

CULTIVO *IN VITRO* DE *Sprekelia formosissima* Herbert.

Marisol Cazarez-Prado¹, María Andrade-Rodríguez^{1*}, J. Jorge Ayala-Hernández², Iran Alia-Tejaca¹, Oscar G. Villegas-Torres¹, Víctor López-Martínez¹, Carlos Manuel Acosta-Durán¹

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. 62209. Chamilpa, Cuernavaca. Morelos; Correo-e: andradem65@hotmail.com (* Autor responsable).

² Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Chapingo, Estado de México.

RESUMEN

La propagación vegetativa de *Sprekelia formosissima* en condiciones naturales es limitada por lo que el objetivo fue generar un método de propagación *in vitro* para incrementar las plantas de *Sprekelia formosissima*. En el establecimiento del cultivo aséptico se usaron bulbos de 4 a 5 cm de diámetro, se desinfectaron y se obtuvieron escamas de 1 cm² con disco basal, se establecieron en medio MS con 2.0 mg L⁻¹ de BA y 0.2 mg L⁻¹ de AIB. En multiplicación, se usaron los bulbillos obtenidos en la fase anterior y fueron cultivados en medio MS con 1, 5, 10 y 15 µM de BA en combinación con AIB (10 a 1). Los bulbillos obtenidos fueron establecidos en medio MS suplementado con 1, 2, 3, 4, y 5 % de sacarosa para promover su crecimiento. Una parte de los bulbillos fueron trasplantados a suelo para evaluar su aclimatación. Se obtuvo 44.1 % de asepsia de explantes, de los cuales 86 % formaron en promedio 2 brotes por explante. La multiplicación de bulbillos se incrementó conforme aumentó la cantidad de BA, obteniendo el mejor resultado con 10 µM. El mejor crecimiento de los bulbillos se obtuvo con 5 % de sacarosa. En la fase de aclimatación sobrevivieron 63.4 % de los bulbillos trasplantados.

Palabras clave: *micropropagación, producción de bulbillos, multiplicación de bulbillos, planta silvestre, geofitas.*

ABSTRACT

The vegetative propagation of *Sprekelia formosissima* in natural conditions is limited by what the objective of this investigation was to generate a propagation method *in vitro* to increase the plants of this species. For the establishment of the aseptic culture, bulbs of 4 to 5 cm of diameter were used. The bulbs were disinfected, and bulb-scales segments of 1 cm² were obtained with basal plate and were established on MS medium with 2.0 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ of IBA. For multiplication, bulbils obtained in the previous phase were cultivated on MS medium with 1, 5, 10 and 15 µM of BA in combination with IBA (10 at 1). The bulbils obtained were established on MS medium with 1, 2, 3, 4, and 5 % sucrose to promote its growth. A part of the bulbils was transplanted to substrate to evaluate its acclimatization. The percentage of explants aseptic obtained was 44.1; and 86 % of explants formed an average of 2 buds. The bulbils multiplication was increment as increase the quantity of BA in the media, obtaining the best result with 10 µM. The best growth in the bulbils was obtained with 5 %

sucrose. In the acclimatization phase 63.4 % of the transplanted bulbils survived.

Key words: *micropropagation, bulbils production, bulbils multiplication, plants wild, geophytes.*

INTRODUCCIÓN

Las monocotiledóneas nativas más utilizadas en México como elementos decorativos son: Agavaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Arecaceae, Cannaceae, Nolinaceae y Orchidaceae, entre otras. Las amaryllidaceae presentan en México siete géneros, de los cuales al menos cuatro, tienen amplio potencial como plantas decorativas debido a sus vistosas flores: *Crinum*, *Sprekelia*, *Hymenocallis* y *Zephyrantes* (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2003).

Algunas especies bulbosas de origen mexicano (*Calochortus*, *Milla*, *Sprekelia*, *Tigridia*, *Zephyrantes*), se cultivan en algunos países del continente Euro-Asiático, como flor de corte, de maceta o de jardín. Sin embargo ninguna de ellas está cultivada comercialmente en México, a pesar de estar bien adaptadas a las condiciones xerófitas; son plantas excelentes para tenerlas en los parques, autopistas, jardines y en casa (Leszczyńska-Borys y Borys, 2001).

Sprekelia formosissima Herbert, pertenece al grupo de plantas bulbosas ornamentales más hermosas de México, la cual generó mucho interés en el pasado (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995). Es una planta silvestre de consistencia herbácea que pertenece a la familia Amaryllidaceae, de género monotípico mexicano (Conzatti, 1981). Es considerada una planta endémica de México (Sánchez, 1979; Reiche, 1977), aunque Skalická (1993), Van Dijk y Kupershoek (2003), López-Ferrari y Espejo-Serna (2002) especifican que procede de México y Guatemala. Esta especie se encuentra dispersa en gran parte del

territorio nacional (Torres, 2000); se localiza en Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz (López-Ferrari y Espejo-Serna, 2002). A la vista, es atractiva por el color rojo escarlata y la forma de sus flores, con potencial para usarse como planta ornamental ya que podría ser usada como flor de corte, flor en maceta, o en jardines. En México, es poco utilizada en el diseño de jardines, aunque se ha usado con fines medicinales ya que el bulbo contiene saponinas que sirven para el control de la caída del pelo.

Existe la tendencia de usar plantas silvestres como ornamentales, pero debe considerarse que existen factores que están provocando la pérdida de numerosas especies, uno es el comercio ilegal de plantas y subproductos derivados de ellas en general, ya que se extraen de su medio natural para venderse tanto en el extranjero, como dentro del país (Chimal y Corona, 2003). Por tal motivo, es necesario buscar métodos de propagación eficientes que permitan multiplicar las especies silvestres de interés económico, para contribuir a que los bulbos no sean extraídos de su hábitat natural.

Leszczyńska-Borys y Borys (2000) mencionan que las semillas de *Sprekelia* llegan a tener alta viabilidad hasta un año después de su cosecha, y después decrece rápidamente; esta característica y la rápida germinación inicial, es considerada una expresión de adaptación a un corto periodo pluvial, precipitaciones de corta duración y alta densidad. Desde el punto de vista de conservación de recursos fitogenéticos, la propagación por semillas es la forma de multiplicación más adecuada.

La propagación asexual de plantas bulbosas es por bulbillos o hijuelos, este método es muy lento ya que el proceso requiere de 4 a 5 años aproximadamente

desde el inicio de formación del bulbillo hasta floración (Hartmann y Kester, 1987).

Otro método de propagación vegetativa es el uso de estacas de bulbo (Hatmann y Kester, 1987), la ventaja es que se puede obtener mayor número de bulbillos por bulbo, pero el tiempo requerido para iniciar la floración es similar al método de hijuelos.

Ortiz (1996) propagó *in vitro* plantas de *Sprekelia formosissima*, usando como explantes semillas y secciones de bulbo, mencionando serios problemas de contaminación y escasos resultados en formación de bulbillos.

Como se ha señalado, las opciones de propagación vegetativa de *Sprekelia formosissima* son limitadas en condiciones naturales, por lo que la técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa que permitirá multiplicar las plantas de esta especie para evitar sustraer bulbos de las poblaciones naturales.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue generar un método de propagación *in vitro* para el incremento de plantas de *Sprekelia formosissima*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del sitio experimental. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Propagación *in vitro* de Fruticultura, ubicado en las instalaciones del Colegio de Posgraduados en Montecillo, Edo. de México y en un invernadero del Centro de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Material vegetal. El material vegetal que se utilizó fueron bulbos de *Sprekelia formosissima* de 4 a 5 cm de diámetro que se colectaron en las áreas de vegetación

natural de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Establecimiento del cultivo aséptico.

Para esta fase se utilizó el medio de cultivo Murashigue y Skoog (1962) suplementado con NaH_2PO_4 (0.170 mg L^{-1}), inositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}), piridoxina (1.0 mg L^{-1}), niacina (1.0 mg L^{-1}), glicina (0.4 mg L^{-1}), sulfato de adenina (80 mg L^{-1}), bencil adenina (BA) (2.0 mg L^{-1}), ácido 3-indolbutírico (0.2 mg L^{-1}), sacarosa (3 %), agar (0.8 %). El pH se ajustó a 5.7 antes de agregar el agar; después de disolver el agente gelificante, el medio fue distribuido en frascos de cultivo tipo gerber en alícuotas de 20 mL.

Los bulbos se limpiaron, eliminando las escamas muertas (de color café) hasta observar las escamas blancas y turgentes. Los bulbos limpios se lavaron con jabón antibacterial y agua destilada estéril en agitación por 5 minutos; se enjuagaron 3 a 4 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se desinfectaron con cloro comercial al 20 %, más cinco gotas de Tween 20 por cada 100 mL^{-1} de solución, en agitación durante 20 minutos y posteriormente se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril.

Para la obtención de explantes, se seccionaron los bulbos en porciones de 1 cm^2 tomados de la parte basal de las escamas. Se colocaron cuatro explantes por frasco.

A las seis semanas se realizó la evaluación registrando porcentaje de contaminación, número de explantes con brote, brotes por explante y número de hojas por brote. Los brotes se utilizaron para el establecimiento del experimento de multiplicación de bulbillos.

Multiplicación de bulbillos. Para la multiplicación, se utilizaron los bulbillos obtenidos en la fase anterior, los cuales se cultivaron en medio MS, suplementado con

inositol (100 mg L⁻¹), tiamina (0.4 mg L⁻¹), piridoxina (1.0 mg L⁻¹), niacina (1.0 mg L⁻¹), glicina (0.4 mg L⁻¹), sulfato de adenina (80 mg L⁻¹), se probaron cuatro concentraciones de BA (1, 5, 10 y 15 µM) (0.2, 1.12, 2.25, 3.37 mg), en combinación con AIB en proporción 10 a 1 (BA/AIB), se agregó 3 % de sacarosa, 0.7 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. El medio se distribuyó en alícuotas de 20 mL en frascos de cultivo tipo gerber.

Se establecieron tres bulbillos por frasco de cultivo, eliminando raíces y partes de tejido muerto, se podaron las hojas; dejando solamente un centímetro de éstas.

Se usó un diseño de experimento completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento (cinco frascos). A las seis semanas, se evaluó porcentaje de contaminación, porcentaje de bulbos con bulbillos, bulbillos por bulbo y diámetro de los bulbillos. Una vez realizada la evaluación los brotes (bulbillos) se utilizaron para inducir el crecimiento de bulbo.

Los datos obtenidos fueron estudiados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey con el programa estadístico SAS (SAS, 1998).

Crecimiento de los bulbillos. El crecimiento del bulbo se indujo usando el medio MS, suplementado con inositol (100 mg L⁻¹), tiamina (0.4 mg L⁻¹), piridoxina (1.0 mg L⁻¹), niacina (1.0 mg L⁻¹), glicina (0.4 mg L⁻¹), 0.7 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. Se probaron cinco concentraciones de sacarosa en el medio (1, 2, 3, 4, 5%). El medio se distribuyó en alícuotas de 40 mL en frascos de cultivo tipo gerber. En cada frasco de cultivo se colocaron tres bulbillos.

Este experimento fue establecido en un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento (tres frascos).

La evaluación se realizó a las cinco semanas, tomando en cuenta el diámetro del bulbo y número de hojas por bulbo.

Los datos obtenidos fueron estudiados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey con el programa estadístico SAS (SAS, 1998).

En cada uno de los experimentos de la investigación el medio de cultivo se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos. Las condiciones de incubación fueron 16 h de fotoperiodo, 24 a 26 °C de temperatura y 12.5 µmol m⁻²s⁻¹ de intensidad luminosa.

Aclimatación en invernadero. Los brotes enraizados se establecieron en invernadero con malla sombra al 50 % el día 28 de Marzo del 2007. Se trasplantaron un total de 41 plantitas, colocándose en vasos de unicel de 250 mL que contenían sustrato preparado a base de composta y agrolita (1:1); los cuales se cubrieron con vasos de plástico transparente para evitar la deshidratación. Los vasos se destaparon gradualmente hasta que las plantitas soportaron las condiciones de humedad relativa prevalecientes en el invernadero. A las siete semanas se realizó la evaluación para cuantificar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico. En el establecimiento de las escamas *in vitro* se obtuvo un porcentaje de cultivo aséptico de 44.1 %, la contaminación sucedió principalmente a causa de un hongo y en menor cantidad por bacterias. El crecimiento de hongos se observó en la superficie del explante, extendiéndose rápidamente en todo el frasco de cultivo. Las bacterias iniciaron el crecimiento en los bordes de los explantes, y permanecieron ahí ya que su crecimiento no invadió el medio de cultivo.

En los explantes provenientes de órganos que crecen bajo la tierra es difícil obtener porcentajes de asepsia altos como

señala Ziv y Lilien-Kipnis (1997). Aunque se tuvo 55.9 % de contaminación de explantes se puede señalar que los resultados son aceptables aunque es posible que en establecimientos posteriores se puedan implementar procedimientos de desinfección más eficientes. Con respecto a esta fase de la micropropagación, Ault (1995) reporta que en el establecimiento de escamas de bulbos de *Eucomis autumnalis* se presentó alto porcentaje de contaminación (90 %).

Los explantes comenzaron a mostrar formación de brotes dos semanas después de su establecimiento *in vitro*, el proceso de inducción fue rápido ya que en otras especies bulbosas como *Eucomis autumnales*, *E. comosa* y *E. zambesiaca*, la respuesta se obtuvo en cuatro semanas (Ault, 1995), y en el caso de *Narcissus asturiensis* ocurrió hasta los 60 días de cultivo *in vitro* (Santos *et al.*, 2002). Se observó que hubo mayor formación de brotes en los explantes que contenían mayor proporción de disco basal del bulbo; ya que, en explantes sin presencia de tallo basal no se presentó brotación, sólo se hincharon. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ault (1995) quien observó que los brotes de tres especies del género *Eucomis* se originaron de la región del plato basal a partir de la superficie cortada de las escamas de los bulbos.

Se obtuvo formación de brotes en 86 % de los explantes y el número de brotes por explante varió de 1 a 4 con un promedio de 2.0 brotes, mismos que presentaron 2.5 hojas promedio por bulbillito (Figura 1). En general, el número de brotes por explante fue bajo; sin embargo, fue similar a lo obtenido para otras especies de plantas bulbosas ya que en *Eucomis autumnalis* se obtuvieron de 1.0 a 3.7, en *E. comosa* 1.0 a 2.9, y para *E. zambesica* fue de 1.0 a 6.9 brotes por explante (Ault, 1995). No obstante, se considera que se puede incrementar el número de brotes haciendo algunas modificaciones al medio de cultivo.

Multiplicación de bulbillitos. La formación de los nuevos bulbillitos ocurrió a partir de la base del bulbillito madre, lo cual indica que se formaron a partir de grupos de células meristemáticas (Grootaarts *et al.*, 1981), que por división mitótica dieron lugar a la organogénesis de *novi* formándose los pequeños bulbillitos. Se tuvo efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) de la concentración de citocinina en el número de bulbos que produjeron bulbillitos ya que el porcentaje de bulbos con bulbillitos varió de 15 a 50, y al incrementarse la concentración de BA en el medio de cultivo aumentó también el porcentaje de bulbos que desarrollaron bulbillitos; el mayor porcentaje se obtuvo al usar 10 μM de BA, ya que al incrementar la concentración de la hormona a 15 μM , el porcentaje de bulbos con bulbillito ya no se incrementó; por el contrario, fue menor al obtenido con 10 μM (Cuadro 1).

De igual modo, se encontró efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) de la concentración de BA en el número de bulbillitos por bulbo, el cual varió de 1 a 3; la tendencia mostró que conforme se incrementó la concentración de BA aumentó también el número de bulbillitos por bulbo; el mayor número de estas estructuras vegetativas se obtuvo con la mayor concentración de BA usada (Cuadro 1). Estos resultados coinciden con lo obtenido por Mohamed-Yasseen (2002), quien observó que el número de brotes de *Hymenocallis speciosa* se incrementó conforme aumentó la concentración de BA; de manera similar, Ault (1995) señala que el número de brotes por explante en tres especies del género *Eucomis* se incrementó al aumentar la concentración de BA en el medio de cultivo.

En el crecimiento en diámetro de los bulbillitos también hubo efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) de la concentración de BA usada en el medio de cultivo. El crecimiento de los bulbillitos se incrementó conforme aumentó la concentración de BA, siendo mayor (1.92) al usar 10 μM de BA; el uso de 15 μM de citocinina no aumentó

más el diámetro de los bulbillos. En general, el proceso de desarrollo de bulbillos de

Sprekelia fue favorecido por el uso de 10 μ M BA en el medio de cultivo.

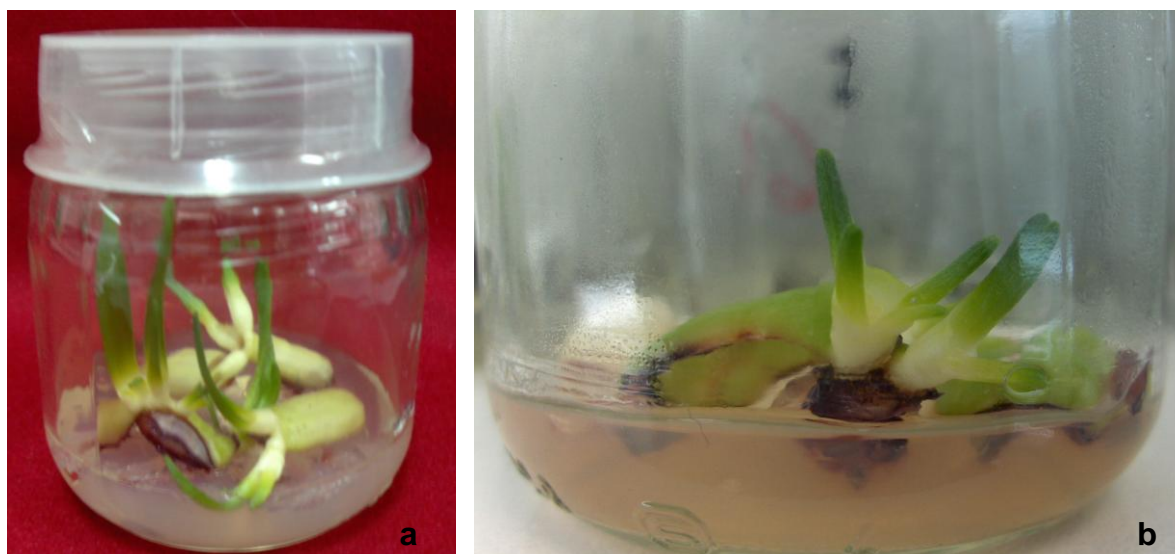


Figura 1. Formación de brotes (bulbillos) a partir de escamas de *Sprekelia formosissima* en la fase de establecimiento del cultivo aséptico. a: origen de los brotes; b: brotes por explante

Cuadro 1. Efecto de la concentración de BA en la multiplicación de bulbillos de *Sprekelia formosissima*.

BA/AIB (μ M)	(mg)	Bulbos con bulbillos (%)	Bulbillos por bulbo (No)	Diámetro de bulbillos (mm)
1/0.1	0.20/0.02	15.0 c	1.0 c	1.24 b
5/0.5	1.12/0.10	25.0 bc	1.2 bc	1.70 a
10/1.0	2.25/0.20	50.0 a	1.9 b	1.92 a
15/1.5	3.37/0.30	35.0 ab	3.0 a	1.55 ab
DMS ($P \leq 0.05$)		17.52	0.78	0.42
C.V.		30.98	24.39	14.80
Promedio		31.25	1.77	1.60
Significancia		**	**	**

DMS: diferencia mínima significativa, CV: Coeficiente de variación. Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Crecimiento de los bulbillos. La concentración de la sacarosa en el medio de cultivo tuvo efecto altamente significativo ($P \leq 0.05$) en el crecimiento de los bulbillos de *Sprekelia*; conforme se aumentó la cantidad del carbohidrato en el medio de cultivo, los bulbillos fueron más grandes y con mayor número de hojas. El diámetro del

bulbillo varió de 2.6 a 4.25 mm y el número de hojas de 1.6 a 4; por lo que, para promover el crecimiento de los bulbillos en mas conveniente usar 5 % de sacarosa en el medio (Cuadro 2). Al respecto, Tipirdamaz (2003) reporta que no hubo efecto en el crecimiento del bulbo de *Galanthus ikariae* al usar 30 o 60 g de

sacarosa en el medio de cultivo. Santos *et al.* (2002) mencionan que hubo buen crecimiento de bulbillos cuando usó ANA y 9 % de sacarosa ya que después de 90 días de cultivo, los bulbillos tuvieron un diámetro

promedio de 8 mm, resultados que superan lo obtenido en esta investigación ya que tales investigadores usaron 4 % más de sacarosa.

Cuadro 2. Crecimiento del bulbo de *Sprekelia formosissima* en función de la concentración de sacarosa.

Sacarosa (%)	Diámetro de bulbo (mm)	Número de hojas
1	2.6 c	1.6 c
2	3.04 bc	2.4 bc
3	3.31 b	2.5 b
4	3.56 b	3.0 b
5	4.25 a	4.0 a

DMS ($P \leq 0.05$)	0.67	0.78
C.V.	9.08	12.82
Promedio	3.37	2.75
Significancia	**	**

DMS: diferencia mínima significativa, CV: Coeficiente de variación. Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Aclimatación. Se trasplantaron un total de 41 plántulas las cuales se evaluaron a las cinco semanas para determinar la repuesta de sobrevivencia, obteniendo 82.9 % de plántulas aclimatadas; el 8.8 % de los bulbillos presentaron nuevas hojas. Al siguiente mes, se realizó otra evaluación y se registró disminución de dicho porcentaje de sobrevivencia, ya que este fue de 63.41 %; sin embargo, el porcentaje de bulbillos con hojas nuevas aumentó a 73 %. De acuerdo a lo observado se consideró que de la misma manera que el bulbillo presentaba formación de hojas nuevas seguramente también hubo formación de raíces nuevas, ya que las plantitas se mostraron más ancladas al sustrato. Además en el crecimiento de las plantas, normalmente primero hay desarrollo de raíces y después crecimiento en la parte aérea. El porcentaje de sobrevivencia final obtenido en esta investigación supera el 28 % de aclimatación reportado por Tipirdamaz (2003) para bulbillos de *Galanthus ikariae*. En términos generales, aunque los resultados obtenidos son similares o superiores a los reportados para otras

especies de plantas bulbosas, no son óptimos y podrían ser superados con más investigación. No obstante, el número de brotes obtenido a partir de cada bulbo supera el número de hijuelos que se pueden obtener en condiciones naturales.

CONCLUSIONES

La metodología usada para la micropropagación de *Sprekelia formosissima* permite obtener 96 bulbillos a partir de cada bulbo madre en seis semanas de cultivo, lo que supera al número de hijuelos que se obtienen en condiciones naturales.

AGRACEDIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del SIN (Exp. 34643), de PIFI 3.2 y de PROMEP por el financiamiento brindado a través del Cuerpo Académico Producción Agrícola UAEMOR-CA-74.

LITERATURA CITADA

- Ault, J. R. 1995. In vitro propagation of *Eucomis autumnalis*, *E. comosa*, and *E. zambesiaca* by twin-scaling. HortScience 30: 1441-1442.
- Chimal, H. A.; V. Corona N. 2003. Arbustos mexicanos con potencial ornamental. pp. 31-51. In: Mejía M. J. M.; F. A. Espinosa (Comps.). Plantas nativas de México con potencial ornamental, análisis y perspectivas. Universidad Autónoma Chapingo. México. 217 p.
- Conzatti, C. 1981. Flora taxonómica mexicana II. Centro Nacional de Enseñanza Técnica Industrial (CENETI). IPN
- Espejo-Serna, A. y López-Ferrari A. R. 2003. Las monocotiledóneas (Liliopsida) mexicanas con potencial ornamental. pp. 20-26. In: Mejía M. J. M.; F. A. Espinosa (Comps.). Plantas nativas de México con potencial ornamental, análisis y perspectivas. Universidad Autónoma Chapingo. México. 217 p.
- Grootaarts, H.; J. H. N. Shel; R. L. M. Pierik. 1981. The origin of bulblets formed on excised twin scales of *Nerine bowdenii* W. Watts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1: 36-49.
- Hartmann, T. H.; E. D. Kester. 1987. Propagación de plantas. Principios y prácticas. CECSA. México D. F. p. 552, 527, 528.
- Leszczyńska-Borys, H.; W. M. Borys; S. J. L. Galvan. 1995. Relaciones raíz/bulbo y otras características de la *Sprekelia (Sprekelia formosissima* (L.) Herbert.) Revista Chapingo Serie Horticultura 1: 77-84.
- Leszczyńska-Borys, H.; W. M. Borys. 2000. Seed production of *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture 42: 96-103.
- Leszczyńska-Borys, H.; W. M. Borys. 2001. Plantas bulbosas para flor de corte, macetas, jardines y parques. SIZA, CONACYT, UPAEP, FUPPUE. México. 85 p.
- López-Ferrari, A. R.; A. Espejo-Serna. 2002. Amaryllidaceae. In: Sosa V.; L. C. Rodríguez; T. Duncan; M. T. Mejía-Saulés; N. P. Moreno; M. Nee; L. I. Nevling; J. Rzedowski; B. G. Schubert (eds.). Flora de Veracruz. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México. 32 p.
- Mohamed-Yasseen, Y. 2002. In vitro micropropagation of spider lily (*Hymenocallis speciosa* L.). Arab Universities Journal of Agricultural Sciences 10: 311-318.
- Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.
- Ortiz, M. E. 1996. Juventud e inducción a floración en *Sprekelia formosissima* Herbert. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo Edo. de México, México.
- Reiche, C. 1977. Flora excursoria en el Valle Central de México. IPN. México D.F. 259 p.
- Sánchez, S. O. 1979. La Flora del Valle de México. Herrero. México, D. F. 103 p.
- Skalická, A. 1993. Enciclopedia de las plantas de interior. SUSAEETA EDICIONES pp: 232-233, 351 p.
- Santos, A.; F. Fidalgo; I. Santos; R. Salema. 2002. In vitro bulb formation of *Narcissus asturiensis*, a threatened species of Amaryllidaceae. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77: 149-152.
- SAS. 1998. SAS User's guide: Statistics. Version 6.12. SAS Institute, Cary, N.C. 1 848 p.
- Tipirdamaz, R. 2003. Rooting and acclimatization of in vitro micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker) bulblets. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 16: 121-126.
- Van Dijk, H.; M. Kupershoek. 2003. La enciclopedia de las plantas bulbosas. Libsa. Madrid. 336 p.
- Ziv, M.; Lilien-Kipnis, H. 1997. The inflorescence stalk: A source of highly regenerative explants for micropropagation of geophytes. Acta Horticulturae 447:107-112.