



# CONSERVACIÓN IN SITU Y EX SITU DE MAMMILLARIA MATHILDAE, CACTÁCEA ENDÉMICA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN DE LA CIUDAD DE QUERÉTARO

CONSERVATION *IN SITU* AND *EX SITU* OF *MAMMILLARIA  
MATHILDAE*, ENDEMIC, ENDANGERED CACTI OF  
QUERÉTARO CITY.

OSCAR R.  
GARCÍA RUBIO

GUADALUPE X.  
MALDA BARRERA

Laboratorio de Fisiología  
Vegetal, Facultad de  
Ciencias Naturales,  
Universidad Autónoma de  
Querétaro.  
osrigaru@gmail.com.

## Introducción

México alberga en su territorio el 10% de las plantas superiores del planeta entre las que destacan 277 especies de agaváceas, con 146 endémicas y 900 especies de cactáceas, con 715 endémicas (Arias 1993; García y Galvan 1995). Una cantidad sustancial de las especies de ambos grupos se encuentra bajo alguna categoría de riesgo (NOM-059-ECOL-2001); este fenómeno es ocasionado por una combinación de factores intrínsecos (e.g. bajos índices de reproducción y crecimiento) y antropogénicos (e.g. colecta ilegal y pérdida de hábitat por urbanización, ganadería y agricultura). En el estado de Querétaro los dos últimos factores son los de mayor amenaza para la sobrevivencia de las cactáceas, siendo las especies endémicas las más amenazadas (Sánchez y Galindo 1989). La protección de especies endémicas es más efectiva a través del manejo de sus poblaciones silvestres (conservación *in situ*). Sin embargo, para muchas especies cuyas poblaciones se encuentran francamente deterioradas, hay que emprender enfoques de conservación alternos.

La conservación *ex situ* (e.g. jardines botánicos), se aplica actual-

## Resumen

Se llevó a cabo la micropropagación de *Mammillaria mathildae*, con el propósito de re-introducirla a su hábitat. Utilizando medio MS, sin hormonas, se obtuvieron en 7 meses plántulas con un promedio de 1.78±0.04 cm de altura y 1.36±0.02 cm de diámetro. Éstas fueron inoculadas con un consorcio nativo de micorrizas por medio de un cultivo aeropónico. En 64 días se alcanzó el 100 % de micorrización; en 74 días, las plantas inoculadas aumentaron su altura (32%), diámetro (24%), biomasa (20%) y contenido de fosfato (60%) respecto del control. Además estas plantas alcanzaron una talla similar a la de plantas silvestres de 4 años de edad. En invernadero floreció el 64% mientras que en campo lo hizo el 14%. Seis meses después de la re-introducción, murió el 54% de plantas no micorrizadas; en contraste, sobrevivió un 89% de las infestadas.

**Palabras clave**– re-introducción; cultivo aeropónico; micropropagación; cactáceas

## Abstract

A micropropagation protocol was established for *Mammillaria mathildae* in order to reintroduce it to its natural habitat. After 7 months cultured in MS medium, plantlets 1.78±0.04 cm tall and 1.36±0.02 cm wide were developed without any hormone. These plantlets were then inoculated with a native mycorrhizal consortium, applied by an aeroponic culture system. Full colonization was achieved in 64 days. 10 days later mycorrhizal plantlets exhibited significant differences in height (32%), diameter (24%), dry matter (20%) and phosphate content (60%) compared to control ones. Furthermore, they reached a similar size to those grown wild for 4 years. 64% of mycorrhized plantlets bloomed in greenhouse, while in field only 14% did. 6 months after reintroduction 54%, of non mycorrhized out plantings died; in contrast, 89% of mycorrhized plants survived.

**Key words**– re- introduction; aeroponic culture; micropropagation; cacti

mente para preservar muchas especies vegetales. Una de sus estrategias es la micropropagación vegetal, que se ha empleado extensivamente en los últimos años (Viswambharan y col. 2006). Sus principales aplicaciones son la obtención de compuestos farmacológicos (Uei-Chern y col. 2006), la comercialización de especies en peligro (Ramirez-Malagon y col. 2007) y la obtención de plantas para su conservación *in situ* (Sudhersan y col. 2003; Bunn y col. 2005). Cuando las plantas se emplean para re-introducción se registran pérdidas significativas, lo que impide el establecimiento de una población viable a mediano plazo. Las causas de los bajos índices de sobrevivencia *in situ* se atribuyen a varios factores, entre los que destacan la escasa disponibilidad de agua y de nutrimentos (García y Malda 2008b), las altas temperaturas (Bethlenfalvay y col. 1984; Carrillo-García y col. 1999), la edad de las plántulas (Linares y col. 1995) y los bajos índices de crecimiento en su ambiente natural (Bashan y col. 2000).

El 95% de las plantas establece una relación simbiótica con microorganismos (Muthukumar y col. 2004; Brundrett 2002) y de éstos, las micorrizas vesículo arbusculares (MVA) son de particular importancia en zonas desérticas y semidesérticas, ya que juegan un papel fundamental en el incremento de la absorción de fosfatos y la toma de agua (Sylvia y col. 2003). Las micorrizas proporcionan a su hospedero una ventaja para soportar condiciones adversas en su ambiente, aumentando con ello su porcentaje de sobrevivencia (Bethlenfalvay y col. 1984; Carrillo-García y col. 1999; Bashan y col. 2000). Actualmente la inoculación de MVA se usa de forma comercial para incrementar la producción en campo de una gran variedad de plantas, desde ornamentales hasta forestales (Gianinazzi y Vosátka 2004).

*Mammillaria mathildae* es un cactus endémico, cuyas poblaciones se encuentran distribuidas al este de la ciudad de Querétaro, desde el Parque Nacional El Cimatario hasta el Área Natural Protegida (ANP) Cañada de Juriquilla. Debido al desarrollo urbano, su número ha disminuido hasta colocarla en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2001). De las poblaciones conocidas, la de Cañada de Juriquilla es la que presenta el mejor estado de conservación. En 2007 García y Malda (2008b) introdujeron un lote de plantas derivado

de cultivo de tejidos; sin embargo, sólo sobrevivió el 48% debido a la escasez de agua. En condiciones naturales, donde la estacionalidad del aporte de agua al sistema y la escasez de nutrimentos son una constante, se espera que las MVA expresen todo su potencial benéfico sobre sus hospederos. Por ello, nuestros objetivos principales son: 1) micropropagar plantas de *M. mathildae* por organogénesis directa en cultivo de tejidos, 2) probar un sistema de inoculación de MVA empleando cultivo aeropónico, y 3) estudiar la capacidad de un consorcio nativo de MVA para incrementar el porcentaje de sobrevivencia de un lote de *M. mathildae* re-introducida en su hábitat natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del área de estudio

García y Malda (2007) reportaron 7 poblaciones de *M. mathildae* en el oeste de la ciudad de Querétaro. La población protegida más grande (133 individuos en 2007) se localiza al NE de la ciudad, en la Cañada de Juriquilla, a 1890 msnm. La vegetación dominante es bosque tropical caducifolio en buen estado de conservación, compuesto por árboles de hasta 7 m, *Lysiloma microphylla*, *Bursera fagaroides* y *Ceiba aesculifolia*, que pierden su follaje entre 6 y 7 meses por año. Hay otras cactáceas, como *Mammillaria magnimamma*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Peniocereus serpentinus*, *Stenocereus dumortierii* y *Opuntia pubescens*. Durante la estación de lluvias surgen en la comunidad una buena cantidad de arbustos y malezas (e.g. *Anisacanthus quadrifidus*, *Jatropha dioica*, *Karwinskia humboldtiana*, *Ipomoea purpurea*, *Calliandra eriophylla*). El suelo es escaso, bien drenado y presenta afloramientos rocosos ígneos.

### Caracterización del área de re-introducción

Para caracterizar la parcela experimental se realizó la determinación de sus condiciones microclimáticas que se compararon con el hábitat de la población de *M. mathildae*. La radiación solar se determinó como flujo de fotones fotosintéticos expresado en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , usando un sensor de cuantos (LICOR modelo LI250) e interpolando las lecturas de un segundo sensor para calcular el índice de área foliar (Welles, 1990). Las determinaciones (por triplicado) se hicieron cada 10 m en un transecto de 70 m; a lo largo de la población de *M. mathildae* y del área de re-

introducción. Las lecturas se realizaron cuando las condiciones de iluminación solar no eran muy brillantes. La temperatura superficial se determinó con un sensor de temperatura infrarrojo (Tel-Tru 05025) entre las 12:00 y 14:00 horas. Los datos de precipitación se obtuvieron en la Comisión Nacional del Agua, de la estación meteorológica "Querétaro" (20° 35' N, 100° 24' W).

#### Micropropagación de *Mammillaria mathildae*

Se colectaron semillas de 62 individuos de *M. mathildae* (57.4% de la población). Con una mezcla de semillas, genéticamente representativa de la población, se iniciaron los cultivos *in vitro*. La micropropagación se hizo como lo describen García y Malda (2008b); que consistió en usar explantes escindidos de plántulas de 1 cm de altura germinadas asépticamente *in vitro*. La activación de aréolas y enraizamiento se logró empleando un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) libre de hormonas y adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.1 g L<sup>-1</sup> de *myo*-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> de hidrocloreto de tiamina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de hidrocloreto de piridoxina y 8 g L<sup>-1</sup> de agar. Los cultivos fueron mantenidos a 26±1 °C bajo un flujo fotosintético total de 120-130 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> emitido por lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 16 h luz. Como control, se sembraron semillas de *M. mathildae* en el área de estudio, usando charolas plásticas (para proteger a las plántulas de la herbivoría por insectos) rellenas del suelo proveniente del área de estudio.

#### Aislamiento del inóculo de MVA (cultivo trampa)

Se colectaron suelos de las rizósferas de *M. mathildae*, algunas plantas asociadas a ella (*J. dioica*, *O. pubescens*, *Melinis repens*, *L. microphylla*) y suelo sin vegetación, con los que se iniciaron los cultivos trampa. 500 g de suelo (conteniendo raíces finamente cortadas) se mezclaron con perlita (1:1) y se colocaron en macetas (15 cm ø por 20 cm de alto). Se germinaron de 60 a 65 semillas de *Sorghum vulgare* (ABC, 2005) como planta hospedera; en las macetas antes descritas y se mantuvieron en invernadero. Las macetas se regaron cada 2 días, y las plantas crecieron por un periodo de 10 a 12 semanas, después del cual se permitió

su secado gradual (por una o dos semanas) para promover la esporulación de las micorrizas. Los ciclos de propagación subsecuentes se realizaron como antes se describió, usando las raíces del sorgo cortadas y mezcladas con el mismo suelo. Los cultivos no recibieron fertilización.

#### Conteo de esporas

Las esporas *in situ* fueron aisladas a partir de una muestra de 50 g de suelo, a ésta se le adicionaron 4 L de agua y se agitó vigorosamente por 3 min. Tras 1 min de reposo la mezcla se vertió sobre una serie de tamices (1 mm, 177, 45 y 38 μm). La operación se repitió 2 veces más para extraer el mayor número de esporas de la muestra. El material del último tamiz se colectó en un matraz, se metió a un gradiente de sacarosa 20-60 % en tubos de 15 mL, y se centrifugó a 1,500 g por 3 min. El sobrenadante se decantó sobre el tamiz de 38 μm y el material recuperado se lavó por 2 min con agua corriente. Las esporas saludables se colectaron manualmente y se almacenaron en tubos Eppendorf con agua, se guardaron a 4 °C por 48 h. Cualquier espora atípica o muerta se descartó en este tiempo. Para su conteo, las esporas se transfirieron a una caja de Petri y se examinaron con un microscopio a 40X.

Para obtener las esporas de los cultivos trampa; las raíces de sorgo se lavaron con agua corriente para remover el suelo. Las raíces se cortaron y licuaron con agua destilada a alta velocidad por aproximadamente 5 seg para liberar las esporas. El material licuado se pasó a través de los tamices y se siguió el método antes descrito.

#### Inoculación de MVA y cultivo aeropónico

Se inocularon plántulas de *M. mathildae* de 7 meses (1.79±0.04 cm de alto y 1.37±0.02 cm de diámetro en promedio) al escurrir sobre sus raíces 200 μl de una solución de 15 g L<sup>-1</sup> de alginato de sodio conteniendo 1,025 esporas mL<sup>-1</sup>. Las raíces se sumergieron inmediatamente en una solución 0.05 M de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O para solidificar el alginato (Weber y col. 2005). Las plántulas se acomodaron en el sistema de cultivo aeropónico (unidad de alta capacidad por AgriHouse, Inc. Div. Aeroponics International) con medio nutritivo MS. Las raíces se aspersaron durante 5 seg cada 30 min las 24 horas del día. La solución nutritiva se cambió

cada semana. El cultivo se mantuvo a  $26 \pm 1$  °C y fue iluminado bajo las mismas condiciones de los cultivos *in vitro*.

### Estimación de la colonización por MVA

Las raíces limpias y cortadas en secciones de 1 cm, se aclararon sumergiéndolas 5 min en una solución de KOH al 10% en “baño María”; después se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con tinta china negra (Shaeffer) disuelta en una solución de ácido acético al 5% (vol/vol) como lo describe Vierheilig y col. (1998). 30 porciones de raíces se examinaron con un microscopio a 40X para detectar la colonización de las MVA siguiendo el método de intersección en gradilla descrito por Giovannetti y Mosse (1980). La frecuencia de infección por micorrizas (F%) se calculó mediante la ecuación  $(IR \times 100)/TR$ , donde IR corresponde a las raíces infectadas y TR se refiere al total de segmentos de la muestra.

### Aclimatación y re-introducción

Las plántulas micorrizadas y no micorrizadas, se transplantaron a maceteros de 2.5 cm  $\phi$  empleando una mezcla comercial de suelo para siembra (1:1 Pro-Moss, Premier® y Hortiperl, Termalita®). Se cubrió por una semana con plástico para evitar la desecación excesiva y para la segunda semana se colocaron en un sombreadero (50% de luz solar). Las plantas se regaron cada tercer día hasta su transferencia al campo.

100 plantas colonizadas con MVA y 100 plantas sin MVA (control) se plantaron en una parcela experimental de 75 X 10 m ubicada en la Cañada Juriquilla. Las plantas se midieron (diámetro y altura) y se marcaron sistemáticamente. Los porcentajes de sobrevivencia se determinaron cada 3 días la primera semana; después, se determinó cada semana durante un mes. Eventualmente el registro se hizo cada mes.

### Determinación de la concentración de fósforo

El contenido de P se determinó por una digestión micro Kjeldahl del material seco de plantas micorrizadas y no micorrizadas obtenidas del cultivo aeropónico. Las plantas se secaron en un horno por 48 h a 70 °C y se molieron hasta obtener un polvo. Se adicionaron 0.2 g al ácido sul-

fúrico concentrado siguiendo el método de reacción del cloruro estanoso. Se hicieron 4 réplicas por tratamiento (micorrizadas y control).

### Análisis estadísticos

Los datos de los diversos experimentos se analizaron con un ANDEVA  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se hizo con el programa JMP 6.0 (SAS Institute, Inc. 2005). Los datos en porcentaje se trataron previamente usando la transformación del arco seno para su análisis estadístico.

### Resultados y discusión

#### Micropropagación por cultivo de tejidos vegetales

La germinación de *M. mathildae* en condiciones naturales es del 40%. En contraste, bajo condiciones *in vitro*, se alcanzó el 91% de germinación entre la segunda y tercera semanas. Para inducir la formación de tallos se probaron 3 tipos de explantes obtenidos de plántulas de 3 meses: basal, lateral y apical (tabla 1). La respuesta a las combinaciones hormonales de ácido butírico (AB) y ácido indol acético (AIA) resultó en una profusa producción de callo. Bajas concentraciones de AB produjeron pocos tallos por explante, pero con el concomitante desarrollo de callo. En contraste, en el medio libre de hormonas, los explantes apicales y laterales produjeron en dos meses un promedio de  $1.14 \pm 0.07$  y  $4.09 \pm 0.13$  tallos nuevos respectivamente, sin la generación de callo. El medio MS basal fue suficiente para la producción de tallos *in vitro*, contrario a los resultados observados en el género *Mammillaria* spp. (Papafotiou y col. 2001; Poljuha y col. 2003; Ramirez-Malagon y col. 2007) donde el uso de hormonas, especialmente citocininas es crucial para la generación de tallos. Clayton y col. (1990) mencionan que los cactus tienen la capacidad de sintetizar auxinas de forma autónoma; por tanto con la adición exógena de hormonas frecuentemente se produce callo. Evitar esta fase y la misma adición de hormonas es preferible porque estos factores pueden promover cambios genéticos indeseables en las plantas (Venkatachalam y col. 2007); sobre todo pensando en la re-introducción de especies silvestres (Viswambharan y col. 2006).

**Tabla 1.** Efecto del AB y AIA sobre la producción de tallos y callos sobre explantes de *M. mathildae*. Los resultados son el promedio de 2 experimentos separados.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )		No. tallos (promedio $\pm$ ee)			% de callos		
AB	AIA	Apical	Lateral	Basal	Apical	Lateral	Basal
0	0	1.14 $\pm$ 0.07	4.09 $\pm$ 0.13	0.59 $\pm$ 0.11	0	0	40.91
0	1.43	0	0	0	100	100	100
0	2.85	0	0	0	100	100	100
0	5.71	0	0	0	100	100	100
22.19	0	0.18 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.06	77.27	88.64	90.91
22.19	1.43	0	0	0	100	100	100
22.19	2.85	0.05 $\pm$ 0.05	0	0	95.45	100	100
22.19	5.71	0	0	0	100	100	100
44.39	0	0	0	0	100	100	100
44.39	1.43	0	0	0	100	100	100
44.39	2.85	0	0	0	100	100	100
44.39	5.71	0	0	0	100	100	100

**Tabla 2.** Efecto de la concentración del medio MS y de la [AIB] sobre la formación de raíces en tallos. Los resultados son el promedio de 2 experimentos separados.

MS	AIB ( $\mu\text{M}$ )	Formación de raíces (promedio $\pm$ ee)	% de callos
1.0	0.0	0.97 $\pm$ 0.03	0
1.0	4.9	0.10 $\pm$ 0.06	90
1.0	9.8	0	100
1.0	19.7	0	100
1.0	29.5	0	100
0.5	0.0	0.63 $\pm$ 0.09	0
0.5	4.9	0	100
0.5	9.8	0	100
0.5	19.7	0	100
0.5	29.5	0	100

El promedio de producción de tallos por organogénesis directa fue bajo, a diferencia de los rangos reportados para especies similares, como *Mammillaria san-angelensis* que con la adición de hormonas generó entre 21 y 35 tallos por explante (Martínez-Vázquez y Rubluo 1989). Palomino y col. (1999) comprobaron por medio de un análisis del cariotipo de *M. san-angelensis* su estabilidad genética, después de su cultivo y sub-cultivo *in vitro* adicionando hormonas. Sin embargo, este análisis no puede revelar alteraciones en genes específicos o pequeños arreglos cromosomales acontecidos (Rout y col. 1998; Venkatachalam y col. 2007). Los efectos de largo plazo de las posibles variaciones genéticas son indeterminados y sus repercusiones sobre el ecosistema son desco-

nocidas. Por ello, una baja producción de tallos con baja variación genética (medio sin hormonas) *versus* una alta producción de tallos de plantas con posibles alteraciones genéticas (medio con hormonas) es preferible cuando el objetivo es la integración de las plantas a su hábitat natural. Esto por supuesto, representa una estrategia de costo - beneficio favorable en el largo plazo.

Se probó medio MS completo y MS 1/2, ambos con y sin ácido indol butírico (AIB) para promover la formación de raíces en los tallos (tabla 2). Los explantes cultivados en medio MS completo mostraron una diferencia significativa en la frecuencia de formación de raíces respecto al medio MS 1/2 ( $F = 12.1849$  Prob.  $>F < 0.0009$ ).

En un periodo de 7 a 8 semanas se desarrolló un sistema radical vigoroso. Aunque se ha reportado el uso de fitohormonas para la inducción *in vitro* del crecimiento de raíces en cactus; *M. mathildae* enraizó de forma espontánea en un medio libre de hormonas. Esto se ha reportado en otros cactus (Wakhlu y Bahu 2000; Dávila-Figueroa y col. 2005; de Medeiros y col. 2006) particularmente en especies de *Opuntia* y *Agave* que tienden a desarrollar raíces *in vivo* (Escobar y col. 1986; Santacruz-Ruvalcaba y col. 1999; Mohamed-Yasseen 2002; Valenzuela-Sánchez y col. 2006). *M. mathildae*, exhibe de forma natural una alta regeneración de tallos y raíces (García y Malda 2008b). Coincidiendo con estos resultados, los estudios de regeneración en la cactácea *Rhipsalidopsis* mostraron que durante su cultivo *in vitro* se estimuló el metabolismo de las auxinas lo que favoreció la formación de tallos en un medio libre de hormonas (Sriskandarajah y col. 2006).

#### Aislamiento y selección del inóculo de MVA

Ha sido muy bien documentada la participación de hongos vesículo arbusculares en el establecimiento de plántulas ya que intervienen en los procesos de toma de agua y nutrimentos (especialmente P), agregación de suelos y protec-

ción contra componentes bióticos (Augé 2001; Rillig y Steinberg 2002; Koide y Mosse 2004; van der Heijden 2004; Vestberg y col. 2004). El uso comercial de inóculos benéficos se ha incrementado en fechas recientes; pero algunos estudios sugieren que el uso de inóculos nativos es más efectivo (Calvente y col. 2004). Esto es cierto, especialmente cuando el propósito es usarlo en ambientes silvestres. El uso de inóculos originados en otras áreas (exóticos) puede tener consecuencias no deseadas sobre el ensamblaje del ecosistema (Schwartz y col. 2006). Rudgers y col. (2004) describen para un sistema de pastizal, cómo los hongos vesículo arbusculares modifican la diversidad de los pastos al alterar sus capacidades para adquirir recursos (agua y nutrimentos). Por ello, en este trabajo se eligió emplear un inóculo nativo aislado en el área de reintroducción de la *M. mathildae*, que por ser local tiene la ventaja de encontrarse adaptado a las condiciones bióticas y abióticas de la región.

En la tabla 3 se puede ver el porcentaje de colonización de *M. mathildae* y algunas plantas asociadas a ella. Como se esperaba, todas las plantas contenían MVA; el pasto *M. repens* fue el que exhibió mayor grado de infestación. Respecto del número de esporas aisladas de las diversas

**Tabla 3.** Colonización por MVA de *M. mathildae* y flora asociada. # de esporas de MVA en las rizósferas de *M. mathildae* y flora asociada. Índices de esporulación durante los tres ciclos de los cultivos trampa.

Especies	Colonización de MVA (%)	# de esporas g suelo <sup>-1</sup>	Ciclos de esporulación (esporas g suelo <sup>-1</sup> )		
			1	2	3
<i>J. dioica</i>	47.73±0.98	15.03	27.47±1.39	35.43±1.70	77.43±3.26
<i>O. pubescens</i>	44.71±1.72	15.77	29.47±1.39	31.70±2.05	70.43±3.03
<i>M. mathildae</i>	34.13±1.29	17.47	28.33±1.91	34.57±3.35	76.37±1.88
<i>M. repens</i>	45.43±1.65	31.07	32.53±1.88	58.50±2.17	92.33±2.37
<i>L. microphylla</i>	43.71±0.86	18.17	29.60±1.91	32.87±2.24	71.63±2.43
Suelo desnudo	–	1.23	3.23±0.70	5.03±1.27	11.83±1.54

**Tabla 4.** Respuestas de crecimiento de *M. mathildae* inoculada y no inoculada con MVA en una cámara aeropónica.

	Colonización por MVA (F%) <sup>b</sup>	Plantas <sup>a</sup>		Biomasa (mg planta <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Fósforo (mg P <sup>-1</sup> p. s.) <sup>c</sup>
		Altura	Diámetro		
T. inicial	–	1.78±0.04	1.36±0.02	47.13±1.07	0.321±0.01
Control	0	1.99±0.07	1.54±0.03	56.79±0.90	0.344±0.01
Infestadas	100	2.91±0.05	2.03±0.03	69.21±1.32	0.552±0.01

<sup>a</sup> Promedio ± e.e., n = 120. <sup>b</sup> Promedio ± e.e., n = 14. <sup>c</sup> Promedio ± e.e., n = 4.

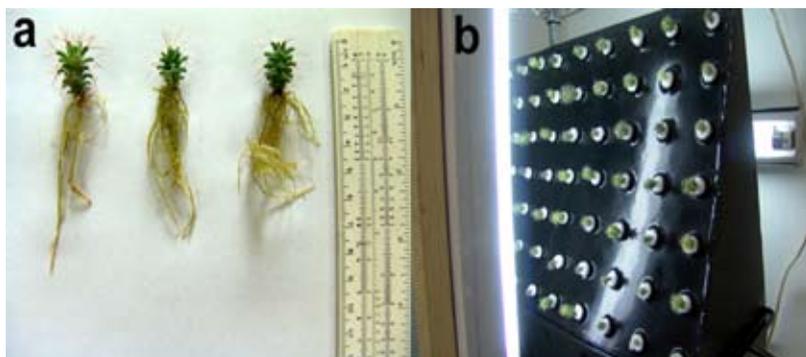


Figura 1. a) plántulas obtenidas por cultivo *in vitro*.  
b) cámara de crecimiento aeropónico.



Figura 2. *M. mathildae* floreciendo en  
a) la parcela experimental; y  
b) en el invernadero.

muestras (con excepción de la rizósfera de *M. repens*) no se detectaron diferencias significativas ( $F=1.9105$  Prob.  $>F<0.2064$ ). La biodiversidad de los hongos micorrizicos es relativamente baja, resaltando la presencia de Glomales (*Gigaspora* sp. y *Glomus* spp.). Con la finalidad de obtener suficientes esporas de MVA, se inició la estimulación de la esporulación mediante cultivos trampa de las rizósferas del cactus y flora asociada (tabla 3). Fue hasta el tercer ciclo de cultivo que se incrementaron significativamente los índices de esporulación. El cultivo con rizósfera de *M. repens* presentó el mayor valor ( $92.33 \pm 2.37$  esporas  $g$  suelo $^{-1}$ ), en cambio el cultivo procedente de la rizósfera de *M. mathildae* alcanzó los  $76.37 \pm 1.88$  esporas  $g$  suelo $^{-1}$ , valor significativamente similar al resto de los cultivos ( $F=1.9105$  Prob.  $>F<0.2064$ ). Es remarcable que en todos los cultivos trampa, con excepción del de *M. repens*, se perdió *Gigaspora* sp.; su desplazamiento puede atribuirse a la incompatibilidad de la micorriza con la planta hospedera empleada (sorgo). El trabajo de Liu y Wang (2003) ilustra que la diversidad de las esporas promovidas por los cultivos trampa está determinada directamente por el tipo de hospedero elegido. Una posible consecuencia es que el inóculo no pueda expresar todo su potencial en plantas no adaptadas a él (Enkhtuya y col.

2000). Por lo anterior, para este trabajo se eligió usar el inóculo de MVA aislado de la rizósfera de *M. mathildae*, que además de exhibir un buen índice de esporulación seguramente se encuentra adaptado a formar una relación simbiótica con *M. mathildae*.

#### Efecto del inóculo de MVA sobre el desarrollo de *M. mathildae*

La efectividad del inóculo nativo de MVA como promotor del crecimiento se probó en un cultivo aeropónico. Se emplearon plántulas micropropagadas de *M. mathildae* con un promedio de  $1.78 \pm 0.04$  cm de altura por  $1.36 \pm 0.02$  cm de diámetro (figura 1a). La infestación de las raíces tomó 60 días. En el día 74 las plantas inoculadas con MVA exhibieron, respecto del control, un tamaño significativamente mayor (tabla 4), tanto en diámetro ( $F=142.8399$  Prob.  $>F<0.0001$ ) y altura ( $F=116.5583$  Prob.  $>F<0.0001$ ), como en ganancia de biomasa ( $F=60.2369$  Prob.  $>F<0.0001$ ). La concentración de P del control no fue diferente respecto del contenido inicial ( $F=2.8094$  Prob.  $>F<0.1322$ ); en contraste, las plantas micorrizadas acumularon una cantidad significativamente diferente de P ( $F=237.3721$  Prob.  $>F<0.0001$ ).

El proceso de inoculación e infestación de plantas con MVA es más eficiente en un sistema de cultivo aeropónico (Weathers y Zobel 1992), ya que usando esta técnica es posible alcanzar un índice de infestación del 100% (Martin-Laurent y col. 1999). Experiencias de infestación con MVA en sustrato sólido reportan porcentajes de colonización inferiores. Pese a ello, se reporta ganancia de materia seca e incremento de P en una gran variedad de plantas; como en el cactus *Pachycereus pecten-aboriginum* (Rincón y col. 1993) o el árbol *Acacia mangium* (Martin-Laurent y col. 1999), especies florales y hortalizas (Weathers y Zobel 1992) y pastos (van der Heijden 2004). El crecimiento de *M. mathildae* en la cámara aeropónica (figura 1b), no presentó problemas en plantas micorrizadas y no micorrizadas (2.4% de mortalidad). 14 días después de haber registrado el 100% de colonización por MVA, las plantas mostraron una diferencia significativa en altura (32%), diámetro (24%) y peso (20%), además de acumular 60% más P en sus tejidos que las plantas control.

El uso del sistema de cultivo aeropónico para la inoculación de una mezcla de MVA fue exitoso. En 3 meses los cactus adquirieron la biomasa que bajo condiciones naturales les tomaría 1 año (observación personal). Martin-Laurent y col. (1999) demostraron que plantas de *A. mangium* infestadas con *Glomus sp.* crecieron dos veces más que las plantas cultivadas en suelo. El crecimiento de *M. mathildae* fue igual de dramático, las plantas aumentaron 0.66 cm de diámetro en 3 meses, en contraste a los 0.5 cm de diámetro que crecen en condiciones silvestres cada año. La respuesta más importante a la micorrización es el incremento en la adquisición nutrimentos, en particular fósforo, y la toma de agua. La elevada concentración de aire que presenta el cultivo aeropónico incrementa la respuesta de la simbiosis planta-hongo (Weathers y Zobel 1992), promoviendo los efectos registrados en este experimento.

### Selección del área de reintroducción

Con la finalidad de seleccionar un área adecuada para re-introducir el lote de *M. mathildae*, se contrastaron las condiciones microclimáticas del ámbito hogareño del cactus contra las de la parcela experimental. Ni la radicación solar, ni

la temperatura superficial mostraron diferencias significativas ( $F = 0.0234$  Prob.  $>F < 0.8815$  y  $F = 0.0075$  Prob.  $>F < 0.9327$  respectivamente) en ambas áreas.

La germinación y establecimiento de una planta en un ambiente silvestre es un evento multifactorial. Por ello, la selección de un sitio que cubra la mayoría de los aspectos microclimáticos es esencial para el correcto establecimiento de las plantas reintroducidas. La arquitectura del follaje de los árboles provee de microclimas particulares que pueden favorecer o no a una planta determinada. Este fenómeno es conocido como nodricismo. Las plantas nodrizas dotan de un microambiente que promueve el establecimiento de otras especies (Drezner y Garrity 2003). Las plántulas de *Mammillaria gaumeri* sólo sobreviven en ambientes con “buena” sombra (Leirana-Alcocer y Parra-Tabla 1999). Además, cambios en la composición de las nodrizas pueden tener un efecto negativo, ya que las arquitecturas del dosel son diferentes. A este respecto, Zúñiga y col. (2005) encontraron que *Lophophora diffusa* se asocia a *Larrea tridentata* y *Acacia sororia*, mientras que se disocia de *Celtis pallida*, que despliega una sombra más intensa que los otros arbustos.

*M. mathildae* crece en afloramientos rocosos, con pendientes de hasta 85° y se asocia fuertemente con dos árboles, *L. microphylla* y *B. fagaroides*; la cubierta vegetal que generan amortigua la temperatura superficial en 14 °C (García y Malda 2007). La parcela seleccionada contiene un manchón importante de ambas plantas, con menor presencia de *C. aesculifolia*, *K. humboldtiana* y *M. geometrizzans*; básicamente es un continuo de vegetación similar en el que se desarrolla *M. mathildae*.

### Aclimatación y sobrevivencia en campo

La aclimatación en invernadero no presentó mayores problemas. Después de 8 semanas la sobrevivencia fue de 98%. La re-introducción se realizó en octubre de 2007, al final de la temporada de lluvias. Se seleccionó esta fecha porque las lluvias más fuertes son capaces de desenterrar las plantas sembradas. Además, durante la estación húmeda, la herbivoría por isópodos sobre las plántulas de esta cactácea es significativa (34.2%). Las plantas no micorrizadas disminu-

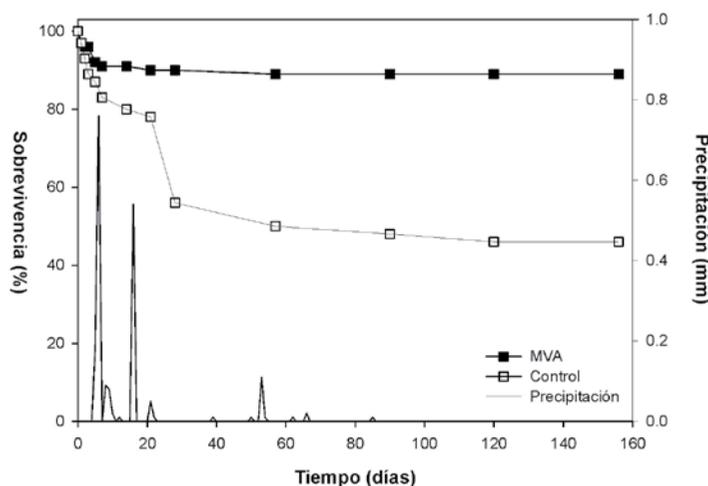
yeron un 44% en el primer mes (gráfica 1) y en los siguientes 3 meses la población cayó 46%. En cinco meses el lote re-introducido disminuyó un 54%. Reintroducciones calificadas como exitosas tales como la de *M. san-angelensis* reportan un 91% de sobrevivencia (Rubluo y col. 1993); o las de *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* (Giusti y col. 2002). Ambas experiencias se realizaron en jardines botánicos, donde los cuidados constantes (principalmente el riego) ayudan a alcanzar estos valores. En contraste, cuando la re-introducción se lleva a cabo en un ambiente silvestre las pérdidas pueden ser significativas, inclusive pueden alcanzar el 100% (Leirana-Alcocer y Parra-Tabla 1999; Contreras y Valverde 2002). Re-introducciones satisfactorias en hábitat silvestre, como la reportada por Decruse y col. (2003), para la orquídea *Vanda spathulata*, registraron entre el 50 y 70% de sobrevivencia; las muertes se debieron a factores abióticos (luz de sol directa y altas velocidades del viento). En otro estudio, el establecimiento de *Opuntia corallicola* alcanzó el 65%; en esta ocasión las muertes se debieron a la pudrición de los cladodios por bacterias (Stiling y col. 2000).

La abrupta caída del lote control re-introducido se registró 15 días después de la última lluvia (gráfica 1), posiblemente por la carencia de agua en el sistema. Bajo estrés hídrico, los estomas y otros componentes epicuticulares del tallo jue-

gan un papel preponderante en el balance hídrico de la planta. Durante el cultivo de tejidos hay una supresión de la producción de ceras epicuticulares que está asociado a la elevada humedad y la baja intensidad de iluminación empleada en el proceso (Shepherd y Griffiths 2006). Sin embargo, después de un tiempo bajo aclimatación, las plantas cultivadas en este sistema pueden recuperar su cubierta cerosa. Malda y col. (1999) encontraron que, a 3 meses de su traspaso al invernadero, plantas micropropagadas de *Coryphantha minima* alcanzaron un nivel similar de ceras al de las plantas crecidas en invernadero. Sin embargo, los autores no encontraron una correlación entre el porcentaje de sobrevivencia y el contenido de cera epicuticular. Por otro lado, los hongos micorrizicos son capaces de conferir ciertas ventajas que ayudan a las plantas a soportar la escasez de agua. La presencia de MVA se ha reportado en varios cactus del Desierto Sonorense, a los que ayudan a incrementar la toma de agua (Carrillo-García y col. 1999). Goicoechea y col. (2004) encontraron que los hongos micorrizicos le confieren a *Anthyllis cytisoides* una alta capacidad de respuesta contra la sequía al inducir la deposición de ceras y la caída de hojas. Los autores sostienen que este fenómeno ayuda a la planta a sobrevivir la época de sequía.

El sistema aeropónico se ha empleado exitosamente para la rápida producción de *A. mangium*

**Gráfica 1.** Sobrevivencia de *M. mathildae*, colonizada con MVA (—■—) y control (—□—) en la parcela experimental. La línea recta representa la precipitación registrada.



(Martin-Laurent y col. 1999); sin embargo, los autores apuntan que es necesario hacer pruebas de campo para verificar si los efectos positivos de las micorrizas se mantienen cuando las plantas sean sembradas en campo. Matsubara y col. (1998) inocularon con hongos micorrizicos plántulas de *Asparagus officinalis*, obtenidas por cultivo de tejidos; los simbiontes incrementaron el porcentaje de sobrevivencia de *A. officinalis* durante la aclimatación en invernadero. En el caso de *M. mathildae*, el lote de plántulas inoculado con MVA alcanzó, al final del cultivo aeropónico, un tamaño similar a plantas silvestres de 4 años de edad ( $2.91 \pm 0.05$  de alto y  $2.03 \pm 0.03$  de diámetro en promedio). En la parcela experimental, las plantas exhibieron un porcentaje de sobrevivencia mayor a las cactáceas no micorrizadas (gráfica 1). En la primera semana el lote se redujo en 9%, después de lo cual, la población se mantuvo estable por más de 160 días; a este tiempo, el 89% de la población sobrevivió en el área de re-introducción. El aumento del porcentaje de sobrevivencia se atribuye a dos factores: el tamaño de las plantas y el incremento en la capacidad de la simbiosis planta-micorriza de acceder a las reservas de agua del suelo; ambos factores le confieren a la planta una mayor resistencia al estrés hídrico. Adicionalmente, se cree que la ganancia de P durante el cultivo aeropónico le confirió una ventaja para la adaptación de la planta en campo, ya que es común que la disponibilidad de nutrimentos sea un factor limitante en medios silvestres. El suelo del área de re-introducción es somero y está constituido por una cantidad apreciable de materia orgánica; por lo tanto, el fósforo se encuentra en forma de fosfatos orgánicos. Se ha reportado que las hifas extra radicales de *Glomus intraradices* hidrolizan los fosfatos orgánicos transformándolos a inorgánicos (Koide y Kabir 2000) haciendo posible su absorción y

aprovechamiento por la planta. Esto le conferiría una ventaja de adaptación a la planta en campo. El experimento de re-introducción demostró que las plantas carentes de simbiontes benéficos se encuentran en franca desventaja en un medio silvestre, donde la disponibilidad de agua es estacional y los nutrimentos son escasos.

La re-introducción de plantas en edad reproductiva es deseable, aunque difícilmente se practica debido al tiempo que se requiere para obtener un lote con tal característica. Las plantas de *M. mathildae* micorrizadas alcanzaron en 10 meses el tamaño promedio de plantas silvestres de 4 años, edad en la que la planta inicia su etapa reproductiva (observación personal). En contraste las plantas no micorrizadas presentaron un tamaño promedio de plantas silvestres de 3 años. Se registró el número de flores producidas por ambos lotes en invernadero a los 6 meses de transplantarse del cultivo aeropónico. Las plantas carentes de micorrizas no florecieron, mientras que las plantas micorrizadas presentaron un 64% de floración (figura 2b). En contraste, durante la segunda semana de mayo de 2008 el 14% de las plantas micorrizadas re-introducidas florecieron (figura 2a). Evidentemente el número es menor porque en invernadero las plantas tienen un aporte constante de agua, mientras que las re-introducidas están a expensas del errático suministro de agua. El patrón de precipitación de 2008 es similar al que se presentó en el área en 2006 (García y Malda 2008a), por lo que se espera que el patrón de floración sea similar al de ese año; es decir, que inicie a mediados de abril (como se registró) y se prolongue hasta finales de junio. Es a mediados y finales de mayo cuando se espera que alcancen su máximo rango de floración en campo.



Figura 2.

*M. mathildae* floreciendo en a) la parcela experimental; y b) en el invernadero.

## Conclusiones

Con el uso de la tecnología dual micropropagación por cultivo de tejidos – inoculación con MVA por cultivo aeropónico, se logró obtener un lote de plantas con un tamaño promedio de  $2.91 \pm 0.05$  cm de alto por  $2.03 \pm 0.03$  cm de diámetro, en un periodo de 10 meses. Estas plantas fueron capaces de sobrevivir (89%) el proceso de re-introducción por más de 6 meses (sorteando la temporada de sequía) y de florecer en campo al inicio de la temporada de lluvias (14%). Ello nos hace suponer que las plantas serán capaces de persistir por un periodo de tiempo más largo en su hábitat.

Si el objetivo de micropropagar las plantas es su comercialización, el cultivo de tejidos es una alternativa rentable para ello. En contraste, si se planea usarlas en protocolos de restauración de hábitat, es conveniente dotarlas de una microbiota benéfica nativa que les ayude a integrarse a la dinámica del ecosistema: establecerse y persistir en su hábitat. Se espera que este enfoque biotecnológico se emplee de forma extensiva como una herramienta para prácticas de restauración de hábitat o de recuperación de otras poblaciones vegetales amenazadas o en peligro de extinción.

Actualmente, experimentos de micorrización de árboles nativos empleando inóculos locales se están llevando a cabo en el estado de Querétaro siguiendo los métodos aquí presentados, con la finalidad de reforestar las áreas de conservación adquiridas por el “Fideicomiso Queretano para la Conservación del Medio Ambiente” (FIQMA).

## Agradecimientos

Los autores agradecen al FIQMA por permitir realizar el trabajo de campo en la Cañada Juriquilla. Se agradece a Idea Wild por la donación del equipo de cultivo aeropónico. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71).

## Referencias Bibliográficas

Arias, S., 1993. “Cactáceas: conservación y diversidad en México”. En: Gío, R., López-Ochoterena, E., (eds) “Diversidad biológica en México”, *Revista de la Sociedad Mexicana*

de *Historia Natural*, 64 (número especial).

- Augé, R.M., 2001. “Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis”, *Mycorrhiza*, 11, pp. 3-42.
- Bashan, Y., Anne, D.E., Carrillo-Garcia, A., Linderman, R.G., 2000. “Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert”, *Applied Soil Ecology*, 14, pp. 165-175.
- Bethlenfalvay, G.J., Dakessian, S., Pacovsky, R.S., 1984. “Mycorrhizae in a southern California desert: ecological implications”, *Canadian Journal of Botany*, 62, pp. 519-524.
- Brundrett, M.C., 2002. “Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants”, *New Phytologist*, 154, pp. 275-304.
- Bunn, E., Senaratna, T., Sivasithamparam, K., Dixon, K.W., 2005. “*In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill, a critically endangered relict from Western Australia”, *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 41, pp. 812-815.
- Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 2004. “Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets” *Applied Soil Ecology*, 26, pp. 11-19.
- Carrillo-Garcia, A., Leon de la Luz, J.L., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J., 1999. “Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert”, *Restoration Ecology*, 7, pp. 321-335.
- Clayton, P.W., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C., Butler-Nance, S.A., 1990. “Micropropagation of members of the Cactaceae subtribu Cactinae”, *Journal of American Society for Horticulture Science*, 115, pp. 337-343.
- Contreras, C., Valverde, T., 2002. “Evaluation of the conservation status of a rare cactus (*Mammillaria crucigera*) through the analysis of its population dynamics”, *Journal of Arid Environments*, 51, pp. 89-102.

- Dávila-Figueroa, C.A., De La Rosa-Carrillo, Ma.L., Pérez-Molphe-Balch, E. 2005. "In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae)", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 41, pp. 540-545.
- de Medeiros, L.A., de Ribeiro, R.C.S., Gallo, L.A., de Oliveira, E.T., Dematte, M.E.S.P., 2006. "In vitro propagation of *Notocactus magnificus*", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84, pp. 165-169.
- Decruse, W.S., Gangaprasad, A., Seeni, S., Saroniji-Menon, V., 2003. "Micropropagation and eco-restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72, pp. 199-200.
- Drezner, T.D., Garrity, C.M., 2003. "Saguaro distribution under nurse plants in arizona's Sonoran desert: directional and microclimate influences", *The Professional Geographer*, 55, pp. 505-512.
- Enkhtuya, B., Rydlová, J., Vosátka, M., 2000. "Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats", *Applied Soil Ecology*, 14, pp. 201-211.
- Escobar, H.A., Villalobos, V.M., Villegas, A., 1986. "Opuntia micropropagation by axillary proliferation", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7, pp. 269-277.
- García, A., Galvan, R., 1995. "Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México", *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, pp. 7-24.
- García, R.O., Malda, B.G., 2007. "A rapid methodology to select urban conservation areas. A case of study: *Mammillaria mathildae* conservation", 21<sup>st</sup> Annual Meeting Society for Conservation Biology. Port Elizabeth, Sudáfrica.
- García, R.O., Malda, B.G., 2008a. "Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest as a bio-indicator of climatic change", Paper presented at the international symposium on climatic change and biodiversity in the Americas, Smithsonian Tropical Research Institute, Panamá.
- García, R.O., Malda, B.G., 2008b. "Micropropagation and reintroduction of *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to their natural habitat", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, (Sometido).
- Gianinazzi, S., Vosátka, M., 2004. "Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business", *Canadian Journal of Botany*, 82, pp. 1264-1271.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. "An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots", *New Phytologist*, 84, pp. 489-500.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F. Tucci, M., 2002. "In vitro propagation of three endangered cactus species", *Scientia Horticulturae*, 95, pp. 319-332.
- Goicoechea, N., Merino, S., Sánchez-Díaz, M., 2004. "Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the deciduous shrub *Anthyllis cytisoides* under water deficit", *Physiologia Plantarum*, 122, pp. 453-464.
- Koide, R.T., Kabir, Z., 2000. "Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate", *New Phytologist*, 148, pp. 511-517.
- Koide, R.T., Mosse, B., 2004. "A history of research on arbuscular mycorrhiza", *Mycorrhiza*, 14, pp. 145-163.
- Leirana-Alcocer, J., Parra-Tabla, V., 1999. "Factors affecting the distribution, abundance and seedling survival of *Mammillaria gaumeri*, an endemic cactus of coastal Yucatán, México", *Journal of Arid Environments*, 41, pp. 421-428.
- Linares, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R., Elias, T., 1995. "Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques", UNAM. 175 pp.
- Liu, R., Wang, F., 2003. "Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi", *Mycorrhiza*, 13, pp. 123-127.
- Malda, G., Suzan, H., Backhaus, R., 1999. "In

- in vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism”, *Scientia Horticulturae*, 81, pp. 71-87.
- Martinez-Vazquez, O., Rubluo, A., 1989. “*In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada”, *Journal of Horticultural Science*, 64, pp. 99-105.
- Martin-Laurent, F., Lee, S.K., Tham, F.Y., He, J., Diem, H.G., 1999. “Aeroponic production of *Acacia mangium* saplings inoculated with AM fungi for reforestation in the tropics”, *Forest Ecology and Management*, 122, pp. 199-207.
- Matsubara, Y., Ogura, Y., Watanabe, T., Harada, T., 1998. “Arbuscular mycorrhizal fungus infection enhances acclimation of *Asparagus* plantlets derived from tissue culture”, *Acta Horticulturae (ISHS)*, 513, pp. 221-228.
- Mohamed-Yasseen, Y., 2002. “Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)”, *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 38, pp. 427-429.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures”, *Plant Physiology*, 15, pp. 473-479.
- Muthukumar, T., Udaiyan, K., Shanmughavel, P., 2004. “Mycorrhiza in sedges—an overview”, *Mycorrhiza*, 14, pp. 65-77.
- Palomino, G., Dolezel, J., Cid, R., Brunner, I., Méndez, I., Rubluo, A., 1999. “Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture”, *Plant Science*, 141, pp. 191-200.
- Papafotiou, M., Balostis, G.N., Louka, P.T., Chronopoulos, J., 2001. “*In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 65, pp. 163-167.
- Poljuha, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubešić, N., Krsnik-Rasol, M., 2003. “Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75, pp. 117-123.
- Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J.L., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N., 2007. “*In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae)” *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 43, pp. 660-665.
- Rillig, M.C., Steinberg, P.D., 2002. “Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification?”, *Soil Biology Biochemical*, 34, 1371-1374.
- Rincón, E., Huante, P., Ramírez, Y., 1993. “Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*”, *Mycorrhiza*, 3, pp. 79-81.
- Rout, G.R., Das, P., Goel, S., Raina, S.N., 1998. “Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers”, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, pp. 23-27.
- Rubluo, A., Chavez, V., Martínez, A.P., Martínez-Vazquez, O., 1993. “Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture”, *Biological Conservation*, 63, pp. 163-169.
- Rudgers, J.A., Koslow, J.M., Clay, K., 2004. “Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties”, *Ecology Letters*, 7, pp. 42-51.
- Sánchez, E., Galindo, G., 1989. “Estado de conservación de las cactáceas queretanas”, Reporte para la Dirección de Conservación Ecológica de los Recursos Naturales 5 pp.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., 1999. “Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger”, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56, pp. 163-167.
- Schwartz, M.W., Hoeksema, J.D., Gehring, C.A., Johnson, N.C., Klironomos, J.N., Abbott, L.K., Pringle, A., 2006. “The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum”, *Ecology Letters*, 9, pp. 501-515.

- Shepherd, T., Griffiths, W.D., 2006. "The effects of stress on plant cuticular waxes", *New Phytologist*, 171, pp. 469-499.
- Sriskandarajah, S., Prensens, E., Motyka, V., Dobrev, P.I., Serek, M., 2006. "Regenerative capacity of cacti *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones, cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities", *Journal of Plant Growth Regulation*, 25, pp. 79-88.
- Stiling, P., Rossi, A., Gordon, D., 2000. "The difficulties of single factor thinking in restoration: replanting a rare cactus in the Florida Keys", *Biological Conservation*, 94, pp. 327-333.
- Sudharsan, C., AboEl-Nil, M., Hussain, J., 2003. "Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants", *Journal of Arid Environments*, 54, pp. 133-147.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P.G., Zuberer, D., 2003. "Principles and Applications of Soil Microbiology", Prentice Hall, New Jersey
- Uei-Chern, Ch., Chi-Ni, H., Mau-Shing, Y., Dinsh, Ch.A., Hsin-Sheng, T., 2006. "In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kaoi* an endangered medicinal plant native to Taiwan" *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 42, pp. 128-133.
- Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E., Paredes-López, O., 2006. "Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 42, pp. 336-340.
- van der Heijden, M.G.A., 2004. "Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland", *Ecology Letters*, 7, pp. 293-303.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V., Bhagyalakshmi, N., 2007. "Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers", *Electron Journal of Biotechnology*, 10, pp. 106-113.
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., Devos, N., Weekers, F., Kevers, C., Thonart, P., Lemoine, M.C., Cordier, C., Alabouvette, C., Gianinazzi S., 2004. "Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry", *Applied Soil Ecology*, 27, pp. 243-258.
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., Piché, Y., 1998. "nk and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi", *Applied Environment Microbiology*, 64, pp. 5004-5007.
- Viswambharan, S., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., Rowntree, J.K., 2006. "Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 42, pp. 206-214.
- Wakhlu, A.K., Bahu, S.B., 2000. "Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem.", *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 36, pp. 211-214.
- Weathers, P.J., Zobel, R.W., 1992. "Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells", *Biotechnology Advances*, 10, pp. 93-115.
- Weber, J., Ducouso, M., Tham, F.Y., Nourissier-Mountou, S., Galiana, A., Prin, Y., Lee, S.K., 2005. "Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. in aeroponic culture", *Biology and Fertility Soils*, 41, pp. 233-239.
- Welles, J.M., 1990. "Some indirect methods of estimating canopy structure", *Remote Sensing Reviews*, 5, pp. 31-43.
- Zúñiga, B., Malda, G., Suzán, H., 2005. "Interacciones planta-nodriza en *Lophophora diffusa* (Cactaceae) en un desierto subtropical de México", *Biotrópica*, 37, pp. 351-356.