

Germinación *in vitro* y respuesta morfogénica de *Lophocereus schottii*

Ruth Amelia Garza Padrón^{a*}, Mariana Pedraza Zamora^a, Jaime Francisco Treviño Neávez^a, Ramón Gerardo Rodríguez Garza^a, María Porfiria Barrón González^b, María Eufemia Morales Rubio^a

^aLaboratorio de Micropropagación; ^bLaboratorio de Biología Celular. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Universidad S/N Cd. Universitaria, Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. San Nicolás de los Garza N. L. Tel. (81) 83-29-41-10 ext. 6468.

*Corresponding author, e-mail: ruthgarza@hotmail.com, biologagarza@yahoo.com.mx

Received 8th June 2011; Accepted 12th September, 2012

Resumen

Se estableció un protocolo de propagación *in vitro* para *Lophocereus schottii*, cactácea catalogada según la NOM-059-ECOL-2001 como sujeta a protección especial y endémica, reportada en la medicina tradicional para curar padecimientos como el cáncer, diabetes y úlceras gástricas. Un aspecto importante de la técnica de cultivo de tejidos vegetales radica en que es posible obtener metabolitos secundarios de interés sin deteriorar las poblaciones silvestres. Se colectaron frutos frescos de *L. schottii* en Baja California Sur. Las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección que consistió en lavados sucesivos en agua corriente por 10 minutos, etanol 100 % por 3 minutos, solución de Hipoclorito de sodio comercial al 2 % por 15 minutos con 0.5 % de Tween 20 y finalmente en condiciones asépticas, se lavaron con agua estéril. Se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), se probaron dos tratamientos: medio MS (1962) sin reguladores (T1) y medio MS (1962) adicionado con Bencilaminopurina 1 mg /L y Ácido indolbutírico 0.5 mg/L (T2). El cultivo se mantuvo bajo condiciones de 12 h luz y 22± 2 °C de temperatura. El procedimiento de desinfección fue efectivo, ya que no se presentó contaminación. El porcentaje de germinación para el tratamiento 1 fue de 100 %, mientras que para el tratamiento 2 fue de 94 %. A los dos meses de la siembra, las plántulas obtenidas en el tratamiento 1 mostraron una raíz larga y ramificada, un brote único, alargado con areolas pequeñas, redondeadas y con espinas conspicuas. Mientras que el tratamiento 2 se observa una raíz muy corta y engrosada, el brote también es único, pero se ha engrosado con areolas prominentes, engrosadas, con espinas pequeñas y abundantes tricomas lanosos, además se puede apreciar que el tejido comienza a diferenciarse a callo. Podemos concluir que el tratamiento 1 resultó más efectivo para la germinación que el tratamiento 2, pero no así para la inducción de callo donde el tratamiento 2 es mejor.

Palabras clave: Germinación *in vitro*, *Lophocereus schottii*, reguladores del crecimiento, respuesta morfogénica.

Abstract

Was established *in vitro* propagation protocol for *Lophocereus schottii*, cactus specie classified according to the NOM-059-ECOL-2001 and subject to special protection and endemic and employed reported in traditional medicine to cure diseases such as cancer, diabetes and gastric ulcers.

An important aspect of the technique of plant tissue culture is that it is possible to obtain secondary metabolites without damaging wild populations. Fresh fruit for obtaining seed were collected in Baja California Sur. The seeds were subjected to a disinfection process that consisted of successive washes in the following solutions: water for 10 min, 100 % ethanol for 3 min, a solution of commercial Sodium hypochlorite 2 % for 15 minutes with a 0.1 % of Tween 20, and finally in aseptic conditions washed with sterile water immediately passed to jars with media Murashige and Skoog (1962), without regulators (T1) and media complimented with Bencilaminopurine 1 mg/L and Indolbuthiric Acid 0.5 mg/L (T2). They were kept on controlled conditions of

temperature (22 +/- 2 °C) and photoperiod of 12h light. The disinfection protocol was effective because it did not show contamination. Germination rate for treatment 1 was 100 %, while for treatment 2 was 94 %. Two months after planting, the seedlings obtained in treatment 1 showed a long, branched root, a single outbreak, elongated areoles small, rounded, with conspicuous spines. While treatment 2 shows a short root and thickened, the outbreak is also unique, but it has been thickened, the outbreak is also unique, but has been thickened with prominent areolas, thickened, with small spines and abundant woolly hairs, you can also appreciate that the tissue star to differentiate into callus. We conclude that treatment 1 was more effective for germination than treatment 2, but not for induction of callus where treatment 2 is better.

Keywords: Germination *in vitro*, *Lophocereus schottii*, growth regulators, morphogenetic response.

Introducción

Una de las técnicas que permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción es el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales (Aureoles *et al.*, 2008). Esta técnica de propagación de plantas se lleva a cabo en el laboratorio bajo condiciones asépticas y controladas, optimizando factores como el fotoperiodo, temperatura y nutrientes. En el cultivo *in vitro* se pueden usar partes de las plantas como son: hojas, tallos, semillas, etc.; esto por la capacidad celular de ser totipotenciales; así mismo, la técnica es llevada a cabo en recipientes estériles además de utilizar agentes gelificantes y un medio de cultivo específico para la especie a desarrollar (Hurtado y Merino, 1991). Los problemas de contaminación del entorno donde se encuentran las plantas (polvo, esporas), aunado a la morfología que presentan (como las areolas en las cactáceas), hace difícil eliminar los contaminantes, por lo que las semillas son una buena alternativa para obtener explantes en condiciones asépticas al inducir su germinación *in vitro*, de tal modo, las plántulas pequeñas que son obtenidas, se utilizan como explantes para la formación de callo, brotes o plántulas (Comparán y Luna, 1994). Sin embargo, el uso de las semillas a veces conlleva a procesos de escarificación de las mismas, sin los cuales no germinarían, por lo que, Avilés *et al.* (2004) recomienda la escarificación con ácido sulfúrico a diferentes tiempos y concentraciones para inducir la germinación de ciertas especies de cactáceas. Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1999) realizaron el cultivo *in vitro* en familias como: *Cactáceas*, *Agaváceas*, *Nolináceas*; especies que se caracterizan por su gran importancia ecológica y por el hecho de que sus poblaciones están amenazadas debido a: la explotación irracional, lento crecimiento y pérdida de su hábitat, entre otros factores.

Las cactáceas se han utilizado como alimento para el hombre y sus animales domésticos, en las zonas semidesérticas y desérticas ayudan a fijar el suelo previniendo la erosión del viento y de las lluvias torrenciales estacionales. Algunos géneros de cactáceas se han utilizado con fin medicinal por los pueblos indígenas de nuestro país, esto en gran medida por los metabolitos secundarios que presentan, por lo que han sido protagonistas importantes de la tradición herbolaria de nuestra nación; además de ser una familia muy apreciada en la jardinería por sus diversas, agradables y extravagantes formas, así como por sus vistosas flores. Debido a la alta demanda de especies de esta familia, muchas se han extinguido o se encuentran en peligro o al borde de la extinción (Arbiza, 2003).

Lophocereus schottii es una cactácea endémica y (Figura 1) que se encuentra bajo protección especial según la NOM-059-ECOL-2001 (<http://www.semarnat.gob.mx/leyesyformas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf>).

Su distribución según Bravo y Sánchez (1978), comprende del norte del estado de Sonora hasta Arizona; aunque también se encuentra distribuida en el sur del desierto sarcófilo que comprende el tercio medio de la Península de Baja California y en el desierto arbocrossicaulescente que comprende el tercio inferior de la Península de Baja California.

Bravo-Hollis y Scheinvar (1995) reportan que *L. schottii* es empleada en la medicina tradicional como un medicamento efectivo para combatir algunos tipos de cáncer, úlceras, diabetes y reumas. Se recomienda tomar

los tallos en infusión (100 g de tallo por 2 L de agua, se hierve y se deja consumir el agua hasta tener un litro de cocimiento, se cuela y se pone al refrigerador para tomarla durante el día como agua de uso, durante el tiempo que sea necesario).



Figura 1. Planta de *Lophocereus schottii*

Figure 1. Plant of *Lophocereus schottii*

Morales *et al.* (2007) demostraron la actividad citotóxica de los extractos metanólicos de tallo de *L. schottii* contra células HeLa, obteniendo una CI_{50} de $11.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ y con el extracto acuoso de tallo la CI_{50} fue $86.44 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Morales *et al.* (2010) demostraron la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *Lophocereus schottii*.

En el presente trabajo se realizó el cultivo *in vitro* de *Lophocereus schottii* (Cactaceae), cuya característica principal es su lento crecimiento y que además es una especie reportada por su uso en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos (Bravo-Hollis H y Scheinvar L, 1995; Morales *et al.*, 2007).

Materiales y métodos

Material biológico

Semillas de frutos de *Lophocereus schottii* que fueron colectados en la Península de Baja California, en el verano del 2010. La identificación de la especie se llevó a cabo en el Laboratorio de Fanerógamas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para luego ser depositado en el Herbario de la facultad, extendiendo el folio 024185.

Métodos

Escarificación de semillas de Lophocereus schottii

Las semillas fueron escarificadas en ácido sulfúrico concentrado durante 3 minutos y posteriormente lavadas con abundante agua destilada (Avilés *et al.*, 2004).

Germinación de Lophocereus schottii.

Se emplearon frascos de vidrio de 125 mL, a cada uno se le añadió 20 mL de medio Murashige y Skoog (1962), el cual se elaboró en base a soluciones stock de sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes) y componentes orgánicos, como fuente de energía se empleó sacarosa (30 g L^{-1}) y Agar (8 g L^{-1}) como agente solidificante, con un pH de 5.7; se realizaron los tratamientos siguientes: T1= MS sin reguladores y T2= MS con Bencilaminopurina (BAP) 1 mg L^{-1} y Ácido Indolbutírico (AIB) 0.5 mg L^{-1} .

Desinfección y establecimiento del cultivo *in vitro*

El protocolo de desinfección consistió en colocar las semillas escarificadas de *L. schottii* en un colador metálico para iniciar con el lavado en agua corriente por 10 min, luego se colocaron en etanol absoluto durante 3 min, después se sumergieron en una solución de Cloralex comercial al 20 % con unas gotas de Tween 20 y se mantuvieron en agitación constante por 15 min, para finalmente ser trasladadas a la campana de flujo laminar y ser lavadas con agua bidestilada estéril.

Las semillas fueron sembradas en cada uno de los frascos con medio MS (1962) dentro de la campana de flujo laminar. Para cada tratamiento se emplearon 16 frascos y en cada uno, se sembraron 8 semillas colocadas en forma circular y equidistante. Después de estar cerrados los frascos y haberles colocado el kleen-pack en las tapas, se mantuvieron en el cuarto de cultivo en condiciones constantes y controladas de luz (12h) y a una temperatura de 22+/- 2 °C; hasta obtener el máximo porcentaje de germinación.

Resultados y discusión

Escarificación, desinfección y cultivo *in vitro*

El tiempo empleado para la escarificación de las semillas de *L. schottii* con ácido sulfúrico concentrado fue el adecuado, ya que se observó que más del 90 % de las semillas tuvieron rompimiento de testa.

El procedimiento de desinfección, fue eficiente ya que hubo nula contaminación en los frascos que contenían medio Murashige y Skoog (1962) basal y adicionado con BAP 1 mg L⁻¹ y AIB 0.5 mg L⁻¹. Por otro lado, Seemann *et al.* (2007) establecieron cultivos asépticos a partir de areolas apicales en varias especies de cactáceas, obteniendo los siguientes resultados con la combinación de 0.1 mg L⁻¹ de ANA y 1.0 mg L⁻¹ de BAP en medio MS (1962), formación exitosa de brotes en *Copiapoa hypogaea*, *Mammillaria elongata*, *Opuntia berteri*, *Opuntia* sp. y *Trichocereus* sp., en tanto que en *Neoporteria napina* solo se logró la inducción de callo, con el mismo medio y después de una prolongada fase de formación de callo, se logró establecer *Cereus peruvianus* y *Rhipsalidopsis gaertneri*; mientras que *Copiapoa chaniaralensis*, *Eriosyce sandillon* y *Loxanthocereus aureispinus* no hubo respuesta a la formación de callo bajo las condiciones estudiadas. Asimismo concluyen que no fue posible inducir una eficiente formación de raíces en la mayoría de las especies en estudio, con las combinaciones de fitorreguladores empleadas; situación señalada por Wareing y Phillips (1973), el cual mencionan que el balance auxina-citocinina es un factor importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular.

Morales-Rubio (2000), utilizó medio Murashige y Skoog (1962), adicionado con citocininas: K (Cinetina) 1mg L⁻¹ con BAP 2 mg L⁻¹ para la inducción de brote de *Hylocereus undatus* (pitahaya orejona). También el desarrollo de las areolas fue marcadamente mayor con el tratamiento de BAP y K, estos resultados indican la influencia de las citocininas en el desarrollo primeramente de las areolas y más tarde en el de los brotes. En nuestra investigación empleamos una citocinina, el BAP, posiblemente es el responsable del engrosamiento de las areolas en el tratamiento 2, mientras que la tendencia a formar callo en este tratamiento, posiblemente se deba a la adición de la auxina (AIB).

Las proporciones de los reguladores también parecen jugar un papel muy importante, por lo que, Morales-Rubio *et al.* (2000) menciona que otros medios como el BDS (medio modificado por Gambor B5) suplementado con 2-4,D y K se han empleado para propagar especies de cactus ornamentales.

Germinación

Los datos obtenidos en cuanto a los tiempos de germinación fueron sometidos a un análisis ANOVA, realizado con el programa estadístico SPSS; al comparar los días 4, 8 y 10 de cada tratamiento nos indican una significancia, para el día cuatro de 0.634, valor que indica que los tratamientos no presentan diferencia alguna, en el día ocho la significancia fue de 0.005 por lo que los tratamientos son diferentes mientras que en el día diez, el valor de significancia es de 0.007 lo que indica que los tratamientos presentan una diferencia significativa.

La capacidad de germinación muestra el porcentaje final de este proceso en cada tratamiento; en la Figura 2, podemos observar el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa, en donde el tratamiento 1 tiene una capacidad germinativa del 100%, mientras que el tratamiento 2 oscila entre el 100, 87.5 y 75 %.

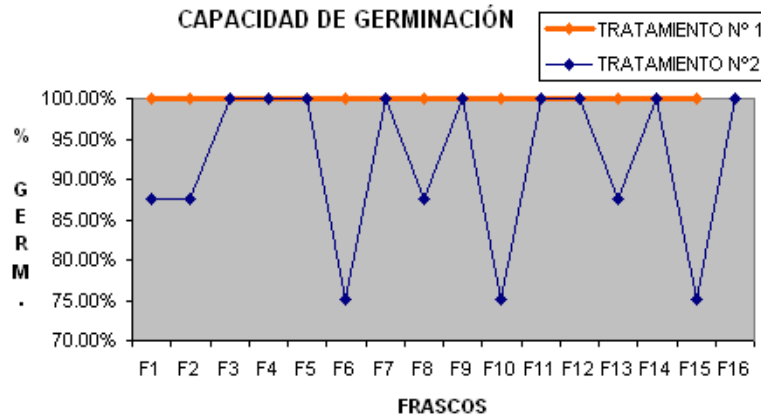


Figura 2. Capacidad de germinación de los tratamientos
Figure 2. Germination of treatments

El índice de germinación (Figura 3) provee una medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad de germinación (Media intervalo de confianza ± 0.95).

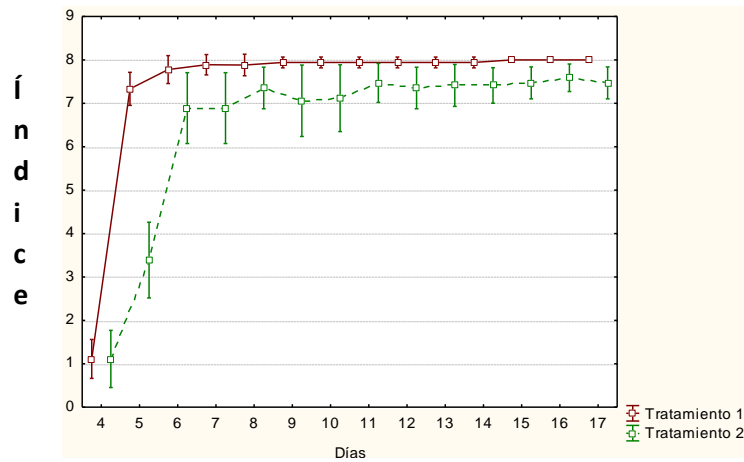


Figura 3. Índice de germinación
Figure 3. Germination rate

La germinación diaria (Figura 4), muestra el número de semillas que germinaron cada día, describe la distribución de la germinación en el tiempo (Media intervalo de confianza ± 0.95), por lo que se observa que tan cercana es a una distribución normal (uniformidad) y el día en que se logra el máximo número de semillas germinadas (pico de germinación). En ambos tratamientos la germinación inicia el día 4.

El pico de germinación para el tratamiento 1 ocurre en el día 8, mientras que para el tratamiento 2, en el día 12. La velocidad de germinación, muestra la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación (Figura 5).

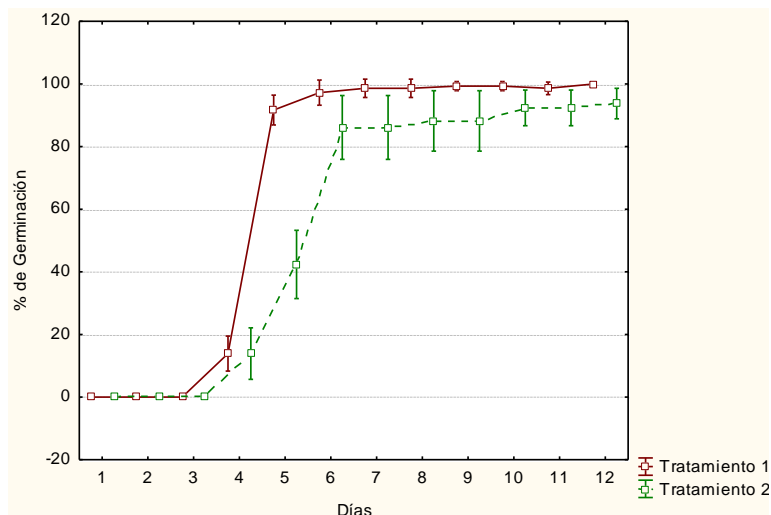


Figura 4. Germinación diaria
Figure 4. Daily germination

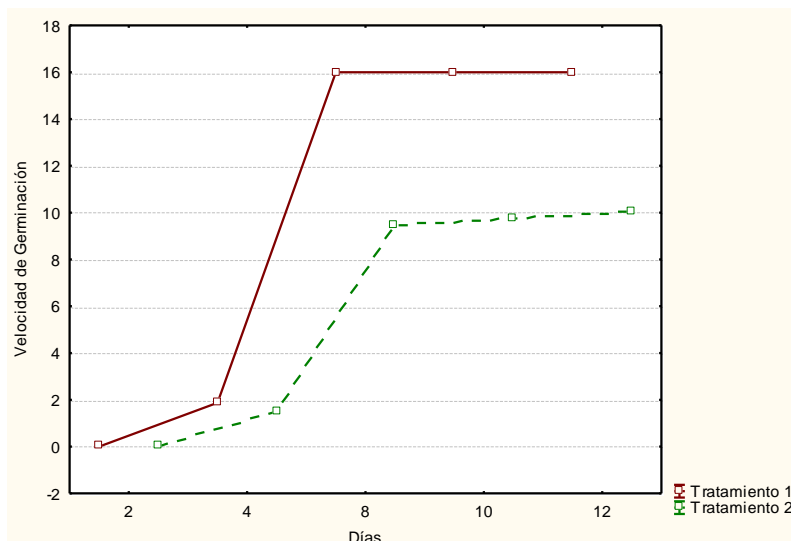


Figura 5. Velocidad de germinación
Figure 5. Daily germination

Diversos estudios se han realizado con el fin primordial de establecer el cultivo *in vitro* de especies de cactáceas, determinando porcentajes de germinación, considerando que en algunos casos, se eficientizan los resultados mediante ésta técnica biotecnológica. Espinoza Vallejo (2008), empleó dos tratamientos a base de medio MS (1962), uno adicionado con: BAP 2 mg L⁻¹ e AIB 1mg L⁻¹ y otro sin reguladores de crecimiento, para inducir la germinación de *Stenocereus pruinosus*; mientras que Moebius *et al.* (2003) obtuvieron brotación a partir de semillas germinadas *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* en un medio MS (1962) adicionado con BAP (13.3 μM) y NAA (5.4 μM), y al igual que Quijala *et al.* (2009) determinaron la germinación *in vitro* de *Pilosocereus robinii* el cual emplearon medio MS al 50 % de sales.

Respuesta morfogénica

Al noveno día de la siembra, se puede observar los diferentes grados de desarrollo de las semillas de *L. schottii*, al sembrarse bajo las mismas condiciones; como se observa en la Figura 6, donde las plántulas proceden de un mismo frasco (T1); a) rompimiento de testa y emergencia por el hilo, b) desarrollo del hipocótilo, aparición de

los esbozos de los cotiledones, c) alargamiento de los cotiledones, hipocótilo y raíz, d) desarrollo de las hojas cotiledonarias, se pone de manifiesto la aparición de cloroplastos (color verde) y cromoplastos (color rojizo), e) cotiledones de forma cónica poco separados entre sí, raíz única y larga, f) la plántula adquiere una tonalidad rojiza en el cotiledón, el hipocótilo se observa ligeramente engrosado, la raíz primaria es delgada y alargada.



Figura 6. Etapas de desarrollo de *L. schottii*
 Figure 6. Developmental stages of *L. schottii*

Una vez germinadas las semillas, las plántulas desarrolladas se muestran en la Figura 7, en donde se observa la diferencia en el número de areolas para cada tratamiento, siendo el tratamiento 2 el que obtuvo un mayor número de areolas por planta.

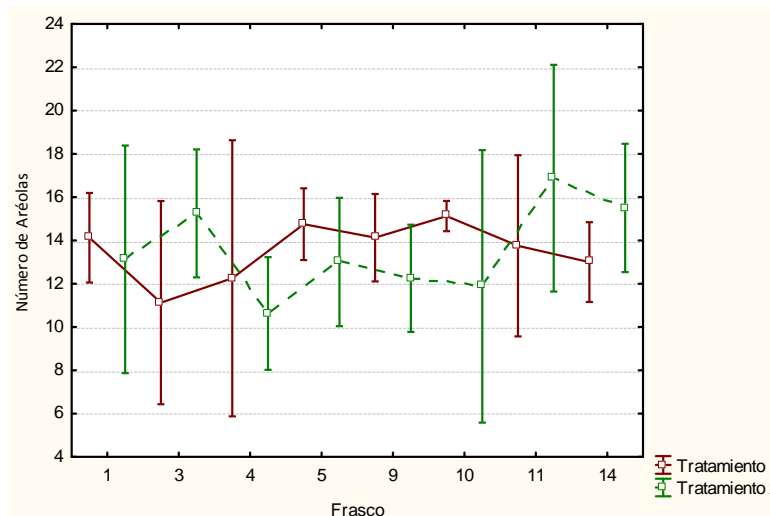


Figura 7. Areolas por plántula *L. schottii*
 Figure 7. Areolas per seedling *L. schottii*

Mes y medio después de la siembra, en el tratamiento 1 se puede observar (Figura 8), que la mayoría de las plántulas presentan una raíz tipo axonomorfa, las areolas están bien desarrolladas con presencia de espinas sin embargo algunas plántulas se han diferenciado a callo.

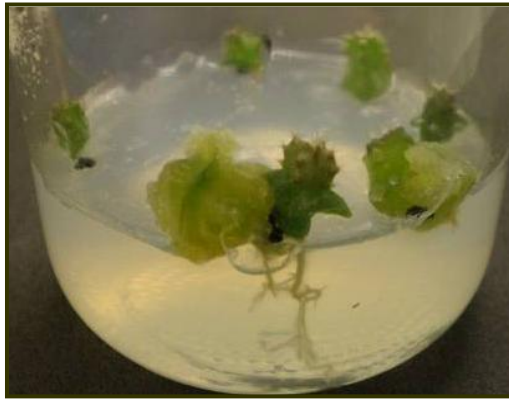


Figura 8. Respuesta morfogénica de *L. schottii* en T1, al mes y medio de la siembra

Figure 8. Morphogenetic response of *L. schottii* in T1, a month and a half after planting

En el tratamiento 2 después de mes y medio de la siembra (Figura 9), se pudo apreciar que las plántulas desarrolladas se engrosaron, las areolas estaban hinchadas y con presencia de espinas cortas, así como tricomas lanosos, en la base de las mismas se puede apreciar que el tejido comienza a diferenciarse a callo.

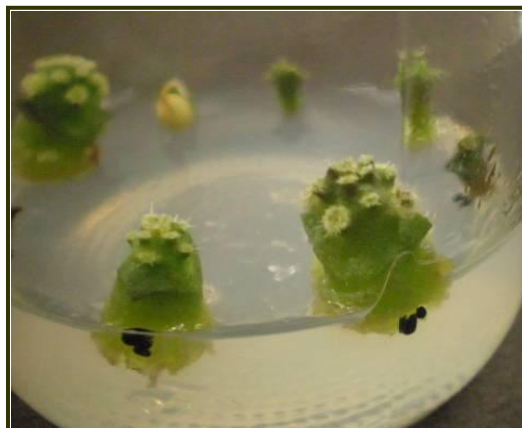


Figura 9. Respuesta morfogénica del tratamiento 2, al mes y medio de la siembra

Figure 9. Morphogenetic response from treatment 2, a month and a half after planting

La Figura 10, muestra la diferencia entre el número de callos formados para cada tratamiento, siendo el tratamiento 2 el que muestra una mayor formación de este.

A dos meses de la siembra (Figura 11) los tratamientos muestran diferencias significativas; en el T1 se observa una raíz larga, prominente y ramificada, el brote es único, alargado con areolas pequeñas, redondeadas y con espinas conspicuas; mientras que en el tratamiento 2 se observa una raíz muy corta y engrosada, el brote también es único, pero se ha engrosado con areolas prominentes, engrosadas, con espinas pequeñas y abundantes tricomas lanosos.

Un factor importante para el crecimiento del cultivo *in vitro* es la adición de reguladores de crecimiento, la respuesta morfogénica observada depende de varios factores, como son: tipo de regulador, concentración, combinación y condición endógena del explante. Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que la adición al medio de una combinación de reguladores de crecimiento auxina-citocinina, induce la germinación,

con la subsecuente diferenciación de la plántula a callo, en cambio en el tratamiento sin reguladores de crecimiento la respuesta morfo genética observada es mucho más parecida al que ocurre en las plantas germinadas en suelo, Hurtado y Merino (1991), señalan que las proporciones de auxina-citocinina dirigen en cierto modo la respuesta morfo genética en el cultivo *in vitro*.

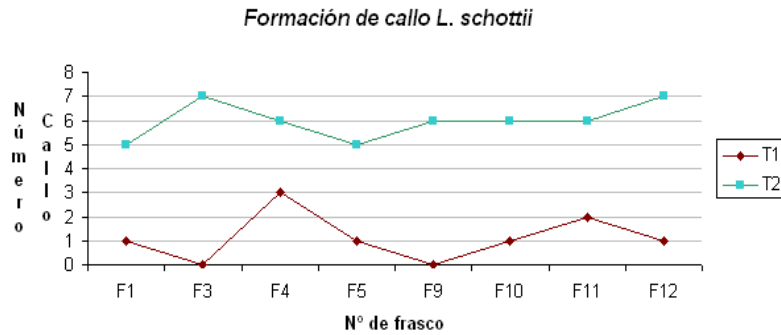


Figura 10. Formación de callo por frasco
Figure 10. Callus formation

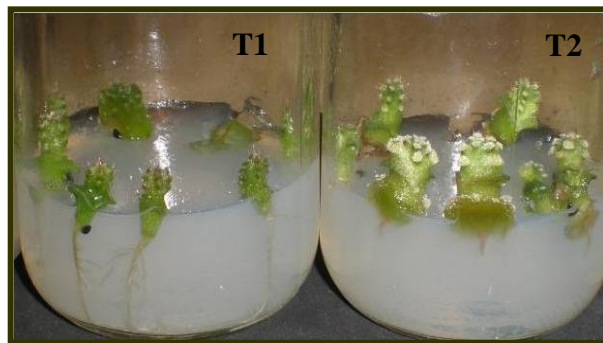


Figura 11. Comparación tratamiento 1 y 2
Figure 11. Treatment 1 and 2 comparison

Devlin (1980) menciona que las auxinas pueden ejercer una cierta actividad sobre la división celular dando lugar a la producción de callo esto producido por la rápida división de células del parénquima, en el presente trabajo se obtuvo una respuesta hacia la formación de callo en el tratamiento donde se tenían auxinas presentes, también los resultados de este estudio concuerdan con lo que Devlin (1980), menciona de las citocininas, que generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, y la elongación del tallo, ya que obtuvimos, en el tratamiento adicionado con citocininas, plántulas de raíces cortas y gruesas, así como brotes engrosados y con poco desarrollo longitudinal.

Espinoza Vallejo (2008), observó a dos meses de la siembra de *Stenocereus pruinosus* (medio MS (1962), sin reguladores y otro adicionado con BAP 2 mg L^{-1} y AIB 1 mg L^{-1} , las plántulas desarrolladas en el medio adicionado con reguladores presentaban raíces cortas y gruesas y una brotación múltiple, mientras que en el medio sin reguladores las plántulas tenían un único brote, raíces largas y ramificadas, resultados similares a los encontrados en este trabajo, mismos que nos permiten confirmar la influencia de los reguladores del crecimiento en la respuesta morfo genética de los cultivos *in vitro*.

Conclusiones

Se logró establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de *Lophocereus schottii*, especie que de acuerdo a los antecedentes está reportada contra líneas celulares y con capacidad antioxidante, por lo que tiene un futuro promisorio; en base a lo anterior este protocolo puede ser valorado como una herramienta que permita establecer un sistema de cultivo *in vitro* para obtener los metabolitos de importancia farmacológica y ser una alternativa sustentable para no demeritar nuestros recursos vegetales.

Referencias

- Arbiza, M.J. 2003. Las cactáceas, tesoro de nuestro país. Correo del maestro. 7(82):15-21.
- Aureoles, R., Rodríguez, J.L., Legaria, J.P. 2008. Propagación *in vitro* del maguey bruto, *Agave inaequidens* Koch, una especie amenazada de interés económico. Revista Chapingo, serie horticultura 14: 263-269.
- Avilés, A. H., Morales R.M.E, Treviño N. J.F, Oranday C. A. 2004. Estudios germinativos de *Stenocereus gummosus* mediante escarificación y estudio fitoquímico del fruto. Gastón Esparza, Santiago Méndez, David Valdés. El nopal, tópicos de actualidad. Univ. Autónoma de Chapingo. 151-154.
- Bravo-Hollis H. y M.H. Sánchez. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. pp: 64 – 83.
- Bravo, H.H. y Scheinvar, L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica: México D.F. pp 127, 161 y 162.
- Comparán Sánchez, S. y J., Luna Martínez. 1994. Aplicación de la Técnica de cultivo *in vitro* de tejidos para la propagación de las especies *Echinocereus delatetii* y *Pelecypora aselliformis*. Memorias del Primer Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. México D.F. 65 p.
- Devlin, R. M., 1980. Fisiología vegetal, Ed. Omega, Barcelona, España.
- Espinoza Vallejo Yolanda. 2008. Germinación y respuesta “*in vitro*” de *Stenocereus pruinosus* (Weber) Buxbaum y estudios preliminares sobre su fitoquímica y actividad biológica. Tesis de Licenciatura en Biología. FCB UANL
- Hurtado. M,M. Merino E . 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial trillas. Pag. 44. otro año 97.
- Moebius Goldammer, K. G., M. Mata Rosas y V. M. Chavez Avila. 2003. Organogenesis And Somatic Embryogenesis In *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.)K. Schum. (Cactaceae), An Endemic And Endangered Mexican Species. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 39:388–393.
- Morales-Rubio ME, Treviño Neávez J.F. y Viveros Valdez E. 2010. Free Radical Scavenging Activities of *Lophocereus schottii* (Engelmann). *International Journal of Natural and Engineering Sciences (IJNES)* 4 (1): 65-68.
- Morales-Rubio, M.E.; Treviño-Neávez, J.F.; Cavazos-González, R. 2000. Germinación “*in vitro*” de cactáceas. Memorias del V Simposio de Ciencia y Tecnología. SEP-CONACYT. pp. 58.
- Morales R. M.E., Verde S. MJ.,Oranday C. A., Rivas M. C., A. Niño K., Treviño N. JF., Carranza R. P y Cruz V. DE. 2007. Actividad Biológica de *Lophocereus schottii* (Engelman) Britton and Rose *RESPYN*. (7).1-3.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:437-497.

Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Nuñez-Paleniús, H.G., Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Pp 25-27.

Quijara, E., J. Matos, G. Montalvo, M. de Feria, M. Chávez, A. Capote, N. Pérez, R. Barbón y B. Kowalski. 2009. *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11:18-25.

Seemann, P., Rodríguez, C. y Jara, G. 2007. Cultivo *in vitro* de Cactáceas con fines de conservación *ex situ* *Agro Sur* 35 (2): 24-26.

Wareing, R. F. y Phillips, I. D. J., 1973. The control of growth and differentiation in plants, Pergamon Press., L. T. D., Gran Bretaña.

Material electrónico

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. DIARIO OFICIAL Segunda Sección. pp. 153 (internet) disponible en el sitio de red.

<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-ECOL-059-2001.pdf>. Consultado el 15 de marzo de 2011.