

“DESARROLLO DE SISTEMAS PARA LA PROPAGACION MASIVA Y CONSERVACION DE GERMOPLASMA IN VITRO DE 20 ESPECIES MEXICANAS DE CACTACEAS”

M.C. Eugenio Pérez Molphe Balch¹ / Biól. Enrique Villalobos Amador² / Biól. Ernestina Meza Rangel³
IBQ Hugo Lizalde Viramontes⁴ / Departamento de Química. Centro Básico

36

INTRODUCCION

Uno de los mayores problemas que enfrenta hoy en día la humanidad lo es sin duda la desaparición de especies animales y vegetales que se da debido a la explotación irracional y a la falta de conciencia tanto de los individuos como de los gobiernos. La rápida disminución de las poblaciones vegetales así como la extinción de especies enteras además de causar un drástico desbalance ecológico, nos privan de la oportunidad de aprovechar racionalmente la enorme fuente de recursos que representan. Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (I.U.C.N. 1983) las cactáceas ocupan un sitio preponderante entre las familias vegetales con especies en peligro de extinción, debido básicamente a la destrucción de su hábitat natural y a la enorme sobreexplotación a la que están sometidas sobre todo aquellas especies con alto valor como ornamentales. Otro problema que se presenta con este grupo de plantas es la baja capacidad de recuperación de las poblaciones naturales que muestran la gran mayoría de las especies que lo forman. Esto se debe a su lento crecimiento, a la autoincompatibilidad que impide la reproducción sexual de individuos aislados y a la alta mortandad de las plántulas debido a factores ambientales y a la predación. Por otro lado, México es considerado como el centro de diversidad genética de esta familia y es el país que cuenta con un mayor número de especies de cactáceas, las cuales constituyen sin duda una de las riquezas que menos hemos sabido aprovechar. Esto a pesar de su alto potencial como fuente de alimentos, fármacos, materias primas para la industria como por ejemplo, colorantes, así como su alto valor ornamental que las hace altamente apreciadas a nivel mundial. Por otro lado, estas plantas tienen la capacidad natural de sobrevivir en ambientes extremos y están perfectamente adaptadas a las zonas áridas y semiáridas de nuestro país. Por desgracia, hoy en día la gran mayoría de las cactáceas mexicanas están amenazadas por la extinción y es muy poco lo que se ha hecho para aprovecharlas de una manera racional, lo que hace que su situación sea verdaderamente crítica. Este saqueo y destrucción del hábitat continúa a pesar que ya

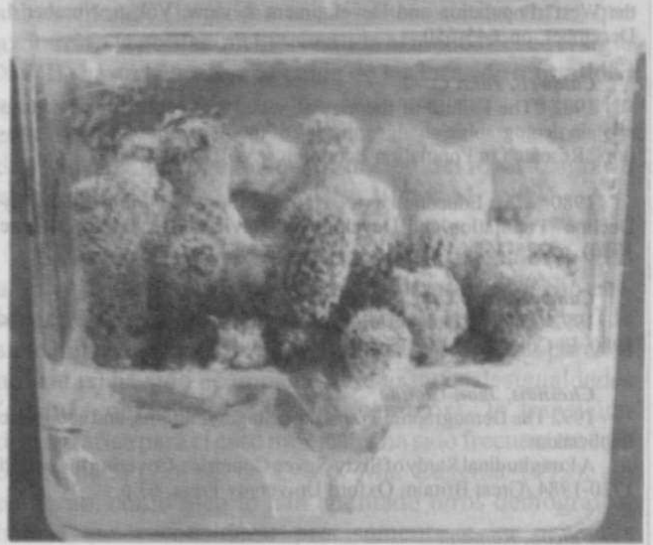


FIG. 5 Algunos aspectos de los sistemas de proliferación in vitro de Cactáceas desarrollados a partir de explantes laterales. Nótese el número de brotes producidos, cada uno de los cuales se convertirá en una nueva planta. *Mammillaria formosa*

desde el año de 1940 el presidente Cárdenas decretó medidas para la protección de las Cactáceas y Orquídeas en México (Diario Oficial de la Nación, Agosto de 1940), las cuales por desgracia nunca se llevaron realmente a la práctica. Por lo anterior resulta urgente llevar a cabo acciones que detengan por un lado el rápido deterioro de las poblaciones naturales de estas plantas que podría llevar a la extinción a muchas especies, y por otro permitan la explotación racional del enorme recurso que representan. Una de las alternativas más alentadoras para lograr esto la ofrece la Biotecnología Vegetal mediante la técnica conocida como micropropagación o propagación masiva in vitro, la cual consiste básicamente en obtener un número muy alto de nuevas plantas partiendo de fragmentos mínimos de tejido vegetal cultivado en medios artificiales, bajo condiciones perfectamente controladas. De esta forma es posible propagar masivamente de una manera muy rápida especies en peligro de extinción partiendo de sólo un pequeño trozo de una planta o de unas cuantas semillas, permitiendo así el aprovechamiento de la especie sin dañar a las poblaciones naturales o incluso utilizando las

1 Profesor-Investigador del Centro Básico
2 Estudiante de la Maestría en Ciencias Básicas
3 Tesista
4 Jefe del Departamento de Química

plantas así producidas para repoblar el ambiente natural (siempre y cuando se mantenga la diversidad genética necesaria para que la población natural sea viable). De esta manera se logró por ejemplo la recuperación de la especie *Mammillaria san-angelensis* la cual se consideraba prácticamente extinta y sólo sobrevivían cinco ejemplares en una reserva ecológica de la UNAM. En este caso mediante la micropropagación a partir de sólo algunas semillas de las planta sobrevivientes se produjeron los ejemplares suficientes para asegurar la supervivencia de la especie al menos en jardines botánicos y sitios controlados (Martínez-Vázquez y Rubluo 1989). Los primeros trabajos en que se intenta la multiplicación in vitro de Cactáceas datan de los años 70, aunque en ese entonces se logró poco éxito. En 1977, Mauseth reporta que hasta esa fecha se tenían reportes de 11 especies de cactáceas cultivadas con esta técnica, de las cuales sólo se obtuvo tejido calloso y no se logró la micropropagación. En 1979 Johnson y Emino intentan por su parte la micropropagación de 8 especies, obteniendo tejido calloso de todas ellas, formación de raíces en 6 y producción de brotes únicamente en 4 (*Hyllocereus*, *Rhipsalis*, *Epiphyllum grandiflorum* y *Weberocereus*). A partir de los años 80 se ha tenido un éxito mayor y se ha logrado la micropropagación de especies como *Opuntia amyclaea* (Escobar y Col. 1986), *Ferocactus acanthodes* (Ault y Blackmon 1987), *Mediocactus coccineus* (Infante 1992), *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo 1992) y algunas otras. Por desgracia, el número de especies mexicanas de cactáceas amenazadas por la extinción es muy grande y hasta la fecha son muy pocos los trabajos de este tipo, además la mayoría de los que se encuentran en la literatura han sido realizados en el extranjero. Debido a lo anterior es muy importante el desarrollo de sistemas para el cultivo y micropropagación in vitro que sea aplicable a las especies mexicanas de cactáceas y de esta manera ofrecer esta nueva opción para su conservación. Otra enorme ventaja de esta técnica es que nos permite la creación de bancos de germoplasma in vitro, donde se conservan las especies en un espacio y con un mantenimiento mínimos, fuera del alcance de los fenómenos ambientales y de la depredación humana, pero manteniéndose disponibles para cualquier aprovechamiento racional de las mismas.

En este trabajo, realizado en el Depto. de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se reporta el desarrollo de sistemas para la micropropagación así como la generación de un banco de germoplasma in vitro de 20 especies de cactáceas mexicanas, la mayoría de ellas con alto valor ornamental y algunas utilizadas como materia prima en la elaboración de los dulces conocidos como biznagas.

METODOLOGIA

Las especies trabajadas se seleccionaron tomando como criterios su importancia como ornamentales o fuente de alimento, la disponibilidad de material para iniciar los

cultivos y la falta de sistemas eficientes para propagarlas por métodos convencionales. Además, todas estas especies están amenazadas en mayor o menor medida en sus hábitats naturales. En la Fig. 3 puede verse el listado completo de las especies trabajadas. El desarrollo de sistemas para la propagación in vitro de estas cactáceas constó de varias etapas (Fig. 1), cada una de las cuales implicó la realización de una serie de experimentos tendientes a encontrar las condiciones óptimas para cada especie. Una vez obtenido el material inicial, que en la mayoría de las especies fueron algunas semillas y en otras fragmentos de plantas adultas, se procedió al establecimiento de cultivos in vitro de cada una de ellas. En el caso de las semillas, éstas se esterilizaron con etanol al 70% y blanqueador comercial al 15-20% (los tiempos de tratamiento variaron según la especie y el tipo de material), se enjuagaron con agua destilada estéril y se inocularon en medio de cultivo de Murashige y Skoog gelificado con 10 g/l de agar. En estos cultivos la contaminación fue mínima. Para el material adulto, se utilizó el mismo proceso para la esterilización pero el material fue pretratado con fungicidas y se aplicó vacío durante el tratamiento con cloro. En este caso, los fragmentos de tejido que contenían una yema, se inocularon directamente en los tratamientos indicados en la Fig. 2. Cuando se partió de material adulto para iniciar los cultivos, la contaminación llegó hasta el 60% de los recipientes inoculados. Después de un tiempo que según la especie varió de 2 a 4 meses desde la inoculación de la semilla, se generaron plántulas in vitro de un tamaño entre 5 y 15 mm las cuales fueron utilizadas como fuente de los explantes para los experimentos de proliferación (se denomina explante al fragmento de tejido vegetal utilizado para iniciar un cultivo). Para lo anterior, las plántulas se dividen en un explante apical y dos explantes laterales, eliminando únicamente la parte basal con las raíces. Para lograr la formación y proliferación de brotes in vitro se probaron varios tratamientos con reguladores del crecimiento vegetal (Fig. 2) sobre un medio base de Murashige y Skoog y mediante análisis estadístico se seleccionó aquella que resultara la mejor para cada especie. El número de repeticiones fue diferente para cada especie de acuerdo a su respuesta particular, pero en cualquier caso el mínimo fue de 25 explantes por tratamiento. Los cultivos en proliferación se mantienen mediante subcultivos a medio fresco cada dos meses aproximadamente. En algunas especies se presentó en los primeros experimentos un trastorno fisiológico conocido como vitrificación, lo cual se solucionó de manera muy satisfactoria incrementando la concentración de agar en el medio hasta 12 g/l. Por otro lado, en algunas otras especies se presentó necrosis por excreción y oxidación de compuestos fenólicos. Esto se solucionó también de manera satisfactoria añadiendo al medio de cultivo polivinilpolipirrolidona (5 g/l) para absorber los compuestos excretados. Una vez optimizadas las condiciones para la proliferación, se procedió a desarrollar sistemas adecuados para la elongación y enraizamiento de los brotes producidos. Para esto se probaron medios de cultivo con 0.5 y 1.0 mg/l de

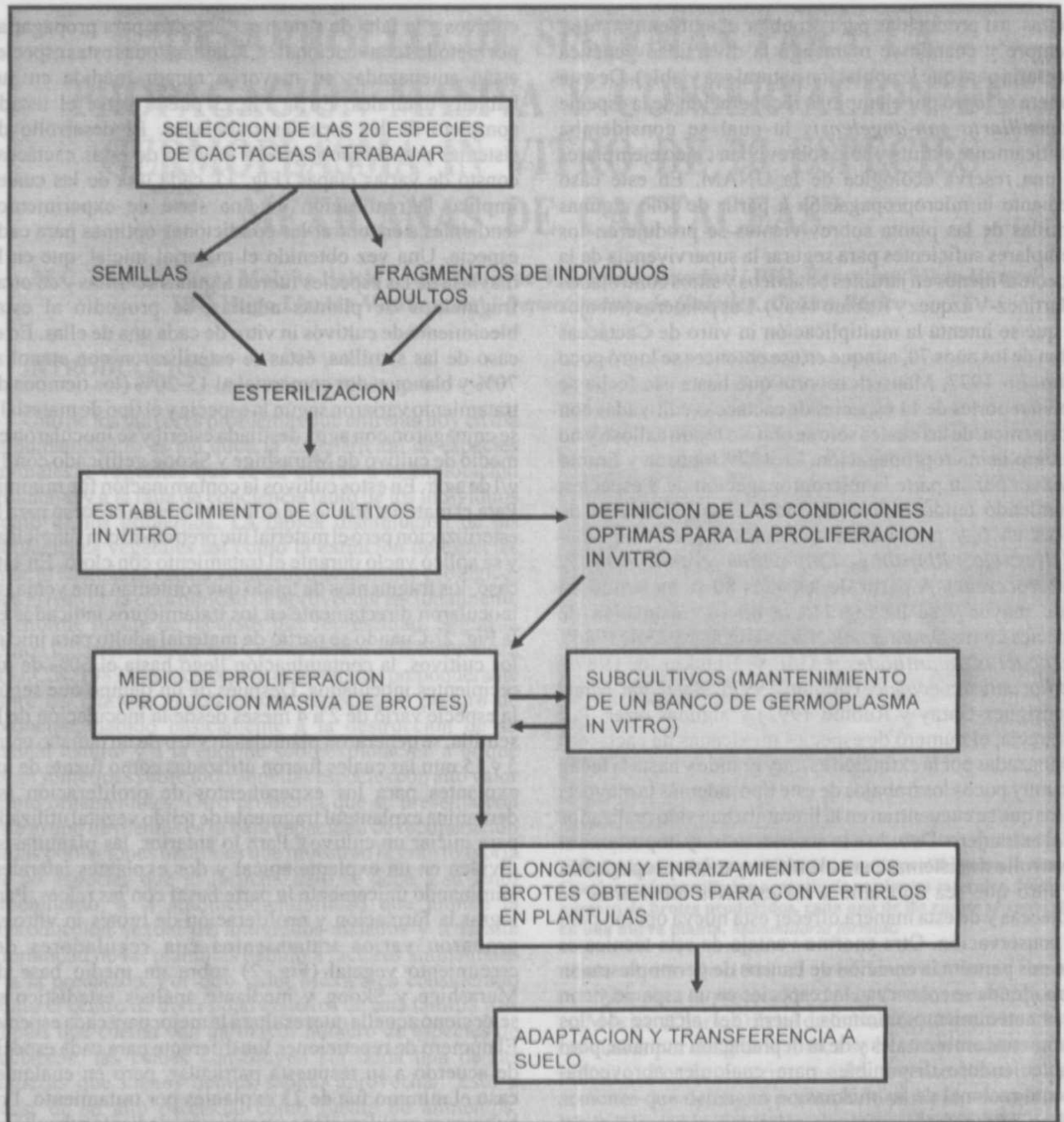


FIG. 1. Esquema general de la metodología empleada para la propagación masiva in vitro de cactáceas.

ac. indolacético o ac. indolbutírico y con o sin 3-5 g/l de carbón activado. Después de 1-2 meses se registraron los resultados para cada especie y se determinó el mejor medio para cada una de ellas. La incubación de los cultivos se realizó en todos los casos bajo un fotoperíodo 16:8 y aproximadamente a 26°C. Una vez enraizados los brotes, se pasó al proceso de adaptación y transferencia a suelo. Para esto, se quitó el sello de los recipientes de cultivo y se abrieron parcialmente para permitir una disminución paulatina de la humedad relativa interna y de esta manera permitir la adaptación de la plántula al ambiente externo. Aproximadamente a los 15 días después de destapado el

frasco, se sacaron las plántulas y se lavó perfectamente el medio de cultivo de las raíces para luego sembrarlas en un sustrato formado por 50% arena y 50% germinaza. Las plantas se colocaron bajo una cubierta plástica en el invernadero, y al dar señales de crecimiento se retiró la cubierta y se trataron ya como plantas normales. De manera alternativa se probó el enraizamiento in vivo de los brotes producidos, tomándolos directamente del medio de proliferación y tratándolos con un enraizador comercial (RAIZONE) antes de transferirlos al sustrato. Por último, los cultivos en fase de proliferación se mantienen hasta la fecha subcultivándolos a medio nuevo cada dos meses, lo

MEDIO DE CULTIVO: Medio de Murashige y Skoog pH 5.8 con 3% de sacarosa, gelificado con 8-12 g/l de agar y 500 mg/l de MES como estabilizador de pH. Para algunas especies se utilizaron 3-5 g/l de polivinilpirrolidona para evitar la necrosis por oxidación. Los tratamientos con reguladores del crecimiento probados fueron:

1. 0.1 mg/l de benciladenina
2. 1.0 mg/l de benciladenina
3. 2.0 mg/l de benciladenina
4. 1.0 mg/l de benciladenina + 0.01 mg/l de ac. naftalenacético
5. 1.0 mg/l de benciladenina + 0.10 mg/l de ac. naftalenacético
6. 1.0 mg/l de benciladenina + 1.00 mg/l de ac. naftalenacético

FIG. 2. Medio de cultivo y tratamientos probados para la proliferación in vitro de brotes de cactáceas

ESPECIE	MEJOR MEDIO (Fig. 2)	NUMERO PROMEDIO DE BROTES POR EXPLANTE EN EL MEJOR MEDIO
<i>Astrophytum myriostigma</i>	2 y 4	9.230 ± .917
<i>Carnegiea gigantea</i>	3	3.125 ± .715
<i>Cephalocereus senilis</i>	2 y 4	2.825 ± .490
<i>Coryphantha clavata</i>	2	4.730 ± .512
<i>Coryphantha durangensis</i>	4	4.375 ± .492
<i>Coryphantha radians</i>	2	4.150 ± .475
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	2	9.000 ± .985
<i>Echinocereus dubius</i>	2 y 4	4.875 ± .722
<i>Echinofossulocactus sp.</i>	2	12.050 ± 1.65
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	5	5.830 ± .625
<i>Ferocactus histrix</i>	4	5.620 ± .630
<i>Ferocactus latispinus</i>	5	5.333 ± .834
<i>Ferocactus pilosus</i>	5	5.125 ± .450
<i>Mammillaria candida</i>	2	13.250 ± 2.37
<i>Mammillaria craigii</i>	2	4.656 ± .349
<i>Mammillaria formosa</i>	5	4.425 ± .460
<i>Mammillaria obscura</i>	5	4.781 ± .510
<i>Mammillaria sphaelata</i>	2 y 4	17.500 ± 2.56
<i>Mammillaria uncinata</i>	2	5.250 ± .432
<i>Nyctocereus serpentinus</i>	3	2.150 ± .752
<i>Stenocactus coptonogonus</i>	2	16.750 ± 2.47

FIG. 3. Resultados de los experimentos diseñados para la proliferación in vitro de brotes a partir de explantes laterales de cactáceas

ESPECIE	INICIO	SUBCULTIVO 1	SUBCULTIVO 2	SUBCULTIVO 3
<i>Astrophytum myriostigma</i>	9.23	171.50	3165.90	58442.51
<i>Carnegiea gigantea</i>	3.12	19.47	121.50	758.16
<i>Cephalocereus senilis</i>	2.82	15.90	89.68	505.79
<i>Coryphantha clavata</i>	4.73	44.75	423.33	4004.70
<i>Coryphantha durangensis</i>	4.37	38.19	333.78	2917.24
<i>Coryphantha radians</i>	4.15	34.44	285.85	2372.55
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	9.00	162.00	2916.00	52488.00
<i>Echinocereus dubius</i>	4.87	47.43	461.97	4499.59
<i>Echinofossulocactus sp.</i>	12.05	290.40	6998.64	168667.22
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	5.83	67.98	792.65	9242.30
<i>Ferocactus histrix</i>	5.62	63.17	710.03	7980.74
<i>Ferocactus latispinus</i>	5.33	56.82	605.70	6456.76
<i>Ferocactus pilosus</i>	5.12	52.43	536.88	5497.65
<i>Mammillaria candida</i>	13.25	351.12	9304.68	246574.02
<i>Mammillaria craigii</i>	4.66	43.43	404.77	3772.46
<i>Mammillaria formosa</i>	4.42	39.07	345.38	3053.16
<i>Mammillaria obscura</i>	4.78	45.70	436.89	4176.67
<i>Mammillaria sphacelata</i>	17.50	612.5	21437.50	750312.50
<i>Mammillaria uncinata</i>	5.25	55.12	578.76	6076.98
<i>Nyctocereus serpentinus</i>	2.15	9.24	39.73	170.84
<i>Stenocactus coptonogonus</i>	16.75	561.12	18797.52	629716.92

FIG. 4. Tasas de multiplicación potencial con base en los resultados obtenidos para cada una de las especies de cactáceas estudiadas. (Por ejemplo, en *A. myriostigma* después de un ciclo de cultivo de un solo explante se producen 9.23 nuevas plántulas, cada una de las cuales proporciona dos explantes laterales. Si estos son subcultivados para proliferación producirán al final del segundo ciclo 171.5 nuevas plantas. Si el proceso se repite, se tendrán 3165.9 plantas al final del tercer ciclo y 58442.51 al final del cuarto).

cual constituye una reserva permanente de material conocida también como banco de germoplasma.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para la etapa de establecimiento de cultivos in vitro de las especies seleccionadas partiendo de semillas no se tuvieron mayores problemas, lográndose con éxito en todas las especies en que se intentó. Por lo que respecta al establecimiento de cultivos a partir de fragmentos de material adulto, esto aunque se logró, resultó bastante más complejo debido a la dificultad para la esterilización del explante. La fase más complicada del proyecto la constituyó el desarrollo de los sistemas de proliferación, esto debido al gran número de experimentos que se realizaron en tres fases diferentes. Primeramente se realizó una fase de estudios preliminares con unas pocas especies probando un gran número de variables como reguladores del crecimiento, concentraciones de sacarosa, gelificantes, etc. Con los resultados obtenidos en esta primera fase de experimentación se diseñaron los tratamientos mostrados en la Fig. 2 los cuales se aplicaron en una segunda fase a todas las especies trabajadas. En algunos casos se realizó

una tercera serie de experimentos probando otros reguladores del crecimiento aunque los resultados no fueron muy superiores a los obtenidos en la segunda serie. De acuerdo a lo anterior y a manera de simplificación, en lo sucesivo sólo se hará referencia a la segunda serie de experimentos con los tratamientos de la Fig. 2. En la mayoría de las especies la producción de brotes fue satisfactoria (Fig. 3), obteniéndose un rango de entre 2.150 brotes por explante en *Nyctocereus serpentinus* y 17.500 brotes por explante en *Mammillaria sphaclata*. Por lo general, los mejores tratamientos para la proliferación fueron aquellos con baja concentración de benciladenina con o sin una muy baja cantidad de ac. naftalenacético. Las concentraciones más altas de reguladores del crecimiento por lo general favorecen la proliferación excesiva de tejido calloso lo cual va en detrimento de la producción de brotes. En todos los casos los brotes se originan a partir de regiones meristemáticas preexistentes en el explante por lo que no se puede hablar de un proceso de real organogénesis. En cuanto al tipo de explante, los laterales tienen una mucho mejor respuesta que los apicales en cuanto a número y homogeneidad de los brotes generados, esto debido muy probablemente a la subsistencia de la



41

FIG. 5 Algunos aspectos de los sistemas de proliferación in vitro de Cactáceas desarrollados a partir de explantes laterales. Nótese el número de brotes producidos, cada uno de los cuales se convertirá en una nueva planta. Arriba a la izquierda *Coryphantha durangensis*. Arriba a la derecha: *Echinocactus platyacanthus*. Al centro de la hoja: *Ferocactus latispinus*.

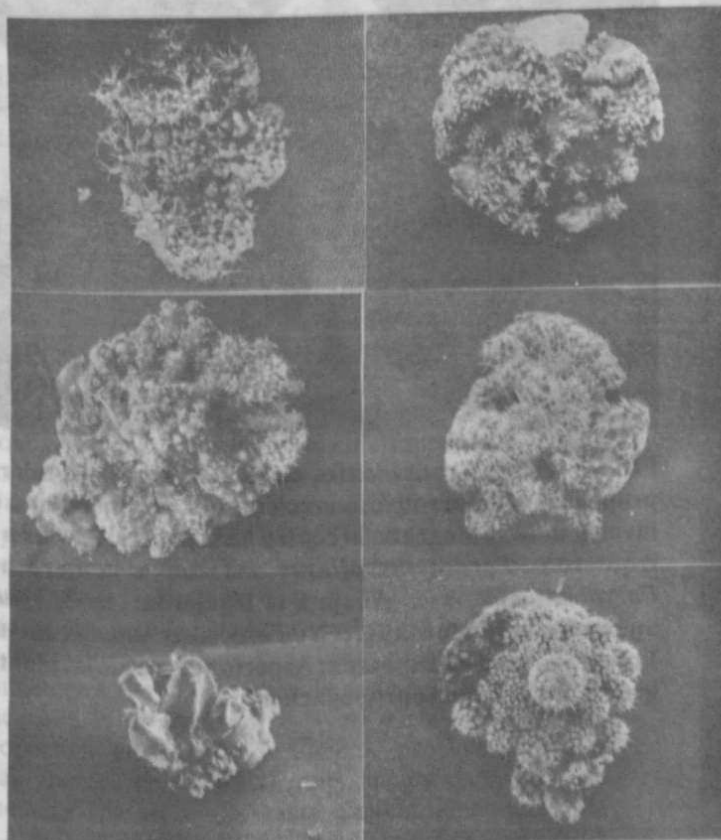
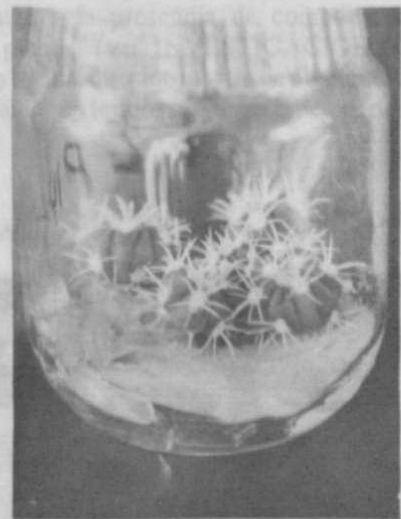


FIG. 6 Explantes laterales de diferentes especies de Cactáceas después de un ciclo de cultivo en medio de proliferación. Nótese el número de brotes producidos por explante. Los explantes fueron retirados del recipiente de cultivo para tomar las fotografías. Arriba a la izquierda: *Ferocactus histrix*. Arriba a la derecha: *Stenocactus coptonogonus*. Centro a la izquierda: *Echinocereus dubius*. Centro a la derecha: *Mammillaria candida*. Abajo a la izquierda: *Astrophytum myriostigma*. Abajo a la derecha: *Mammillaria sphacelata*.

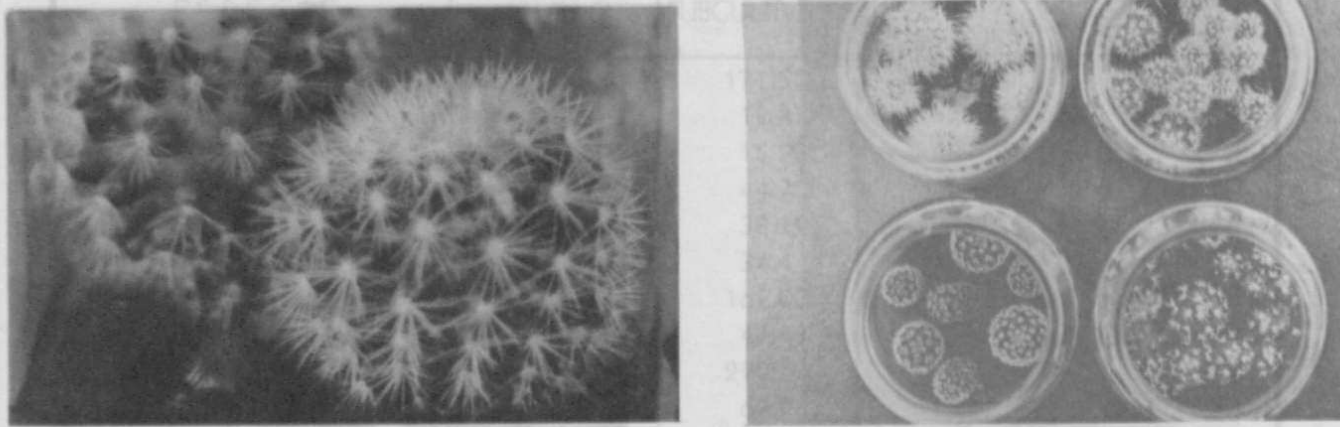


FIG. 7 Brotes diferenciados de diferentes especies de Cactáceas en medio para enraizamiento. Fotografía izquierda: Plantas de *Mammillaria candida* creciendo in vitro. Fotografía derecha. Arriba a la izquierda: *Echinofossulocactus* sp. Arriba a la izquierda: *Mammillaria candida*. Abajo a la izquierda: *Mammillaria formosa*. Abajo a la derecha: *Stenocactus coptonogonus*.



FIG. 8 Plantas procedentes de los sistemas de micropropagación desarrollados creciendo ya en condiciones de invernadero. Fotografía al centro de la página. Arriba a la izquierda: *Ferocactus pilosus*. Arriba a la derecha: *Coryphantha clavata*. Abajo a la izquierda: *Astrophytum myriostigma*. Abajo a la derecha: *Ferocactus hamatacanthus*. Fotografía inferior izquierda: Aspecto general de las plantas generadas por micropropagación

dominancia apical que inhibe el desarrollo en los meristemas axilares permitiendo únicamente el desarrollo adecuado del brote apical. Otra observación interesante es que en muchas especies la capacidad de formación de brotes al parecer se incrementa en cada subcultivo en medio de proliferación, quizá debido a la mayor adaptación del tejido a las condiciones de cultivo *in vitro*. Sin embargo, para los resultados mostrados en las Fig. 3 y 4 se toma en cuenta únicamente la producción de brotes al primer subcultivo por lo que las cifras reales en cuanto a productividad después de varios subcultivos pueden ser un poco mayores. Los principales problemas encontrados en la etapa de proliferación *in vitro* fueron la oxidación y la vitrificación de los tejidos, los cuales se solucionaron satisfactoriamente como se describe en la metodología. La primera se presentó básicamente en las especies del género *Coryphantha*, mientras que la segunda se llegó a observar en la mayoría de las especies aunque no representó un problema serio. En cuanto al estado de diferenciación de los brotes producidos, este fue satisfactorio en la gran mayoría de los casos por lo que resultó sencillo aislarlos y transferirlos al medio de enraizamiento. En los pocos casos en que se presentaron brotes poco diferenciados o muy pequeños, se probó un tratamiento con ac. giberélico para favorecer la elongación, sin embargo los resultados de esto fueron poco claros por lo que no se puede recomendar dicho tratamiento ya que significa un paso más en el esquema de propagación. Para todas las especies, el enraizamiento *in vitro* de los brotes se obtuvo sin dificultades en los medios de cultivo adicionados con ac. indolacético o ac. indolbutírico. El carbón activado al parecer también mostró un efecto benéfico en esta etapa. El proceso de adaptación y transferencia a suelo que se utilizó al parecer es el adecuado ya que se obtuvieron porcentajes de supervivencia de entre el 100 y el 75% en esta etapa. La mayoría de las pérdidas que se registraron en la transferencia a suelo se debieron a ataques de hongos y pudriciones aparentemente causadas por exceso de humedad por lo que se recomienda tener cuidado con este aspecto. El tratamiento con enraizador comercial resulta benéfico en esta etapa, independientemente de que las plantas cuenten ya con un sistema radical desarrollado, *in vitro*, esto debido a que el producto contiene fungicidas que protegen a la plántula en las primeras etapas en que se requiere mantener una alta humedad. Otra opción que se probó en algunas especies fue el enraizamiento *in vivo*, lo cual ahorra toda una etapa dentro del esquema de micropropagación, sin embargo mediante este sistema la supervivencia se reduce al 50-65% de las plantas generadas por lo que su conveniencia es indiscutible. Según lo observado el crecimiento de las plantas *in vitro* es mucho más rápido que en el medio natural, quizá debido a que se da de manera continua y no está sujeto a fenómenos ambientales o a deficiencias de agua o nutrientes. Esto hace que la propagación *in vitro* además de ser más productiva en cuanto a número, produce plántulas más grandes en menor tiempo, aunque debe aclararse que una vez en suelo, estas plantas tienen tasas de

crecimiento similares a las propagadas por métodos convencionales.

En conclusión, se han desarrollado sistemas para la propagación masiva *in vitro* de las 20 especies de cactáceas seleccionadas, con los cuales es factible la obtención de números considerablemente altos de plantas en un tiempo relativamente corto, partiendo de pequeños segmentos de tejido o bien de los cultivos establecidos con los que se cuenta ya en el laboratorio. La Fig. 4 nos da una buena idea del número de plantas que puede obtenerse mediante la metodología desarrollada, siendo la única limitante para ello la cantidad de recipientes de cultivo y reactivos así como la mano de obra destinada a ello. Por otro lado, se ha generado un banco de germoplasma de las especies trabajadas, a partir del cual se puede tomar material para estudios relacionados con estas plantas sin que esto implique colectarlas de su hábitat y por lo tanto dañar a las poblaciones naturales que aún quedan. De hecho, partiendo de este banco de germoplasma ya se han hecho estudios fitoquímicos referentes a la presencia de compuestos antivirales en estas plantas (ver INVESTIGACION Y CIENCIA 12:30-34) y a la producción *in vitro* de pigmentos del grupo de las betalainas en tejidos de varias especies del género *Mammillaria*.

BIBLIOGRAFIA:

Ault, J.M., Blackmon, W.J. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22: 126-127.

Escobar, H.A., Villalobos, V.M., Villegas, A. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 7:269-277.

Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocalcium coccineum* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 31:155-159.

I.U.C.N. 1983. *Rare and Threatened Plant List*. Threatened Committee Botanic Gardens Conservation, Coordinating Body. Kew, England.

Johnson, J.L., Emino, E.R. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and succulent Journal*. 51:275-277.

Martínez-Vázquez, O., Rublío, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada. *J. Horticultural Science*. 64:99-105.

Mauseth, J.D. 1977. Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal*. 59:80-81.

Meza-Rangel, E. 1994. Desarrollo de sistemas para la micropropagación de tres especies de Cactáceas del género *Mammillaria*. Tesis. Biología. U.A.A.

Rodríguez-Garay, B. Rublío, A. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal*. 64:116-119.

Villalobos-Amador, E. 1994. Desarrollo de sistemas para la micropropagación de Cactáceas de los géneros *Coryphantha*, *Ferocactus* y *Echinocactus*.