 2008; Azcona, 2009]. En cambio, para la elongación de brotes, estos mismos reguladores se han usado concentraciones de 1mg/L, 0.5mg/L y 1.5mg/L

rec 06/ago/2019, acc. 13/sep /2019

respectivamente [Ángeles, 2008; Azcona, 2009]. Aíra y col. [2006], usando solamente BAP, lograron la inducción de brotes con 22.2µM, con un enraizamiento espontáneo a los ocho meses de cultivo. Otros estudios indujeron brotes usando la combinación de Bencil adenina (BA) y Ácido indolacético (AIA) (citoquinina y auxinas naturales respectivamente) a concentraciones de 2mg/L y 0.5mg/L respectivamente [Chablé y col. 2007] pero en otro estudio, esta misma combinación sólo produjo callo, y los brotes se produjeron sin el uso de reguladores [García y Malda, 2009]. En cambio, Garnica y col. [2012] obtuvo brotes usando sólo 2mg/L de Bencil adenina (BA). Asimismo, la formación de brotes se ha obtenido con concentraciones de 10µM y 2mg/L de la citocinina sintética cinetina (Kin) [Santos y col. 2001; Azcorra y col. 2007], o a través de precursores de la biosíntesis de citoquininas, tales como la Adenina sulfatada (AS) [Salazar, 2001]. Otros estudios usaron una combinación de auxinas como el Ácido indolbutírico (AIB) y AIA (precursor de este último) para producir gran cantidad de callo; y a bajas concentraciones de AB se inhibió la producción de tallos en comparación con un medio libre de hormonas [García y Malda, 2010]. También, Manzo [2010], utilizó 2mg/L de Dimetil alil aminopurina (2iP) para inducir 56.5% de enraizamiento. Finalmente, Rojas [2008] usó Ácido Giberélico (G3) para incrementar la masa celular de especies del género *Mammillaria spp* y determinó que sus semillas son fotoblásticas positivas. Estos estudios se lograron proporciones de germinación entre el 13% y 93% en medio Murashige y Skoog [1962] (MS) y comprendieron especies del género *Mammillaria, Opuntia, Notocactus, Echinocactus, Astrophytum, Rhipsalidopsis, Copiapoa hypogeae* y *Hylocereus*. Basados en esta información, el objetivo de esta investigación fue optimizar un protocolo eficiente para la obtención de vitroplántulas de *M. sartorii* con fines de conservación, repoblación o comercialización.

Materiales y Métodos

Obtención y determinación del material biológico

Los explantes utilizados fueron semillas obtenidas de frutos maduros de tres ejemplares de *Mammillaria sartorii.*, colectados en junio del 2010 en el Municipio de Tenampa, estado de Veracruz a 400 metros de altitud. Estos fueron trasladados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Biología y allí se sembraron en macetas con sustrato de tierra negra y tepecil (1:1) para su identificación y como plantas “stock”. La identificación se llevó a cabo en el Herbario “XALU” de la misma facultad donde quedó registrada con el número 14068.

Tratamiento de limpieza del explante

Aproximadamente 100 semillas, obtenidas de dos frutos de las plantas stock fueron sometidas a un proceso de desinfestación. En una bolsita de organza las semillas fueron lavadas con jabón líquido (Axión®) y enjuagadas con agua corriente, para posteriormente, sumergirlas en una solución de Agrimicin® 3g/L y Tween 20 durante media hora en agitación constante. Posteriormente, los explantes fueron llevados a la campana de flujo laminar donde se realizaron dos enjuagues de 2 minutos cada uno con agua estéril y en agitación constante. Los explantes fueron depositados en una solución de cloro (Cloralex®) al 50% con Tween 20 y Microdyn® manteniéndose en agitación constante por 10 minutos y, al final, se realizaron 4 enjuagues con agua estéril de 4 minutos cada uno en agitación constante.

Siembra de semillas de *M. sartorii*

Para la germinación *in vitro* se realizaron dos siembras en las cuales se utilizó el medio basal MS suplementado con 30g/L de sacarosa y 4.5g/L de fitagel como solidificante. El pH del medio fue ajustado a 5.70 ± 0.1 adicionando gotas de NaOH 1N y HCl 1N.

Primera siembra

Para la primera siembra se utilizó un lote de 40 semillas que fueron sembradas en frascos Gerber® con 20mL de medio de cultivo, a razón de una semilla por frasco, y sometidas a dos tratamientos: luz y oscuridad. Cada tratamiento tuvo 20 réplicas y fueron mantenidos durante un primer mes, para posteriormente colocar ambos tratamientos bajo condiciones de luz contante. Los frascos fueron mantenidos en cámara de incubación a temperatura de 26 ± 2ºC y humedad relativa de 80- 90%.

Segunda siembra

Para esta siembra se utilizó un lote de 100 semillas que se sometieron a condiciones de luz constante y cada frasco contuvo ahora cinco semillas para un total de 20 réplicas. Después de 17 semanas de cultivo, el lote de plántulas de esta siembra, se trasladó a la campana de flujo laminar y allí, en completa asepsia, fue subcultivado en medio MS. Los frascos sellados fueron trasladados a la cámara de incubación bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente.

Inducción a elongación de las plántulas de la primera siembra
Las plantas producidas en la primera siembra fueron utilizadas en este ensayo. Se prepararon 10 frascos con 2 plántulas cada uno, adicionados con 0.5mg/L de AIA en medio MS, más tres frascos control sin reguladores. A 22 semanas de la siembra, y bajo la campana de flujo laminar, las vitroplántulas fueron subcultivadas colocando una vitroplanta por frasco y transferidas al cuarto de incubación a 26 ± 2ºC de temperatura, 80-90% de humedad, bajo luz blanca continúa. Posteriormente, a intervalos de dos meses, dos sub-cultivos fueron realizados a partir de la séptima semana posterior a la inducción.

Inducción a brotes a partir de vitroplántulas
Después de 12 semanas de incubación, las 15 plántulas más grandes de cada lote de la primera siembra, fueron seleccionadas y llevadas a la campana de flujo laminar. Allí, un corte longitudinal fue realizado a cada plántula y cada nuevo explante (cada mitad de la plántula) se colocó en un frasco Gerber®, con 20ml de medio MS. El lote de plántulas fue sometido a un barrido hormonal con BAP a concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0mg/L, combinadas con 0.5mg/L de AIA con 10 réplicas por cada uno de los tres tratamientos más cinco frascos de un grupo control. Una vez inoculados los frascos con los explantes fueron trasladados a la cámara de incubación.

De la primera inducción, 11 frascos fueron seleccionados de acuerdo con los mayores explantes, y estos fueron subcultivados en medio MS fresco suplementado con 1mg/L de BAP, 0.5mg/L de AIA y 1mg/L AS; además se prepararon 5 frascos control que contuvieron únicamente medio MS basal. A cada explante de este subcultivo, se les realizó dos tipos de cortes, uno transversal y otro longitudinal; de manera que, de cada explante, tres nuevos explantes fueron obtenidos. Para subcultivar estos nuevos explantes, la concentración de BAP (1.5mg/L) con mejor resultado en la formación de brotes en el barrido hormonal anterior, fue utilizada**.** Todos estos nuevos explantes fueron transferidos a la cámara de incubación bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad señaladas anteriormente.

Individualización de brotes
5 brotes provenientes del subcultivo a 1.5mg/L de BAP de la primera inducción y de cinco semanas de edad, fueron elegidos al azar, separados bajo la campana de flujo laminar mediante un corte basal. Estos fueron subcultivados en medio MS basal fresco con la finalidad de estimar el tiempo promedio para la regeneración de un individuo completo de *M. sartorii in vitro,* sin la aplicación de reguladores de crecimiento. Subsecuentemente las siembras se trasladaron a la cámara de incubación bajo las condiciones ya indicadas.

Análisis estadístico
Para obtener el porcentaje de germinación de ambas siembras, se empleó la fórmula propuesta por Arriaga y col. 1994. La cuantificación del crecimiento promedio de vitroplántulas de *M. sartorii,* de la primera siembra se hizo un análisis de varianza con dos factores, el tratamiento y el tiempo, mientras que para la segunda siembra sólo se empleó un análisis de varianza de un factor.

Para la Inducción a elongación, también se aplicó un análisis de varianza con dos factores, regulador y tiempo a los dos subcultivos. Para los brotes se construyó una tabla de contingencia de dos entradas y se analizó mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Resultados y discusión

Desinfestación del explante
La técnica de desinfestación de las semillas se mostró exitosa al no presentarse problemas de contaminación.

Germinación de semillas de *Mammillaria sartorii*
La germinación en luz inicio entre los 7-12 días posteriores a su siembra; mientras que en oscuridad inició hasta los 37 días. El análisis de varianza mostró un efecto significativo de la interacción del tratamiento con el tiempo en el crecimiento de las plántulas ($F=18.2$, $P=0.002$) indicando un mayor crecimiento semanal en el tratamiento luz, sin embargo, a los cinco meses la longitud de las plantas de ambos tratamientos fue similar con aproximadamente 3.5mm de longitud en cada uno (figura 1).

En la primera siembra se obtuvo un 97.61% de germinación, donde sólo una semilla de uno de los tratamientos no germinó. En la segunda siembra, se obtuvo un 96.22% de germinación; y las plántulas alcanzaron en 19 semanas un crecimiento promedio de 2.8mm; lo cual ratifica al medio MS basal como apropiado para la germinación de semillas de *M. sartorii*; además, éstos resultados coinciden con los

obtenidos por Ordoñez [2003], y García y Malda [2009], quienes trabajaron con el mismo género de cactáceas y reportaron un 91% de germinación en el medio MS libre de reguladores de crecimiento. Por su parte, Salazar [2001], obtuvo un índice de germinación bajo (66.6%) con semillas de *Mammillaria eriacantha*.

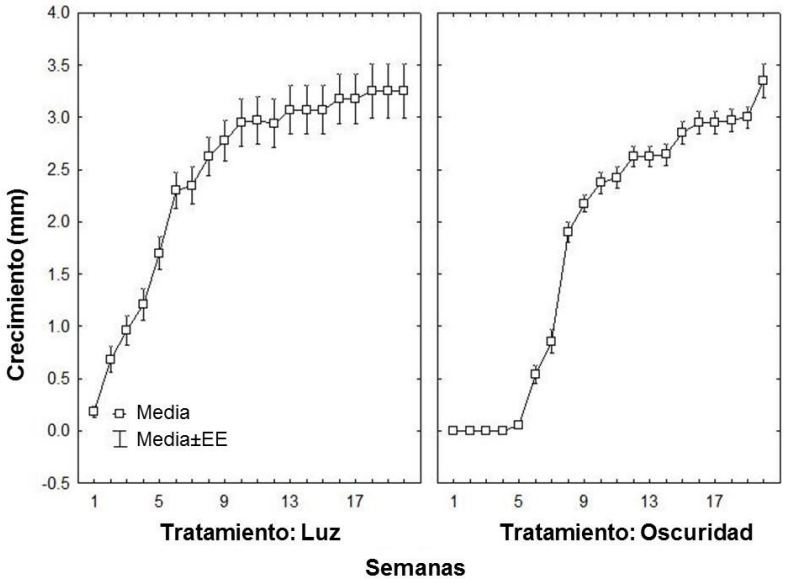


Figura 1. Crecimiento de plántulas de la primera siembra en dos tratamientos: luz y oscuridad.

El subcultivo de las plántulas en medio MS basal resultó satisfactorio ya que las plántulas mostraron un incremento significativo en su crecimiento en un tiempo de tres meses ($F = 46.009$, $p < 0.001$). Con respecto a las características morfológicas de las vitroplántulas, tanto en la primera como en la segunda siembra; estas presentaron un color verde oscuro, forma cilíndrica con presencia de espinas en la parte superior. La radícula en las plántulas de *M. sartorii* se desarrolló en un periodo de ocho días sin necesidad de reguladores de crecimiento, mientras que Salazar [2001] requirió de suplementar el medio de cultivo con AS para la formación de las mismas en un periodo de 15 días.

Por otra parte, las semillas de *M. sartorii* en este estudio, germinaron solo en presencia de luz, lo cual coincide con lo establecido por Rojas [2008], al concluir que las semillas de este género de cactáceas suelen ser fotoblásticas positivas.

Inducción a elongación de las plántulas de la primera siembra

El crecimiento de plántulas de la primera siembra mostró que aquellas colocadas en el medio con 0.5mg/L de AIA mantuvo una tendencia ascendente en el tiempo, mientras que aquellas colocaron en medio MS basal, alcanzaron una asíntota a la cuarta semana de cultivo. Esto se evidenció en que la interacción del tratamiento con el tiempo no fue significativa (F=0.7031, *p*=0.6476); en cambio, si hubo un efecto del tiempo (F=24.9, P<0.001).

En el repique de estas plántulas con AS, tampoco se hubo una diferencia significativa en el crecimiento de las plántulas con el control (*p=0.876*) (Datos no mostrados).

Inducción a brotes a partir de vitroplántulas

La figura 2 muestra que el mayor número de brotes se *M. sartorii* se produjeron en los tratamientos con 1.5mg/L de BAP (7 brotes) y 2.0mg/L de BAP (4 brotes), aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos en el número de brotes al final del experimento (KW=5.326, gl=3, valor p=0.149); mientras que Garcia y Malda [2009] no requirieron de reguladores de crecimiento para la producción de brotes. La formación de raíces en este estudio, se obtuvo a partir de las cuatro semanas de la individualización, mientras que Aíra y col. [2006] las obtuvieron hasta los ocho meses a partir de plántulas de *Notocactus magnificus*.

De la segunda inducción en la cual comparamos dos tipos de corte del explante, se reporta una producción de brotes y a pesar de que no se buscaba, se reportó la presencia de callo.

El explante de corte longitudinal colocado en medio MS basal (control) produce más brotes en contraste con

aquellos explantes colocados en el medio suplementado con reguladores de crecimiento (figura 3), de forma similar a como lo reportaron Chablé y col. [2007]. En contraparte, Ordoñez [2003] obtuvo una gran cantidad de brotes a partir de cortes transversales realizados a *Mammmillaria voburnensis* Scheer.

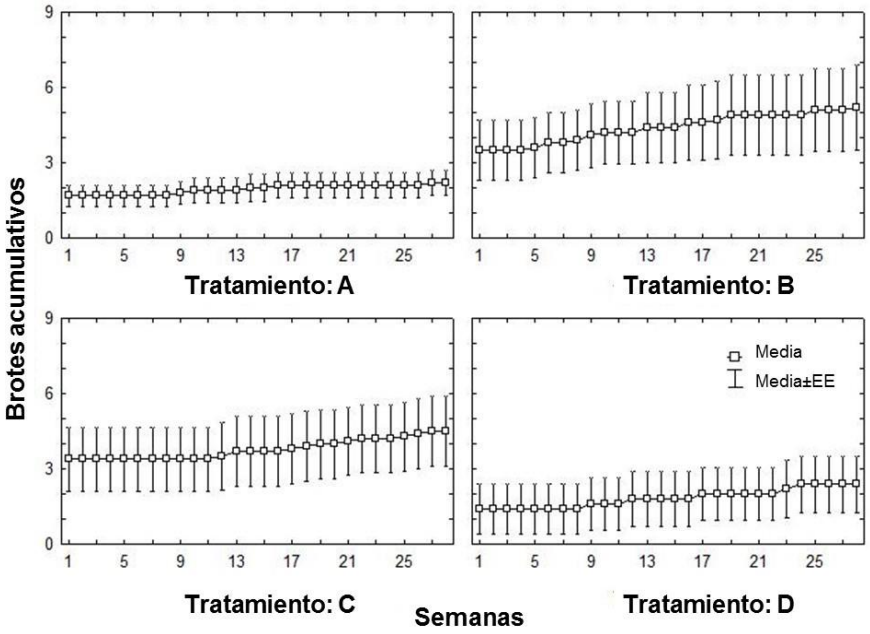


Figura 2. Primera inducción de brotes. Tratamientos: A (MS + 1mg/L BAP + 0.5mg/L AIA), B (MS + 1.5mg/L BAP + 0.5mg/L AIA), C (MS + 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L AIA) y D (MS basal-control).

La mayoría de los brotes obtenidos muestran un estado saludable (buen color y forma compacta), aunque, en algunos se visualiza un bajo grado de hidratación (10% brotes). Contrario al caso anterior, se observó que la presencia de AIA induce al corte longitudinal a la formación de callo.

El callo obtenido es morfológicamente friable y de color verde limón. Por su parte, para ambos casos tanto en la producción de callo como en la de brotes, el corte transversal no fue muy productivo, a pesar de ello, se notó que algunos de estos explantes (20%) formaron raíces y se regeneraron formando un individuo completo (espinas y raíz con color verde oscuro) de *M. sartorii* en un promedio de 6 semanas. En este método se registró un 50% de oxidación.

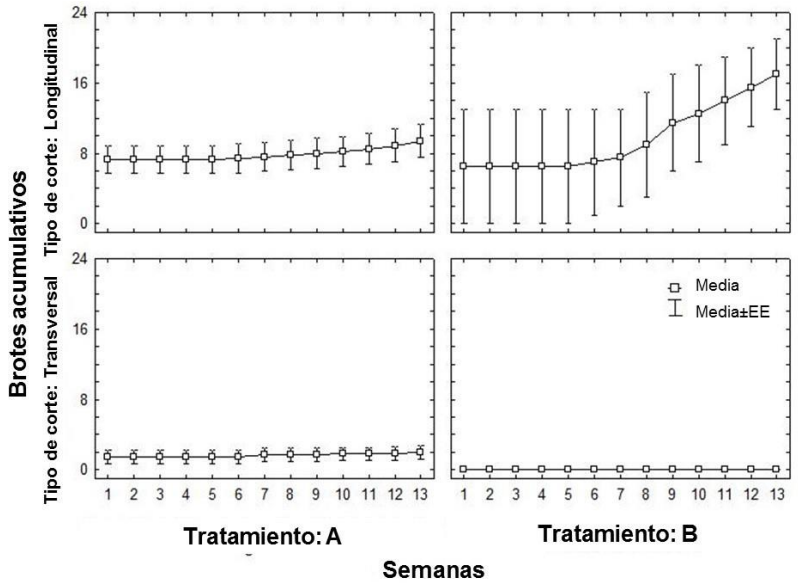


Figura 3. Comparación de la producción de brotes por tratamiento A: MS + 1mg/L AS + 1.5mg/L BAP + 0.5mg/L AIA; B: MS basal-control y tipo de corte.

Individualización de brotes
Los brotes que se individualizaron fueron capaces de regenerar una plántula completa que registró un crecimiento ascendente a partir de su siembra, obteniendo una elongación de 4.5cm de longitud en tan sólo 3 meses después de su separación en medio MS, y mostrando morfológicamente características de un estado saludable. La presencia de la raíz se notó a los 30 días posteriores a su repique. El desarrollo completo de un individuo se logró en promedio, a las cinco semanas aproximadamente.

Trabajo a futuro
Dar seguimiento a las plántulas individualizadas de *M. sartorii* y llevarlas a campo para la reintegración a su medio natural; cuantificar los factores que propicien y/u obstaculicen su adaptación, diseñar la metodología apropiada para una sobrevivencia exitosa de dichos organismos generados *in vitro*.

Conclusión
La técnica de desinfestación de semillas resultó efectiva, pues no se presentaron problemas de contaminación de semillas durante el estudio. Se obtuvo un alto porcentaje de germinación *in vitro* (96.62%), por lo cual, se concluye que el medio MS basal con 30g/L de sacarosa, es suficiente para germinar semillas de *Mammillaria sartorii*, sin la necesidad de agregar reguladores de crecimiento y que las plántulas obtenidas de la germinación presentaron condiciones saludables.

Las semillas expuestas a luz blanca constante germinaron más rápido y las plántulas presentaron un crecimiento más acelerado, que aquellas que germinaron bajo oscuridad por un pequeño periodo. De modo que concluimos que las semillas son fotoblásticas positivas. El almacenamiento de semillas de *M. sartorii* por un periodo largo, acortó el periodo de germinación respecto de aquellas que se sembraron inmediatamente después de ser obtenidas del fruto. La aplicación de AIA y AS no produjo diferencias en el crecimiento de las plántulas, en cambio, la renovación del medio de cultivo produjo un incremento en el crecimiento de las plántulas, por tanto, se concluye que el renovar el medio MS estimula el crecimiento de las mismas sin necesidad de adicionar algún regulador de crecimiento. Se recomienda realizar cortes longitudinales a las plántulas de *M. sartorii*, tanto para la obtención de brotes como de callo. La utilización de medio MS basal resulto ser suficiente para una mayor producción de brotes; mientras que la adición de 1.5mg/L de AIA al medio MS promovió el desarrollo de callo. Se puede obtener una plántula completa (con espinas y raíz) de *Mammillaria sartorii*, a partir de un brote, empleando medio MS basal, en tan sólo 5 semanas promedio.

Referencias
1. Aíra De Medeiros, L., Salvador De Ribeiro, R. C., Gallo, L.A., Tiago De Oliveira, E. y Soares, M. E. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:165–169.
2. Andrade-Rodríguez, M., Vargas-Araujo, J., Villegas-Torres, O. G., López-Martínez, V., Guillen-Sánchez, D. Y Alia-Tejacal, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de cattleya (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro. Interciencia* 40 (8): 549-553.
3. Ángeles, T. (2008). *Mammillaria pectinifera* W. y *Coryphantha greenwoodii* B. especies en peligro de extinción. Su cultivo *in vitro* como alternativa de rescate. Tesis de Licenciatura en Biología. U.V. Facultad de Biología. Xalapa.
4. Arriaga, V., Cervantes, V. y Vargas–Mena, A. (1994). Manual de reforestación con especies nativas: colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas. Instituto Nacional de Ecología UNAM. México.
5. Azcona, C. A. (2009). Organogénesis directa de *Melocactus curvispinus* subsp. *dawsonii* (BRAVO) N. P. TAYLOR, 1991 a partir de explantes de tallo, y germinación *in vitro* de *Mammillaria haageana* subsp. elegans D. R. HUNT, 1997. Tesis de Licenciatura en Biología. U.V. Facultad de Biología. Xalapa.
6. Azcorra, G., Sánchez, L. A., Villanueva, E. y C. Fuentes. (2007). Organogénesis indirecta y regeneración de plantas de *Mammillaria gaumeri* Britton et Rose (Cactaceae). XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
7. Chablé, F., Alvarado, E., Romero, J. A., Rangel, J. A., Morán, N., Covarrubias, J. y Ramírez, J. G. (2007). Regeneración *in vitro* de *Echinocactus grusonii* HILDMANN. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
8. García, O. R. y Malda, G. B. (2009). Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la Ciudad de Querétaro. *CIENCIA@UAQ* 2 (1): 3- 16.
9. García, O. R. y Malda, G. B. (2010). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria*

mathildae (*Cactaceae*) to its natural habitat. *HortScience* 45 (6): 934-938.
10. Garnica, R. L. y Pérez, E. (2010). Cultivo y propagación *in vitro* de Cactáceas, Agaváceas, Nolináceas y especies Forestales. Depto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
11. Loeza, J. M. C. (2002). Micropropagación *in vitro* de *Hylocereus undatus* (Cactaceae). Tesis profesional. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D.F.
12. Manzo, S. M. R. (2010). Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. Coahuilensis (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillos, Texcoco, Edo. de México.
13. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biassays with tabacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
14. Nelson, D. C., Riseborough, J. A., Flematti, G. R., Stevens, J., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W. y Smith, S. M. (2009). Karrikins discovered in smoke trigger *Arabidopsis* seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant Physiology* 149: 863–873.
15. Ojeda, M. C., Rodríguez, H., Gutiérrez, A. y Iracheta, L. (2008). Micropropagación de Cactáceas. VII Simposium - Taller “Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México”.
16. Ordónez, M. A. (2003). Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Sheer. (Cactaceae). Informe de Tesis. Guatemala.
17. Papafotiou, M., Balotis, G., Louka, P. y Chronopoulos, J. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 6: 163-167.
18. Ramírez-Tobías H. M., Peña-Valdivia C. B., Trejo C., Aguirre J. R. y Vaquera H. (2014). Seed germination of *Agave* species as influenced by substrate water potential. *Biological Research* 47 (11): 1-9.
19. Salazar, R. (2001). Propagación *in vitro* y establecimiento en suelo de *Mammillaria eriacantha* Link& Otto (Cactaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. U.V. Facultad de Biología. Xalapa.
20. Santos, M. S., Del Campo, J. M., Arredondo, A. y Santos, M. L. (2001). Effect of medium, kinetin and osmotic agents on the *in vitro* morphogenetic response of *Astrophytum myriostigma* (Cactaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana* 24 (2): 133-138.
21. Seemann, P., Rodríguez, C. y Jara, G. (2007). *In vitro* culture of Cactaceae with *ex situ* conservation purposes. *Agro Sur* 35 (2): 24-26.
22. Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, J. E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M. E., García-Magaña, J. J., Salgado-Garciglia, R. y Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica* 38: 129-144.