

00369 A
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MICORRIZACION ARBUSCULAR DE *Cosmos atrosanguineus*
COMO UN MECANISMO PREADAPTATIVO A SU
ESTABLECIMIENTO EN SUELO.**

T E S I S

**Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRIA EN CIENCIAS
(EDAFOLOGIA)
p r e s e n t a**

MARIA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA

Director de Tesis M. en C. Sergio Palacios Mayorga

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer patente mi más profundo agradecimiento:

Al Dr. Jorge Gamma Castro por la caracterización edafológica del perfil.

A la M. en C. Nidia Pérez Nasser por la lectura de las bandas en los geles.

Al Biól. Mai Jun Jiao por la enseñanza de la técnica de isoenzimas.

Al M. en C. Alejandro Martínez Palacios por su asesoría en el corrimiento de los geles y en el proceso de adaptación de la planta al suelo.

A la M. en C. Lucía Varela Fregoso por su apoyo en la elaboración y revisión de las preparaciones de esporas como material de respaldo.

Al Dr. José Luis Villaseñor por sus comentarios y orientación acerca de la taxonomía de la planta.

Al técnico laboratorista Pedro Avilés por las determinaciones de fósforo de las muestras.

A los Miembros del Jurado por la revisión del manuscrito.

Muy especialmente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Instituto de Geología de la UNAM por haberme apoyado con una beca de licenciatura y maestría.

A mis asesores M. en C. Sergio Palacios Mayorga y Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, por todo el apoyo que siempre he recibido de ellos.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	6
Antecedentes	7
Algunas consideraciones importantes de las áreas involucradas	12
Metodología	24
Resultados y Discusión	31
Conclusiones	54
Anexo 1	55
Anexo 2	56
Anexo 3	60
Bibliografía	62

RESUMEN

Cosmos atrosanguineus (Hook.) A. Voss es considerada una compuesta probablemente extinta en condiciones silvestres. Es una especie endémica de México cuya distribución abarcó el este central del país, en los estados de San Luis Potosí y el sureste de Hidalgo. Las causas probables de su desaparición son una excesiva depredación a principios de este siglo, junto con la gradual destrucción de su habitat que corresponde al Bosque de Encino. Hasta el inicio de los años 40 se vendían sus semillas comercialmente y la planta fue introducida a Europa como flor de ornato llegando a ser muy popular en los jardines del Reino Unido. Sin embargo, los mecanismos de dispersión mediante la propagación vegetativa de muy pocos individuos, han conducido a la total erosión y pérdida de variabilidad genética de la especie. La multiplicación masiva del clon por micropropagación se inició en los Jardines Botánicos de Kew en Inglaterra con la finalidad de regresar a la planta a su país de origen. Su reintroducción a su ecosistema natural se podrá realizar una vez resueltos los problemas de variabilidad genética y adaptación a su habitat de las plantas micropropagadas.

Como una primera contribución, se analiza el grado de homogeneidad genética de individuos sujetos a la micropropagación en nuestro país, mediante análisis de isoenzimas. Se determinan las condiciones de establecimiento en una mezcla de suelo preparada artificialmente y en un suelo natural procedente de su habitat. Se pretende incrementar la sobrevivencia y mejor desarrollo de las plántulas mediante la micorrización arbuscular en la fase de aclimatación en invernadero.

INTRODUCCION

Existen varias razones por las que una planta se estima extinta o en vías de extinción. Se consideran especies amenazadas a todas aquellas sometidas a riesgos que vulneran su existencia, tales como la modificación drástica o destrucción total de sus habitats (Sánchez, 1987). Raven en 1984 reporta que para principios del siglo XXI, 1/6 de la biodiversidad del planeta habrá desaparecido, siendo esta una tasa de extinción mayor que la sucedida en los eventos del Cretácico (recordando que a *grosso modo*, la extinción de una especie trae como consecuencia la desaparición de 1 a 10 más). Si bien la preservación del habitat y del ecosistema son una manera lógica de hacer frente a la extinción de especies, su rescate debe comenzar con una valorización adecuada y real de su conservación y manejo.

Con base en Ecker (1989) quien aborda de una manera muy precisa el problema del rescate y reintroducción, se sustenta una gran parte de este trabajo:

En un esfuerzo por frenar la extinción, muchas plantas amenazadas han sido rescatadas de sus habitats naturales y mantenidas en varios tipos de cultivo *ex situ*. La reintroducción considera la preservación *in situ* (en sus ecosistemas nativos) de plantas anteriormente propagadas. Pocos intentos de este tipo han dado resultados exitosos, fundamentalmente porque no se toma en cuenta la ecología y las prácticas hortícolas involucradas. El éxito en la reintroducción está dado, en principio, por altas tasas de sobrevivencia y posteriormente, por la habilidad de adaptación del organismo durante un tiempo ecológico. Los mínimos estudios que se requieren para reintroducir adecuadamente una especie, deben considerar por períodos de por lo menos un año, a

los principales factores bioecológicos involucrados como el crecimiento de la especie en condiciones naturales (floreamiento, fructificación, asociaciones vegetales, etc.) y las características edáficas, climáticas, etc. del habitat. Las plantas propagadas no deben ser tratadas con plaguicidas que eliminen las interacciones naturales que se establecen en la rizosfera, por lo que se recomienda la inoculación previa con microorganismos procedentes de la misma para aumentar su supervivencia, capacidad reproductiva y crecimiento (Linderman, 1988; Baas, 1990). Los problemas de inadaptación pueden ser solventados al simular las condiciones particulares del microhabitat. Los análisis del suelo son importantes ya que éste puede influir en la sobrevivencia de la especie, especialmente en su habilidad reproductiva (formación de semillas). En este sentido, los estudios de biología de la reproducción permitirían asegurar la descendencia y adaptación futura. Del mismo modo, se debe considerar y prevenir la depredación ya que puede acabar en un momento con una población entera. Es indispensable tomar en cuenta las interacciones con el macro y micro habitat como las simbiosis micorrízicas, que son determinantes en la absorción de agua en periodos de estrés y/o en el establecimiento de las plántulas, ya que el agua y los nutrimentos son dos de los factores más limitantes en la supervivencia. Esto no quiere decir que se deban introducir micorrizas extranjeras, si no más bien especies que fueron aisladas previamente del lugar. Estas asociaciones micorrízicas pueden ser críticas en el éxito de futuras reintroducciones. Contradictoriamente, la producción de plantas sanas y muy bien cuidadas (con excesivos aportes de agua y fertilizantes) también conlleva a un fracaso en la reintroducción, puesto que no están siendo adaptadas para

enfrentarse a condiciones de sequía o deficiencias nutrimentales. Otra consideración importante para el establecimiento de las plantas propagadas, es que el suelo provenga del habitat original de la especie así como la selección de la estación del año en la que se llevará a cabo el trasplante, para que esto facilite el proceso. De cualquier modo, el estrés de salida debe ser cuidadosamente vigilado durante el primer año y ayudar a las plantas a que se adapten poco a poco a las condiciones naturales. Muchas veces, el éxito en el reestablecimiento radica en el monitoreo y seguimiento de las poblaciones, razón por la cual, es fundamental considerar su tamaño (Hall, 1987).

Por otro lado, es necesario asegurar la variabilidad genética (que se puede suministrar colectando plantas de diferentes lugares o ambientes), aunque se debe evitar la mezcla de especies diferentes para no producir complejos genéticos coadaptados que lleguen a extinguir a la población (la transferencia de genes en poblaciones reintroducidas es un problema delicado) (Noss, 1987). Una técnica útil para evaluar el grado de variabilidad, es el estudio de las isoenzimas.

La utilización de la micropropagación como una herramienta para salvar especies en vías de extinción fue propuesta inicialmente por Raven (1976) y Wochok (1981). El rescate de especies por rutas biotecnológicas debe ser interdisciplinario y considerar distintos criterios, ya que la amenaza por los cambios y alteraciones ecológicas tiene diferentes dimensiones para cada especie (añadiendo a esto que el endemismo incrementa el peligro de desaparecer). En primer lugar, se debe asegurar que la especie problema realmente se encuentra amenazada en cualquier categoría. El rescate y reintroducción *ex situ* propuesto por Frankel y Soulé (1981) considera que los cambios genéticos y fenotípicos de la población original deben ser nulos, evitando las

modificaciones producidas por la domesticación; pero también, se debe impedir la pérdida de variabilidad genética. Por tanto, la clonación se recomienda cuando se tiene una base genética relictual o muy pobremente representada y la variabilidad se debe procurar aunque sea artificialmente, con variantes somaclonales que pueden ser producidas mediante los callos inducidos (Rubluo y Flores, s. f.).

La biotecnología vegetal, como el estudio de las condiciones experimentales óptimas para la manipulación del genoma a través del manejo de los tejidos, es una potente arma para hacer frente a estos problemas. La propagación masiva por cultivo de tejidos, aclimatización y establecimiento para recobrar especies en peligro tiene un potencial obvio. Sin embargo, el término *rescartar* implica un éxito en cada una de estas etapas y el término *recuperar* se logra cuando se alcanza la adaptación y reintroducción a la vida silvestre (Rubluo *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

En la presente investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Mantener y multiplicar *in vitro* las plantas de *Cosmos atrosanguineus* donadas por el Jardín Botánico de Kew.**
- 2. Determinar las condiciones de aclimatación y establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.**
- 3. Mejorar las condiciones preadaptativas de establecimiento en suelo a través de la micorrización arbuscular en la fase de aclimatación.**
- 4. Observar el desarrollo de las plantas en un suelo natural procedente de su habitat original.**
- 5. Establecer el grado de homogeneidad genética del clon en los cultivos *in vitro* mediante el análisis de isoenzimas.**

ANTECEDENTES

***Cosmos atrosanguineus*: “Una planta extinta en la naturaleza”.**

***Cosmos atrosanguineus* es una planta endémica de México. En relación a su estatus biológico, se habla de un proceso de extinción en condiciones naturales. Como se verá, esta consideración puede llegar a ser un tanto ambigua.**

Una especie en peligro de extinción es aquella cuya población es menor a los 25 000 individuos; bien sea endémica de una localidad ecológica o bien de amplia distribución, pero localizada en poblaciones aisladas y de reducido tamaño que están siendo disminuídas drásticamente y pudiendo existir en condiciones de domesticación en jardines botánicos más ya no en condiciones naturales (Sánchez, 1987). Citando a Vovides (1995): “..es casi siempre imposible estar absolutamente seguro de cuáles especies son raras, amenazadas o en peligro y los ejemplares de herbario no son necesariamente una indicación del estatus de las plantas a este respecto.” “..antes del año de 1979, se creía que *Magnolia dealbata* estaba extinta pero con nuevas exploraciones botánicas se descubrieron por lo menos dos sitios en donde esta especie todavía existe en forma silvestre..”.

Si bien las compuestas son una familia que abarca especies de muy fácil propagación, siendo muchas de ellas ruderales y altamente competitivas; algunas se encuentran en vías de extinción. Probablemente la enorme representatividad de esta familia a lo largo de todo nuestro territorio, sea la causa por la que no se le considere

ni siquiera en una de las listas de especies vegetales mexicanas amenazadas de extinción (vease Flores y Gerez, 1994). En el Diario Oficial de la Federación (Altamirano, 1993) se publica una lista emitida por parte de la Secretaría de Desarrollo Social, de las especies raras, endémicas, amenazadas, en peligro de extinción y sujetas a protección especial. Dentro de la Familia Compositae, la especie citada más cercana al *Cosmos* es *Dahlia scapigera*, en calidad de especie rara. Sólo se tiene reportada una especie para la categoría de amenazada, una para en peligro de extinción y ninguna sujeta a protección especial. De *C. atrosanguineus* no se hace referencia alguna.

1. Descripción botánica de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Ortg.

El nombre genérico de *Cosmos* proviene del griego *Kosmos* (ornamento) en elogio a su floración. En el Curtis Botanical Magazine (1861) se describe a *Cosmos diversifolius* var. *atrosanguineus* en relación al rojo profundo de sus flores, siendo ésta la primera descripción donde se sitúa a la planta en este género. La caracterización según Hooker fue la siguiente:

Las semillas de la planta se recibieron del Sr. Thompson de México considerada como una de las más bellas del género. Se duda si puede ser referida a otra descripción anterior, puesto que para el género se describen hojas bipinadas y esta planta las presenta simplemente pinadas. *Cosmos scabiosoides* H. B. K. comparte esta característica, sin embargo, sus hojas son mucho más pequeñas, casi del mismo color y completamente liguladas. Se decidió colocarla como una variedad de *C. diversifolius*

dada la similitud de sus flores, que difieren sólo en el color. No se cuenta con la parte radical de los ejemplares, por lo que no se puede hacer una comparación para este carácter. Se concuerda con Otto al describir esta nueva especie como dudosa. Morfológicamente, la planta es muy lozana (como causa probable de la riqueza del suelo), con pedúnculos de 1.5 pies de largo, hojas inferiores de 8 a 9 pulgadas con pinas de 1.5 a 2 pulgadas y de 1 a 2 pulgadas de ancho. El color de la flor es sangre purpúreo profundo con un gran parecido a las dalias pequeñas de una sola flor. Se recomienda conservarla en invernadero durante el invierno y colocarla junto a los bordes en el verano.

La descripción más reciente de la especie está dada en una revisión del género en 1932:

Cosmos atrosanguineus (Hook.) Ortg. in Hemsl. Biol. Centr. Amer. Bot. 2: 199. 1881; *C. diversifolius* var. *atrosanguineus* Hook In Curtis 's Bot. Mag. 87: pl. 5227. 1861. *Bidens atrosanguinea* Ortg. in Regel's Gartenflora 10: 406 pl. 347. 1861; *Dahlia zimapani* Roetzl ex Ortg. loc. cit.; cf a Vilmorin, Fl. Pl. Terre edit. 2: 269. 1866*. Especimen tipo: el material de Hooker procedía de semillas del Sr. Thompson de México. Los especímenes podrían estar en Kew. El Sr. Thompson recibió semillas de la misma fuente que el Sr. Ortgies y las últimas fueron cultivadas en el Jardín Botánico de Zurich contemporáneamente a los cultivos de Hooker. Ortgies dice que sus semillas fueron colectadas por Roezi cerca de Zimapán en el estado de Hidalgo, México y su distribución se da en el este central de México, en el estado de San Luis Potosí y al sureste del estado de Hidalgo.

* La descripción botánica de las especies afines se dan en el anexo 1.

2. "Siguiéndole la pista".

En un comunicado que emite Plant Heritage en 1993 (Fay, 1993), se dice que la planta estuvo disponible de 1869 a 1942 en los catálogos comerciales de semillas de Thompson, fecha a partir de la cual, ya no se vendió más semilla de esta planta. El material que tienen en Kew proviene de una reserva no especificada que ha sido propagada vegetativamente, puesto que las plantas actuales no forma semillas fértiles.

En la bibliografía taxonómica de común consulta no aparecen referencias de *Cosmos atrosanguineus* como tal: Flora fanerogámica del Valle de México de Rzedowski y Calderón (1985), Flora del Estado de México de Martínez y Matuda (1979), Claves para la identificación de los géneros de la Familia Compositae en México de Rzedowski (1986), Flora del Valle de México de Sánchez (1980).

En antiguas referencias botánicas se describe un *Cosmos* sp. de hojas escarlata *coentli* y de tallos nudosos purpúreos *ocopichi* (Historia de las plantas de la Nueva España de Hernández, 1943). Sería preciso llevar a cabo una búsqueda intensiva en este tipo de bibliografía, considerando las descripciones botánicas anteriores (*Bidens atrosanguinea* en 1861 y *Dahlia zimapani* en 1866) que corresponden a las fechas de elaboración de estos escritos.

Las características hortícolas de este género describen a plantas erguidas de follaje atractivo y flores sencillas de colores blanco, rosa y carmín. Soportan terrenos pobres

y arenosos y crecen al sol aunque toleran algo de sombra; su siembra se lleva a cabo de febrero a marzo y florecen en abril, junio y hasta septiembre. Cabe aclarar que algunos cosmos (*C. bipinnatus*, etc.) crecen directamente al sol, por lo que son llamados *mirasol*. Otras especies lo hacen al abrigo de los encinos (*C. sulphureus*, *C. scabiosoides*, etc.).

3. Causas de su extinción.

a. Destrucción de su habitat.

Como se menciona anteriormente, el habitat de esta especie son o fueron las cercanías de Zimapán y el sureste del estado de Hidalgo; el este central de México y la zona boscosa de la sierra de San Luis Potosí. Si bien todos estos lugares muestran un alto grado de perturbación que se puede observar en un recorrido de campo, existen todavía algunas áreas protegidas. Particularmente para San Luis Potosí, que es el lugar elegido para esta investigación, el bosque de Encino comienza a ser desplazado por la agricultura*. Su explotación intensiva se dió a principios de siglo cuando se establecieron las compañías mineras extranjeras en los alrededores. En las excursiones botánicas que se han realizado en estas zonas, no se han encontrado poblaciones silvestres. Sin embargo como menciona Vovides (*op. cit.*), no se puede asegurar no encontrarlas en búsquedas posteriores.

** La descripción completa de la zona de estudio se da en el anexo 2.*

b. Comercialización excesiva o depredación completa.

Comercialmente hablando, los Cosmos son flores de ornato y de corte que tuvieron su auge hace ya más de 30 años (según el Reader's Digest, 1967). En este libro se hace la siguiente referencia: "La mayor parte de las plantas proceden del *Cosmos bipinnatus* de México, aunque hayan sido hibridadas con otros Cosmos, como *Cosmos sulphureus*, *Cosmos diversifolius*, etc. todos también de origen centroamericano". En otro libro de horticultura (Bianchini y Carrara, 1975) se menciona que su introducción a Europa se dió a finales del siglo XVIII.

La ya citada disponibilidad comercial de semillas en el catálogo de Thompson y Morgan hasta el año de 1942, a partir del cual se dejan de vender abruptamente; sugiere que se dió una depredación intensiva de las poblaciones silvestres que se establecían alrededor de las zonas mineras del bosque de encino, que americanos y europeos explotaron hasta estas fechas. Probablemente los colectores de semillas partieron junto con las compañías mineras y dada la adaptación de esta planta al clima templado europeo, no se precisó la colecta de más material. Continuando con la especulación, algún evento de tipo climático quizá mermó por completo los pocos individuos que crecían en lugares cercanos y accesibles (sin internarse más adentro de la sierra), impidiendo con esto el reestablecimiento natural de las poblaciones

relictuales. La información de campo obtenida de los habitantes del lugar, confirma que esta planta llamada por ellos "pan y queso" ya es poco vista (si es que corresponde al dibujo mostrado) y no le dan ninguna utilidad ni como flor de ornato.

4. Hacia una valorización, rescate y reintroducción.

En un comunicado del Kew Scientist (KRBG, 1993), en la sección de *Plantas económicas, su conservación y evolución*, se hace referencia a la planta como "un bien conocido pero amenazado miembro de las compuestas". A pesar de que es popular y perenne y que crece ampliamente en el Reino Unido; tiene una muy pobre base genética (probablemente originada a partir de una sola planta). Se ha caracterizado su ADN con tecnología RAPD y los clones han sido micropropagados con la intención de regresarlos continuamente a la UNAM en cultivos *in vitro* para su conservación y posteriores ensayos de reintroducción. El Dr. Fay, encargado de la Unidad de Micropropagación del Kew Royal Botanical Gardens, hace un llamado a la comunidad científica para que le envíen plantas de *Cosmos atrosanguineus* de cualquier lugar del mundo, ya que probablemente al tratarse de una especie ornamental, existan individuos genéticamente diferentes para que se pudieran propagar masivamente. De este modo, con técnicas de manipulación de ADN, se podrían distinguir sus orígenes y llevar a cabo cruces que puedan aumentar la variación (Fay, 1993).

Por otro lado, el olor tan conspicuo de las flores de esta especie, la ha llevado a aparecer en un libro educativo: *la planta de chocolate* o la *Cosmos daisy*, es un ejemplo de cómo los niños pueden cultivarla sin ninguna dificultad de ser adquirida. Las ilustraciones los guían para transplantarla de un maceta a otra, mejorando su drenaje e incluso su olor mediante el uso de desperdicios de cacao como abono. Su floración se puede observar al siguiente año, después de un periodo de frío. Este tipo de difusión puede ser un buen comienzo para la valoración de plantas en extinción que se han domesticado.

Evaluación de la preservación *in vitro* de germoplasma.

Un germoplasma es una reserva genética de una especie que es mantenida en almacenamiento bajo condiciones particulares, para poder hacer uso de ella en un momento requerido. Se refiere a la preservación *ex situ* de la especie. La conservación *in vitro* de un germoplasma es una labor que requiere de un extenuante trabajo para que se lleve a cabo de un manera ideal y para que realmente sea práctica y potencialmente valiosa. En las prácticas de mantenimiento *in vitro*, el subcultivo involucra, además de una labor continua de resiembra con riesgos de contaminación, una disminución del potencial de regeneración y multiplicación de los brotes y un aumento en la probabilidad de que se produzcan cambios genéticos, la mayoría de las veces indeseables. Por estas razones, es necesario llevar a cabo el continuo establecimiento en suelo de este material y conservarlo vivo en un lugar adecuado como lo son los Jardines Botánicos.

En abril de 1993, el Kew Royal Botanical Gardens donó 6 frascos de plantas regeneradas por cultivo de tejidos provenientes de un individuo de su colección viva. Esta colección está situada en el área 751 de Wakerhurts Nursery y cuenta con un total de 178 plantas donadas por la National Trust; está catalogada con un alto valor hortícola aunque sin ningún interés científico. Se les describen raíces tuberosas, alta tolerancia y hábitos anuales con floración de junio a agosto. Se cuenta con otra colección proveniente de una donación de Lero y Davison, con 420 plantas localizadas en la región Alpine y herbaceous (área 136 02). A estas plantas se les asigna también un muy alto valor hortícola con un posible interés científico. Se recomienda su cuidado durante el invierno, se dice que son de hábito perenne pero que perece y con flores hermafroditas que se dan en el mes de agosto.

A continuación se cita la metodología de micropropagación establecida en Kew y facilitada por Howarth (1993).

1. Se esterilizaron explantes de cortes a partir de entrenudos de 2 cm (provenientes de los tallos de las plantas a los que se les removieron las hojas) en etanol 100 % durante 10'; empapándolos en cloro al 5 % más 2 gotas de Tween 80 por 20-25'. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en un rango de medios para encontrar el óptimo para la proliferación. En los cultivos contaminados se aplicó un antibiótico en la superficie del medio hasta que los nuevos brotes fueron removidos.

2. La mejor respuesta se encontró en medio MS con 2 mg/l de BAP y 0.1 mg/l ANA (combinación que produjo la producción de más brotes en el menor tiempo). El

subcultivo se lleva a cabo cada 3-4 semanas para prevenir la formación de callo y cambios morfológicos (como el desarrollo de 3 hojas de un entrenudo o tallos muy delgados).

3. El enraizado se da rápidamente en MS al 50% sin fitoreguladores. Se produce una sola raíz sin ramificaciones.

Para estas fechas se estaba probando mejorar el enraizado y no se habían hecho aún ensayos de establecimiento en suelo. En una visita al Royal Botanical Gardens en 1994, la adaptación al suelo no había representado grandes dificultades.

Papel del Jardín Botánico.

Los Jardines Botánicos, considerados los centros de excelencia para el cultivo y propagación de especies raras y poco conocidas, así como de plantas silvestres nativas (Vovides, 1995); son los sitios adecuados para montar los primeros ensayos de reintroducción.

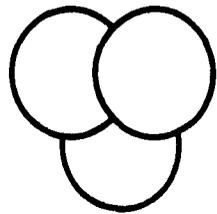
La colaboración del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM con el KRBG tiene como objetivo, mantener este genoma *ex situ* mediante su micropropagación, establecimiento en suelo y en la colección de plantas vivas del Jardín, con fines no sólo de difusión, si no también de conservación y de una futura reintroducción.

Algunas consideraciones importantes de las áreas involucradas.

Se relaciona a cada una de éstas áreas (micorrizas arbusculares, cultivo de tejidos vegetales, análisis de isoenzimas y estudios edafológicos), con la adaptación de las plantas en suelo, siendo éste el primer antecedente para llevar a cabo una futura reintroducción de esta especie.

I. Acerca de las micorrizas arbusculares.

Es conocido que las micorrizas se desarrollan en las raíces de más de un 90 % de las plantas, estando presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres y desempeñando un papel fundamental en los procesos ecológicos (Hooker, 1994). En particular, las micorrizas arbusculares colonizan las raíces de una gran parte de plantas silvestres y comercialmente importantes en la agricultura, horticultura y silvicultura. La condición micorrizada natural de las plantas como “la regla y no la excepción” (Marks, 1991), expresa claramente la importancia ecológica de esta simbiosis. Según un esquema propuesto por Brundrett (1991), las asociaciones micorrízicas forman parte de un universo en el que sus constituyentes son:



1. Condiciones ambientales y del suelo

2. Planta hospedera

3. Hongo micorrízico

En la naturaleza, no sólo las micorrizas actúan en beneficio de las plantas. Las asociaciones tripartitas con otros microorganismos producen igualmente un efecto sinérgico (*Frankia, Rhizobium, Azospirillum, Azotobacter, Pseudomonas*, etc.). Si bien la mayoría de las especies de hongos micorrízicos arbusculares, pueden colonizar a la mayoría de las plantas, al menos en algún grado (Vestberg y Estaún, 1994); en muchas investigaciones se ha visto que el efecto en su crecimiento se ve influenciado por cierta especificidad (Lovato *et al.*, 1994). Esto depende en gran medida de las condiciones edáficas a las que están adaptados ambos simbioses.

Micorrización arbuscular en el establecimiento de plantas micropropagadas.

Los estudios de readaptación y reincorporación a condiciones edáficas de cultivos que han sido masivamente propagados, no consideran el papel que juegan los microorganismos del suelo en este proceso. Las plantas que necesitan de esta simbiosis para subsistir, si logran mantenerse vivas, presentan serias deficiencias o se desarrollan raquíticamente. La micorrización en las prácticas hortícolas y agrícolas, permite incrementar la resistencia a varios tipos de estrés, por lo que la inoculación en el trasplante con el endófito apropiado, puede resultar muy favorable (Dehne, 1990). En esta etapa, las plantas crecen en sustratos donde se han eliminado todos los microorganismos de la rizosfera y la presencia de algunos de ellos debe ser reestablecida como una extensión natural del sistema radical. Un ejemplo veraz es el de las plántulas de tomate que se transplantan a campo provenientes de almácigo, en

las que se reduce su mortalidad significativamente cuando han sido previamente inoculadas (Vázquez y Estrada, 1994).

Las plantas micorrizadas tienen una mayor actividad fotosintética (Romano *et al.*, 1994) ya que el área foliar es varias veces aumentada y, como consecuencia, producen una mayor biomasa y mejor desarrollo. La mejor nutrición mineral repercute igualmente en su reproducción, crecimiento y éxito adaptativo. Esto no se debe únicamente a que las plantas micorrizadas absorban más, si no porque se ve optimizada la utilización de los nutrimentos (Sánchez y Honrubia, 1994), entre los cuales siempre se ha destacado al fósforo (Koide, 1991). Sobre todo, se resalta el hecho de las modificaciones metabólicas que sufren las plantas micorrizadas en la fisiología del estrés hídrico, como factor fundamental que sustenta y justifica a esta investigación. Cierta resistencia en contra del establecimiento de rizopatógenos oportunistas, es otra ventaja que podemos agregar.

Hacia una metodología de micorrización arbuscular.

Se han desarrollado numerosas técnicas de inoculación en cultivos de invernadero y campo (Wood y Cummings, 1992). En todas ellas, se pueden reducir a dos los principales factores que determinan la obtención de resultados exitosos:

1. La elección del sustrato y endófito adecuado para la optimización de la colonización de un cultivar específico.

2. La etapa en la que se lleva a cabo la micorrización arbuscular.

Se ha visto que existe una influencia del sustrato en el desarrollo de la colonización micorrízica (Vetsberg *et al.*, 1992). Esto se debe a que en su esterilización, se producen en alguna medida, elementos tóxicos para la simbiosis (Daniels y Wilson, 1989); así como las modificaciones en el pH (Hepper, 1984) y su repercusión en la asimilación de nutrimentos. Los sustratos considerados inertes, no siempre resultan serlo puesto que algunos de ellos desprenden concentraciones considerables de algunos metales (Sreenivasa y Bagyaraj, 1988). Del mismo modo, la permeabilidad y aereación que permitan, son factores físicos muy importantes en el desarrollo de la colonización.

El crecimiento del cultivar puede verse influenciado determinantemente por el aislado micorrízico: no todas las especies de estos hongos tienen la misma habilidad de exploración del sustrato, captación y transferencia de nutrimentos (Kough y Gianinazzi-Pearson, 1985; Lei y Piché, 1990). Además de la cierta especificidad ecológica de las plantas por el endófito, aunque esto pudiera verse solucionado aplicando el inóculo mixto (McGonigle y Fitter, 1990). Las depresiones en el crecimiento a causa de la micorriza arbuscular, también ocurren, aunque esto ha sido atribuido a una simbiosis aún no establecida (sin la formación de arbusculos) (Koide,

1989; Hammat, 1994) o a factores no favorables a la planta como la falta de luz (por lo que no elabora los carbohidratos suficientes para ambos) (Chávez y Ferrera, 1990).

Influencia de la micorrización en las diferentes etapas de establecimiento en suelo.

Los efectos de la micorrización se verán determinados por la etapa en que ésta se lleve a cabo (Azcón *et al.*, 1994) y que puede ser *in vitro* o *ex vitro* durante la fase de endurecimiento, aclimatación, transplante en invernadero o campo (Vestberg y Estaún, 1994). Esto dependerá del tipo de crecimiento y ciclo de vida de la especie (Rapparini *et al.*, 1994).

a. Micorrización arbuscular *in vitro*.

La micorrización *in vitro* se puede llevar a cabo en las mismas condiciones en las que se propagan las plantas (medios solidificados o líquidos); o bien, en diferentes sustratos en los que se inducirá su enraizamiento.

La inoculación en medios de cultivo es complicada, ya que se presentan más dificultades que hay que superar. La mayoría de los medios de cultivo son muy ricos en nutrimentos para las plantas y los hongos se ven inhibidos en su desarrollo por estas altas concentraciones (sobre todo de fósforo). A pesar de que esta

incompatibilidad se ha solucionado con medios mínimos (Beard y Fortin, 1988), no siempre son adecuados para las plantas. La solidificación del medio también repercute en el establecimiento de la micorriza arbuscular, ya que ésta requiere de condiciones de constante aereación (algunos cultivos hidropónicos han solucionado estos problemas). La posibilidad de contaminación es quizá, el riesgo más grave puesto que no siempre se logra introducir a un sistema completamente estéril, propágulos libres de gérmenes (tradicionalmente las esporas y raíces colonizadas que sirven de inóculo, provienen de cultivos en maceta, o bien aislados de campo). Esto también se ha solucionado con la elaboración de cultivos "axénicos" de micorrizas en raíces transformadas (Diop y Piché, 1990).

Considerados estos aspectos, es factible obtener la colonización de ciertas especies *in vitro*. Aunque también es necesario tomar en cuenta, a los factores concernientes a la micropropagación que podrían impedir su establecimiento. La producción de raíces funcionales *in vitro* en medios solidificados, no es lo común. Las raíces son quebradizas, sin ramificaciones y no siempre están fisiológicamente capacitadas para llevar a cabo una absorción normal (Barea *et al.*, 1992). A esto se suma que éstas son completamente reemplazadas por otras más funcionales en el momento del trasplante (Conner y Thomas, 1981). Dada la facilidad de difusión de los nutrimentos en los sistemas *in vitro*, la morfología radical se ve transformada, y las raíces secundarias de diámetros menores (que son preferentemente colonizadas) no se presentan (Brundrett *et al.*, 1985). Las plantas bajo estas condiciones, no han pasado completamente a su estado autótrofo normal, por lo que los mecanismos fotosintéticos no están

establecidos del todo (Vestberg y Estaín, 1994). Este estado heterótrofo o semiheterótrofo influye en que no se establezca una colonización funcional.

Por estos motivos, se recomienda sustituir la micorrización arbuscular bajo estas condiciones, por una inoculación *in vitro* en sustratos de enraizado, con medio diluido y con un bajo suministro de carbono, tal como sucede exitosamente en la ectomicorrización de especies forestales (Vestberg *et al.*, 1994). En este estado, la efectividad del sustrato es el factor más importante (Vidal, 1991). Las plantas colonizadas, adquieren de este modo, un mecanismo de defensa natural para afrontar las posteriores condiciones *ex vitro*.

b. Micorrización arbuscular en la etapa de endurecimiento.

El endurecimiento de las plantas consiste en adecuarlas poco a poco a las condiciones ambientales exteriores para que soporten el estrés por la salida. Esta etapa se caracteriza por la gradual pérdida de humedad del sistema, así como la disminución en los nutrimentos aportados y la inducción de la fotosíntesis y regulación hídrica, mediante un cambio en las condiciones de incubación del cultivo (de cada vez más homogéneas a cada vez más heterogéneas).

Dado que en esta etapa, se dominan y modifican los factores involucrados de humedad, temperatura, iluminación, sustrato y medio; se tienen más probabilidades de sobrevivencia que en las fases posteriores. Para ciertos cultivares se ha demostrado que en la inoculación temprana en el endurecimiento, se obtienen los mejores

resultados (Azcón *et al.*, 1994). Los problemas enunciados anteriormente pueden también aplicarse para esta etapa aunque con menos severidad.

c. Micorrización arbuscular en la etapa de aclimatación.

La fase de aclimatación de las plantas consiste en establecerlas completamente a un medio *ex vitro* totalmente controlado como lo es el invernadero o una cámara de crecimiento. Para que las plantas sobrevivan a este paso, es necesario que sean completamente autosuficientes y que hayan desarrollado mecanismos para llevar a cabo una regulación hídrica completa, una tasa fotosintética normal y una absorción radical adecuada. En este sentido, la micorrización arbuscular podría tener grandes ventajas para la planta, primordialmente en la sobrevivencia, susceptibilidad a patógenos y disminución del tiempo de adaptación (Jaizme *et al.*, 1994; Palmujoki *et al.*, 1994). Tal es el caso de los microesquejes inoculados en el proceso de enraizado (Avanzato *et al.*, 1994).

d. Micorrización arbuscular en el trasplante.

El trasplante de las plantas una vez aclimatadas a las condiciones *ex vitro*, es la parte más importante en todo el proceso de establecimiento en suelo. Las plantas no dependerán más de una solución nutritiva aportada si no que comenzarán a nutrirse de lo que el suelo les proporcione, así como a interaccionar por completo con las demás condiciones edáficas y ambientales. Aunque el trasplante se lleve a cabo en

invernadero, la sobrevivencia en el mismo constituye el éxito en el proceso de propagación masiva. Para muchas especies vegetales, es en este momento cuando se observa el mayor beneficio de la micorrización arbuscular (Morandi *et al.*, 1979; Schubert y Martinelli, 1988; Hammatt, 1994).

e. Ejemplos de micorrización arbuscular de cultivos micropropagados.

En el cuadro 1 se resumen las principales investigaciones que han contribuido a establecer la micorrización arbuscular como un mecanismo preadaptativo al establecimiento en suelo de cultivares micropropagados.

Cuadro I. Ejemplos de micorrización arbuscular en cultivares micropropagados*.

Cultivar:	Observaciones:	Cita:
Aguacate	Inoculación en varias etapas, mayor sobrevivencia y desarrollo. Mejor efecto en endurecimiento que aclimatación. Incremento en sobrevivencia y crecimiento.	Vidal <i>et al.</i> , 1992. Azcón <i>et al.</i> , 1994. De la Viña <i>et al.</i> , 1994.
Cereza	Inoculación <i>in vitro</i> . Efectos tardíos y afinidad por endófito.	Pons <i>et al.</i> , 1983. Hammat, 1994.
Cherimoya	Resistencia contra patógenos. Tiempos de inoculación, incremento sobrevivencia.	Guillemín <i>et al.</i> , 1994. Azcón <i>et al.</i> , 1994.
Cirucla	Efecto del endófito. Incremento en sobrevivencia, biomasa y raíz. Incremento en sobrevivencia.	Fortuna <i>et al.</i> , 1992. Berta <i>et al.</i> , 1994. Uosukainen y Vestberg, 1994.
Durazno	Diferencias en sobrevivencia, uniformidad y peso.	Rapparini <i>et al.</i> , 1994.
Encino	Desarrollo temprano de características de adultos.	Romano <i>et al.</i> , 1994.
Eucalipto	Micorrización masiva en un vivero comercial. Inoculación <i>in vitro</i> con ecto y endomicorriza.	Lin, 1990. Boudarga <i>et al.</i> , 1990.
Frambuesa	Inoculación en transplante, plantas homogéneas.	Morandi <i>et al.</i> , 1979.
Fresa	Inoculación <i>in vitro</i> con vesículas aisladas. Efecto en el crecimiento. Crecimiento diferencial según endófito. Micorrización como protección parásitos. Resistencia contra rizopatógenos. Respuesta debida a la micorrización. Inoculación <i>ex vitro</i> con microorganismos. Aumento de biomasa en la inoculación <i>in vitro</i> . Ensayos para micorrizar a gran escala. Control biológico con la micorrización. Efectos de depresión por endófito.	Strullu y Romand, 1987. Hrselova <i>et al.</i> , 1989. Chávez y Ferrera, 1990. Vetsberg <i>et al.</i> , 1994. Atkinson <i>et al.</i> , 1994. Guillemín <i>et al.</i> , 1994. Gryndler <i>et al.</i> , 1994. Hernández <i>et al.</i> , 1994. Nuutila <i>et al.</i> , 1994. Rewcastle, 1994. Varma y Schuëpp, 1994.
Fresno	Efectos tardíos y afinidad por endófito.	Hammatt, 1994.
Hortensia	Influencia temprana por la micorrización.	Varma y Schuëpp, 1994.
Kiwi	Inoculación para aumentar sobrevivencia	Schubert <i>et al.</i> , 1992.
Limón	Micorrización masiva en un vivero comercial.	Lin, 1990.
Manzana	Efecto en el crecimiento. Efecto en el crecimiento. Micorrización masiva en un vivero comercial. Proliferación y mejor desarrollo de raíces. Inoculación en sustratos de enraizamiento. Inoculación en enraizamiento de microesqueje.	Granger <i>et al.</i> , 1983. Branzanti <i>et al.</i> , 1989. Lin, 1990. Gianinazzi y Schuëpp, 1994. Moncousin <i>et al.</i> , 1994. UosakienyVetsberg, 1994.
Palma acetosa	Micorrización para adaptación a suelos ácidos.	Ponton <i>et al.</i> , 1990.
Paulownia	Reducir aclimatación y aumentar sobrevivencia.	ZhipengyShiuchien, 1990.
Pera	Efecto en el crecimiento. Micorrización masiva en un vivero comercial. Aumento en sobrevivencia.	Branzanti <i>et al.</i> , 1989. Lin, 1990. Rapparini <i>et al.</i> , 1994.
Piña	Aplicación de inóculo comercial. Prueba endófitos, resistencia sales, acidez y patógenos.	Lovato <i>et al.</i> , 1992. Guillemín <i>et al.</i> , 1994.
Plátano	Micorrización masiva en vivero comercial. Plantas con una mayor vitalidad.	Lin, 1990. Jaizme <i>et al.</i> , 1994.
Vid	Efecto en el crecimiento. Inoculan en el transplante. Inoculación <i>ex vitro</i> . Incrementar sobrevivencia y enraizamiento. Mayor biomasa y desarrollo radical. Aumento de sobrevivencia según endófito.	Schubert <i>et al.</i> , 1987. Schubert y Martinelli, 1988. Schubert <i>et al.</i> , 1990. Ravolanirina <i>et al.</i> , 1989. Schellenbaum <i>et al.</i> , 1991. Ferrera, 1994.
Zarzamora	Micorrización masiva en un vivero comercial.	Lin, 1990.

* Aunado a esta lista, también se ha logrado la micorrización con otros hongos de otras especies como por ejemplo: *Helianthemum almeriense* y *Terfezia clavary* (Morte y Honrubia, 1994), la azalea (Leitch *et al.*, 1990) y los pinos (Torres y Honrubia, 1990).

Futuro de las biotecnología de la micropropagación-micorrización.

Como se trata de hacer ver, la micorrización de plantas propagadas masivamente forma parte de la biotecnología vegetal. El establecimiento de estrategias de inoculación cada vez más factibles, permitirá que esta práctica llegue a ser parte de una rutina necesaria en la producción de plantas con fines comerciales y experimentales. La biotecnología micorrízica asegura la obtención de plantas con una mayor biomasa y uniformidad, lo que se refleja en el incremento de su sobrevivencia (Ferrera, 1994) y en una reducción de la etapa de aclimatación (Vidal, 1991). Es indispensable controlar los factores desfavorables de la clonación, tanto como el establecimiento de un protocolo de inoculación para cada especie en particular. Los beneficios rotundos de esta práctica se pueden aprovechar para especies dificultosas (Hooker, 1994) y de interés ecológico (Morte y Honrubia, 1994). Un ejemplo ilustrativo es el de la micorrización de orquídeas en extinción micropropagadas en Kew: la germinación de semillas en medios asimbióticos llevó meses e incluso años de trabajo para que las plantas desarrollaran el aspecto y tamaño de aquellas micorrizadas (KRBG b, 1994).

La importancia de encaminar investigaciones que se encarguen de la resolución de estos problemas, se reflejó en la creación de un grupo de trabajo en 1994 dedicado únicamente a este tema: *Application of VAM to the production of micropropagated plants* (The role of VA mycorrhizas in transformation of matter in the soil and their importance for plant nutrition and plant health, European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research) (Gianinazzi y Schuëpp, 1994).

II. Acerca de la micropropagación.

El objetivo de las técnicas de micropropagación es la obtención de elevadas tasas de multiplicación de material vegetal de un valor agronómico probado. A pesar de ser una técnica bien establecida, algunas plantas sujetas a este tipo de reproducción, presentan problemas para completar su ciclo de vida y ser establecidas en suelo. La elevada mortalidad de las plantas al ser sacadas de sus condiciones de cultivo (que muchas veces supera el 50 %), se puede aminorar con una adecuada aclimatación, en donde el control de las variables ambientales, es fundamental. Por tal motivo, se hace necesario el realizar numerosos intentos en la adaptación (Hurtado, 1988), que es un proceso largo que puede durar de 4 a 8 meses, dependiendo de la respuesta de las plantas y de su ciclo de vida. Champney (1992) menciona que los problemas de sobrevivencia deben ser considerados como un aspecto de *desarrollo tecnológico* y que una vez superados, permite obtener plantas con una mayor adaptación que las convencionales.

Algunas consideraciones generalizadas se recomiendan para una adecuación de los cultivos (Prece y Sutter, 1991). En el periodo de transplante en invernadero, el sustrato debe permitir una buena aereación y drenaje para evitar la proliferación de hongos y bacterias oportunistas (Griffins, 1984) ya que, por lo general, las plantas se vuelven más susceptibles a las enfermedades. En relación al tamaño, las plantas que han desarrollado de 2 a 3 nudos así como un buen sistema radical (de preferencia en un sustrato de enraizamiento), están en mejor condición para el transplante. Los

reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos deben disminuirse. Una vez lograda la aclimatación, el traslado a campo dura menos tiempo (de 1 a 2 meses) y se recomienda para los días nublados en los que la lluvia mantiene al suelo a capacidad de campo, procurando que la estación del año sea la adecuada para esa especie (Klein, 1984).

Por otro lado, las causas directas de la inadaptación de las plantas al suelo, son una consecuencia de las condiciones en las que se da el cultivo *in vitro* ya que éste provoca modificaciones anatómicas y fisiológicas que las vuelven más sensibles al transplante (Sallanon y Coudret, 1990). La vulnerabilidad al déficit por la presión de vapor en las hojas, el aumento en la iluminación y la eliminación de la fuente de energía, las torna desprotegidas para hacer cara al ambiente externo. Esto se da gracias a la pérdida de la funcionalidad estomática (Brainerd y Fuchigami, 1982; Ziv *et al.*, 1987; Pospisilova *et al.*, 1988) y debilidad cuticular en las hojas (Sutter y Langhams, 1979; Sutter, 1988; Conner y Conner, 1984). Por ejemplo, el aguacate micropropagado produce bajas concentraciones de rubisco en sus hojas. Este es un politerpeno constituyente del látex de las plantas leñosas tropicales que interviene en el ciclo de Calvin y provoca que las tasas fotosintéticas sean muy bajas al disminuir su concentración en las hojas.

Diferentes técnicas se han desarrollado para solucionar estos problemas. El control del CO₂, la regulación de las fitohormonas (Brainerd y Fuchigami, 1982), son los más simples. También se pueden utilizar retrasantes del crecimiento en el medio de cultivo como el paclobutrazol (que es un agente que disminuye la relación peso fresco/seco de los brotes y aumenta el cerumen foliar) que inhibe la síntesis de las giberelinas (Roverts y Matthews, 1995). En algunos casos se puede controlar la excesiva y/o

acelerada proliferación de los tejidos aumentando la concentración del gelificante en el medio, lo que disminuye drásticamente la tasa de crecimiento y elongación de los brotes como consecuencia de una menor disponibilidad de citocininas (que estimulan la multiplicación celular) e iones disponibles (Ghashghaie *et al.*, 1991). El potencial hídrico en el medio decrece linealmente conforme se incrementa la concentración del gelificante y el potencial hídrico y osmótico de las hojas también decrece en la hoja manteniendo constante la presión por turgencia. La absorción de agua repercute directamente en la biomasa de la planta y la actividad de los brotes: el choque osmótico o *factor osmótico regulador* es definitivo para que se de la diferenciación de los tejidos y el metabolismo nitrogenado (Sánchez, s.f.). En este sentido, es importante precisar que en el cultivo de tejidos vegetales, la organogénesis es un proceso que se da gracias al continuo nacimiento de células y que da lugar a la formación de tejidos diferenciados en tallos y hojas (caulogénesis) y raíces (rizogénesis). Normalmente, cuando la razón de auxinas/citocininas en el medio es mayor a 1, se ve favorecida la rizogénesis y cuando es menor, la caulogénesis. La inducción de callo (proliferación celular indiferenciada) está regulada por estas hormonas aunque no siempre es recomendable en la propagación de los cultivos porque puede generar plantas débiles o sin conexiones vasculares bien establecidas (Brand, 1992).

Por otro lado, se presenta el problema de la estabilidad de los cultivos *in vitro*: los cambios fenotípicos y genéticos ocurren como resultado de la acelerada división celular y continuo subcultivo. Aunque una bien llevada micropropagación debe permitir la obtención de plantas homogéneas que no se logran cuando se propagan vía sexual (Strullu, 1985). Las diferencias observadas por los viveristas en cultivares

obtenidos por cultivo de tejidos, se deben a que los cambios estructurales son más frecuentes con esta técnica que por los métodos tradicionales: "las plantas hijas no se parecen a las madres" (Mezitt, 1988). En el caso de cultivares comerciales, lo que sucede es que se manifiestan muy fácilmente las variaciones epigenéticas como lo el cambio en el color de las flores, la variegación en el follaje y la distorsión en la forma de la hoja, entre otras. Esto podría ser imperceptible al inicio del cultivo, pero se exacerba en varios ciclos (Knuttel, 1989) y puede ser evitado al máximo, procurando la siembra de brotes axilares (provenientes del meristemo axilar que tiene un tipo celular más preformado que los adventicios) que además desarrollan plantas más vigorosas (Brand, 1992).

Las mutaciones se suceden más frecuentemente que de manera natural, porque los tejidos están expuestos a concentraciones elevadas de fitoreguladores y porque algunos elementos del medio nutritivo son por sí mismos mutagénicos (como el NH_4 y EDTA) bajo ciertas condiciones (Brand, 1992). Los cambios ocurridos en el número de cromosomas son los más comunes (Ancona *et al.*, 1981). El nivel de ploidías se puede establecer a través de un estudio de los cariotipos (tetraploidías, euploidías y aneuploidías). Por lo general, se ha observado que existe una relación entre la falta de euploidías y la inhabilidad de la organogénesis. Sin embargo, hay especies en las que se da una buena regeneración aún a pesar de que presentan una extrema aneuploidía (Halperin, 1973). A esto hay que añadir que la edad del cultivo influye (también en que se incrementan los riesgos de contaminación) en la capacidad de regeneración aumentando éstas anormalidades.

La obtención espontánea de variantes genéticos (cuando se requieren) se puede promover mediante la inducción de mutaciones con agentes químicos o radiación (Rubluo, s. f.). Igualmente la ingeniería genética permite introducir características de interés (como una alternativa para el mejoramiento de los cultivos) para que posteriormente sea multiplicado por clonación el genoma conveniente. El método más usual es el de transformación por *Agrobacterium* que introduce secuencias convenientes de ADN en las plantas (Renou *et al.*, 1993).

Utilización de la micropropagación en el rescate de especies en peligro.

La biotecnología vegetal juega un papel muy importante en el futuro de la conservación y restauración de ecosistemas (Chávez y Rubluo, 1995). Es recomendable realizar la micropropagación inmediata de especies en peligro que son colectadas en campo, para maximizar la efectividad en la conservación del germoplasma (Filipini *et al.*, 1994). Un ejemplo de esto es el trabajo que se lleva a cabo en Kew en donde se desarrollan varios proyectos de rescate de especies en peligro de todo el mundo. Las orquídeas de México gozan de particular atención (Kew information Sheet 14, 1994).

Una de las grandes ventajas que ofrece la micropropagación por cultivo de tejidos, es que se pueden producir plantas en cualquier época del año y en varios estados de crecimiento (McCown, 1992). Sin embargo, no se debe perder de vista que la sobreproducción de plantas (aunque éstas estén en vías de extinción), también genera problemas serios de manejo, cuidados e infraestructura. Tampoco se debe perder de

vista que las especies silvestres no se pueden cultivar por siempre en laboratorios ni en jardines botánicos pues perderían su variabilidad natural, por lo que es forzoso perpetuarlas en sus comunidades originales (Sánchez, 1987) en un esfuerzo de reintroducción.

III. Acerca del estudio de la variabilidad genética *in vitro* mediante el análisis de isoenzimas.

Las enzimas son proteínas que regulan la síntesis de diversas reacciones metabólicas específicas. Las isoenzimas son proteínas que tienen la misma actividad aunque no la misma estructura molecular, es decir; son las múltiples formas en que se conoce a una enzima particular (Hart, 1983). Esto se debe a que están codificadas genéticamente por diferentes alelos de un locus, o bien diferentes loci, lo que hace posible que se manifieste su variación (Chue, 1984). Esta variación está dada gracias a su estructura terciaria, que es la disposición espacial en la que se orientan las diferentes cadenas de aminoácidos que la constituyen y que influyen primordialmente su carga. El origen de estas diferencias se pudo deber a la duplicación de los locus que codificaban inicialmente para la proteína, seguida de una especialización para cada locus replicado, en diferentes caminos bioquímicos (Hart, 1983), por lo que la diversidad depende mucho de la enzima en cuestión. En biología vegetal, las aplicaciones prácticas en el estudio de isoenzimas se hacen para mantener un control en la producción de híbridos y semillas, ya que es una técnica precisa para la identificación de genotipos. En estudios ecológicos, se utiliza para la estimación de

frecuencias génicas en las poblaciones vegetales: los cambios en las características hereditarias están mediados por la relación entre los alelos que codifican las isoenzimas. En la micropropagación, se pueden detectar duplicaciones en el monitoreo de niveles de ploidía por la expresión diferencial en los alelos de un locus como consecuencia de una o múltiples copias de un segmento cromosómico. Incluso la técnica de electroforesis se emplea últimamente para llevar a cabo la identificación taxonómica de hongos micorrízicos arbusculares cultivados *in vitro* (Williams, 1990).

Fundamentación de la técnica y algunos conceptos generales.

Una mutación ocurre cuando se ve alterada una parte de la secuencia de ADN para un locus particular, ya sea por la delección de una o más bases, por sustitución de las mismas o transposición. Estos cambios se reflejan en la secuencia de aminoácidos constituyentes de las cadenas polipeptídicas, lo que pueden tener producir efectos en la proteína de muchas maneras. En el caso de las isoenzimas, esto afecta su carga neta o su forma y repercute en su funcionamiento, estabilidad y capacidades catalíticas. El polimorfismo de los genes está dado en sus alelos, que son las formas alternativas que codifican para un mismo producto molecular y se ve reflejado finalmente en el fenotipo resultante (morfológico y bioquímico). Cuando este polimorfismo ocurre entre los diferentes alelos que constituyen un locus, se dice que la fuente de variación es monogénica tratándose particularmente de aloenzimas y cuando es la suma de varios alelos de diferentes loci, se dice que es poligénica (Hart, 1983). La herencia mendeliana es un ejemplo de la primera.

La técnica de electroforesis se basa en la separación de las isoenzimas en un gel (aprovechando su migración dada por su carga) bajo la influencia de un potencial eléctrico (Andrews, 1985). Esto produce diferentes patrones de bandeo en el gel, que se manifiestan al ser teñidos al añadir los sustratos específicos para la enzima que se desea revelar. Para que se de la migración, es necesario abatir el punto isoeléctrico de la proteína (que es cuando tiene el mismo número de cargas NH_4^+ y COO^-) con ayuda del pH para que esta este cargada totalmente positiva o negativamente. Siendo entonces el pH el que influencia la carga neta de la enzima y con esto su movilidad en el gel; se hace necesario mantener constante su valor a través del uso de amortiguadores en los que las sales absorben cualquier variación en la carga. Por estas razones, las diferencias en las bandas que se producen dependen en gran medida, de factores de la técnica, pudiendo haber cambios en los aminoácidos de las proteínas que mantienen similar la carga y el tamaño, y que no son detectables (las moléculas migran a la misma tasa y constituyen los llamados electromorfos) (Hart, 1983).

Por otro lado, también se pueden observar diferentes patrones de bandeo en un mismo individuo como consecuencia de los estados de desarrollo y las condiciones de crecimiento, principalmente en enzimas que demuestran mucha inestabilidad (MDH y EST) (Maurer, 1971). Por un estudio de patrones isoenzimáticos, se vuelve imprescindible el probar un considerable número de sistemas de corrimiento, así como de enzimas (Tuinen *et al.*, 1994). Sin embargo, todas estas insuficiencias de la técnica pueden suplirse con un riguroso control del sistema y de las muestras que se van a analizar.

En el caso particular del cultivo de tejidos vegetales, el origen de las variaciones pueden deberse a las ploidías de las que ya se ha hecho referencia y de los callos que no siempre conservan los patrones de isoenzimas específicos de los tejidos que les dieron origen (Sánchez, s.f.). Las hormonas vegetales intervienen en los procesos de traducción de proteínas por lo que también influyen en la estabilidad de los genotipos. Esto aunado a las diferentes fuentes de mutación que permiten inducir variabilidad artificial, provocan que la tasa de mutación sea más elevada que la que se darían naturalmente por procesos de recombinación.

El interés del estudio de la variación *in vitro*, se fundamenta en la escasa representación de la variabilidad natural con la se cuenta para esta especie, por lo que se hace necesario el monitoreo de los cambios genéticos que pueden ocurrir como consecuencia de su micropropagación. Es necesario primero, establecer que es lo que sucede como consecuencia de su manipulación para que posteriormente, se puedan encaminar convenientemente los cultivos y futuros ensayos de reintroducción. Hay que recordar que la variación en las poblaciones naturales es el resultado de un largo proceso de adaptación, y que la regla en la frecuencia de los alelos es tender a permanecer constante de generación a generación en el equilibrio denominado de Hardy-Weinber (Duffey, 1970).

IV. Acerca de la importancia de los estudios edafológicos en la reintroducción de especies amenazadas.

Por lo general, el papel del suelo en un ecosistema ha sido considerado desde el punto de vista productivo: "la producción agrícola tiene su origen en plantas que crecen en el suelo" (Russell, 1988). Las descripciones edáficas usuales se refieren a la clase textural de un suelo y/o a sus contenidos de materia orgánica y desafortunadamente no van más allá (a menos de que se trate de sistemas de producción, de uso y manejo). Los estudios científicos de los suelos naturales se delegan a investigaciones pedológicas descriptivas.

Como se ha establecido, la reintroducción de especies debe considerar al suelo tanto como al clima o a la vegetación, no nada más a un nivel de caracterización, eso es válido en los estudios de sondeo, si no como un aspecto limitante para el desarrollo vegetal. Para un edafólogo, establecer la condición taxonómica de un suelo es decir todo acerca del pasado, presente y futuro del pedón y del ecosistema que sustenta (Singer y Munns, 1992). Esto se debe a que en su génesis a través de cientos o miles de años, interviene la acción del intemperismo en el material parental que le da origen, bajo la modulación del clima y la biota que se establece para condiciones topográficas delimitadas (Aguilera, 1989).

Al adaptar a una planta a un edafosistema, no se puede llevar a cabo una modificación de las características del suelo, tal y como se hace en los sustratos de propagación: rizosfera nativa, textura, pH, contenido y ciclo de nutrimentos y materia orgánica, drenaje y porosidad, por mencionar sólo las principales (Flegmann y George, 1979). El desarrollo radical y nutrición mineral se ven fuertemente influenciados y a su vez dependen de la especie vegetal, que ha interactuado a lo largo de su evolución haciendo al suelo y formando parte del mismo. Por ejemplo, los

Mollisoles que se dan en ecosistemas de sabana y pradera, poseen propiedades fisicoquímicas muy favorables que los hacen muy fértiles (alto contenido de materia orgánica que redundará en su fertilidad, una excelente agregación de partículas que permite una óptima aireación y drenaje para las raíces, etc.). Contrariamente, podemos encontrar Oxisoles que son suelos muy degradados porque han sufrido un intemperismo severo y que soportan vegetación de selva en donde el principal aporte de nutrientes se ve autoregulado por la mineralización de la biomasa vegetal que se descompone (Boul, 1991). Con estos ejemplos contrastantes, se manifiesta que la cubierta vegetal desarrollada (tal es el caso de las dunas costeras y las plantas halófitas), se ve influenciada también por el suelo. Esto no quiere decir que para un ecosistema en cuestión se presenten únicamente una especie de suelo: la diversidad pedológica puede ser grande en áreas pequeñas, siendo lo más seguro, que no se pueda llegar a caracterizar a todos ellos (hay tantos suelos como posibilidades y formas de intemperismo). De cualquier forma, el seleccionar zonas homogéneas para el establecimiento de las plantas, es un buen comienzo para abarcar posteriormente, vecindades más heterogéneas e ir observando la adaptación de las plantas.

METODOLOGIA

I. Metodología desarrollada en la micropropagación y establecimiento en suelo de *Cosmos atrosanguineus*.

a. Multiplicación y subcultivo a partir de los individuos donados.

El cultivar se multiplicó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Se establecieron anteriormente a este trabajo, varios ciclos de subcultivo (no se precisaron cuantos) en medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2 mg/l de BA y 0.1 mg/l de ANA para la proliferación, MS 50% para el mantenimiento y MS al 50% con 1 mg/l de ANA para el enraizamiento. En todos se ajustó el a pH 5.7 (Chávez, 1994).

A partir de una población de aproximadamente 1 200 individuos, se realizaron las siguientes resiembras:

Se continuó con el subcultivo acostumbrado resemebrando 10 fragmentos de dos entrenudos en frascos con capacidad de 100 ml. Se subcultivaron 500 individuos (50 frascos) por cada tratamiento anteriormente establecido. Se mantuvieron en incubación en un cuarto de cultivo a 25 C, 2 500 luxes y fotoperiodo 16/8.

Tres meses después, se llevó a cabo un segundo subcultivo (100 frascos) únicamente en medio de mantenimiento, con la finalidad de homogeneizar el cultivar para los futuros experimentos.

b. Disminución de la tasa de proliferación y elongación de los tallos: establecimiento de las condiciones de endurecimiento.

Se sembraron 500 individuos en tubos de ensaye con 10 ml de medio de proliferación con 12 g/l de agar, introduciendo únicamente la punta del tallo en el medio y dejando el entrenudo inferior sin contacto con el mismo. Se transfirieron a un invernadero cálido (35 C, fotoperiodo natural).

c. Ensayos de establecimiento en suelo y sustratos afines.

Se sembraron 40 individuos por tratamiento (20 individuos provenientes de medio de proliferación, 10 de medio de enraizamiento y 10 de medio de mantenimiento), en tubos de ensaye con medio de enraizamiento (pH 5.8) en los siguientes sustratos: vermiculita, agrolita, suelo de bosque (mantillo) y suelo de bosque y vermiculita 1:1. Se mantuvieron durante una semana en el mismo cuarto de cultivo y después se transfirieron a un invernadero templado (28 C, fotoperiodo natural).

II. Multiplicación del aislado micorrízico e inoculación arbuscular.

a. Multiplicación del aislado y selección del material para la inoculación.

Se multiplicó un aislado de *Glomus fasciculatum* (ver anexo 3) en diferentes hospederos (maíz, frijol, soya, alfalfa, cebolla, poro, chile, tomate, jitomate y pasto),

con la finalidad de asegurar la suficiente producción de esporas para la posterior micorrización de las plantas. Se inoculó cada hospedero con 2.5 g de raíces de poro micorrizadas y 1 g de suelo tamizado a 0.074 mm de abertura, ambos tratados 20' en una solución de tween 80 (100 gotas por litro) y 1 g de cloramina T (10 g/l) y lavados posteriormente con una solución de estreptomina/gentamicina (250 y 150 mg/l) durante 20'. Se inocularon 3 plántulas de cada hospedero (provenientes de semillas previamente germinadas asépticamente), en contenedores diseñados para la propagación de pinos, con la finalidad de concentrar la masa radical en menos volumen que en las macetas convencionales. se hicieron 5 réplicas por hospedero. Se utilizó como sustrato vermiculita y se regó cada tercer día con solución nutritiva Long Aston (Hewitt, 1962) con 2 ppm de fósforo, manteniendo las plantas en cámara de cultivo a 25 C, fotoperiodo 16/8 y 2 500 luxes de iluminación.

Pasados seis meses, se aislaron las esporas de los contenedores por centrifugación (Jenkins, 1964) y se seleccionaron al microscopio estereoscópico, separando 40 lotes de 50 esporas cada uno con esporas de aspecto homogéneo (color amarillo hialino, citoplasma vacuolado y apariencia turgente). Se conservaron a 4 C en agua destilada estéril hasta el momento de la inoculación.

b. Inoculación de lotes experimentales.

La inoculación de plantas de *C. atrosanguineus* se estableció para la fase de aclimatación de plantas previamente endurecidas y enraizadas en agrolita. Se transplantaron 40 individuos con un buen desarrollo radical para cada tratamiento (M⁺ y M⁻) a vasos de unisel con suelo de bosque previamente esterilizado a 1.5 kg de

presión durante 30'. Se inoculó agregando las esporas seleccionadas en la parte radical con ayuda de un pipeta Pasteur. Se aspersó ligeramente en las plantas y en la superficie del suelo, una solución de 2.5 g/l de captán. Se introdujeron los vasos en una charola amplia y alta (20 vasos por cada una) que se cubrió totalmente con plástico de cocina. Se mantuvieron todas las plantas durante tres días en cuarto de cultivo y posteriormente se llevaron a invernadero templado protegiéndolas con una malla de sombra durante la primera semana. Se aspersó ligeramente la solución de captán cada semana, disminuyendo en cada vez su concentración (2.0, 1.5, 1.0, y 0.5 g/l). Se regaron cada 15 días a capacidad de campo con solución nutritiva Long Aston (2 ppm de fósforo).

Pasadas cuatro semanas, se perforó el plástico de cobertura con ligeras aberturas que se incrementaron por semana, hasta la tercera. La cuarta semana, las plantas se expusieron completamente a la atmósfera del invernadero y se mantuvieron en estas condiciones durante seis semanas más. Posteriormente se llevó a cabo el trasplante a bolsas de plástico negro de 2.5 kg de capacidad con el mismo suelo de bosque.

c. Evaluación de los efectos de la micorrización.

Los efectos de la micorrización se cuantificaron a través de la comparación de la sobrevivencia, longitud del tallo, número de entrenudos, largo de la hoja más grande y desarrollo radical de las plantas que fueron inoculadas (M^+) contra las que no lo fueron (M^-). Se ratificó mediante tinción (Phillips y Hayman, 1970) el establecimiento de la micorriza en una muestra de raíces colectadas de los individuos sobrevivientes después de las 20 semanas.

III. Establecimiento de *C. atrosanguineus* en un suelo natural proveniente de su habitat original.

a. Determinación del perfil y colecta del suelo.

Una vez establecida la zona de estudio (véase antecedentes y anexo 2), se determinó con la ayuda de un informante, el área de distribución de poblaciones de varias especies de *Cosmos*. Se seleccionó cavar el pozo edafológico junto a un encinar en donde se colectó un *Cosmos* sp. Se abrió un perfil de 1 m de profundidad y se hicieron las descripciones usuales de campo. Se colectaron cada 10 cm muestras de aproximadamente 1.5 kg en bolsas de plástico para la determinación de los análisis. Se colectaron aproximadamente 10 kg de suelo hasta una profundidad de 30 cm, para el ensayo de establecimiento de las plantas micropropagadas.

b. Análisis fisicoquímicos y caracterización taxonómica.

Se hicieron las determinaciones fisicoquímicas de gabinete de las muestras de suelo colectadas en campo y junto con la información bibliográfica, se determinó taxonómicamente el suelo según los sistemas de clasificación de la Soil Taxonomy (19) y la FAO (19).

c. Establecimiento de las plantas en suelo.

El establecimiento se realizó conforme al mismo procedimiento descrito anteriormente para las plantas que fueron inoculadas. Dada la textura arcillosa y la gran compactación observada, se mejoraron las condiciones físicas con una mezcla 1:1 de agrolita.

IV. Análisis de la homogeneidad genética del clon sujeto a micropropagación.

a. Selección del sistema de corrimiento de las muestras.

Se establecieron ensayos preliminares de corrimiento de las isoenzimas EST, GOT, ME, ACPH, APX, CPX, DIA, PGI, LAP, Y PGM en el sistema LiOH_8 para pinos (Soltis *et al.*, 1983) con diferentes buffers de extracción (agua, buffer de pinos y buffer para muestras de maíz) a dos pH's. Dado que las muestras corrieron y tiñeron adecuadamente con este sistema, se eligió el buffer de extracción que permitiera la mejor definición.

b. Corrimiento de las muestras.

Se corrieron muestras provenientes de 30 individuos *in vitro*, en estado de endurecimiento anteriormente especificado, extraídas de la molienda de las hojas en el buffer de utilizado para Abies proporcionado por Fournier, 1996. Los filtros impregnados se conservaron a -70 C hasta la corrida de los geles. Se llevó a cabo un

total de 6 corridas en geles de almidón con los buffers descritos para este sistema, tiñiendo 4 rebanadas de cada uno.

c. Análisis de la variación del clon.

Se hicieron los análisis de variación para las isoenzimas cuyas bandas permitían una adecuada lectura y se descartaron aquellas de dudosa interpretación. Se cuantificó el porcentaje de individuos que presentaron variación para cada alelo del total de enzimas; el número de enzimas que presentaron variación y con esto se estimó el grado porcentual de estabilidad genética (conservación del fenotipo bioquímico).

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Micropropagación y establecimiento en suelo de *C. atrosanguineus*.

a. Multiplicación y subcultivo a partir de individuos clonados.

El subcultivo es una tarea continua que se requiere para mantener en un número constante a la población *in vitro* (Chávez y Rubluc, 1995). Esta labor se realiza cada 3 meses en dos maneras:

1. Resiembra de entrenudos en frascos con medio de mantenimiento y su incubación en cuarto de cultivo.

2. Resiembra en tubos de ensaye con medio de proliferación y endurecimiento en invernadero cálido.

Esto es con la finalidad de mantener el clon *in vitro* e ir sacando plantas a condiciones *ex vitro*. Para la etapa 1, se trabaja con una base de 500 individuos y en la 2 de 400. No se recomienda un número mayor debido a que se duplica la cantidad de trabajo y de insumos empleados. Se calcula que se han llevado a cabo alrededor de 10 a 12 subcultivos a partir de los 6 frascos donados por Kew.

b. Disminución de la tasa de proliferación y elongación de los tallos: establecimiento de las condiciones de endurecimiento.

La proliferación de los brotes axilares de esta planta *in vitro* es excesiva, aún cuando se mantenga en un medio a la mitad de su concentración. Igualmente, el

condiciones adecuadas de iluminación y de reguladores de crecimiento (citocininas): brotes de 10 cm de largo con 8 a 10 entrenudos (Chávez, 1994). Estas dos características provocan que las plantas tengan una menor resistencia para afrontar las condiciones de salida, por lo que se hizo necesario establecer condiciones de endurecimiento anteriores a la aclimatación (Roverts y Matthews, 1995, Vidal *et al.*, 1992; Estaún *et al.*, 1994).

Se ensayaron varias maneras de disminuir la tasa de crecimiento y apariencia etiolada, manipulando tanto las condiciones del medio de cultivo como las de incubación. La mejor respuesta morfológica se obtuvo en la siembra individual en tubos de ensayo con medio de proliferación, modificando el corte y siembra del explante: un sólo entrenudo que conservara un segmento de tallo por ambos extremos para que se introdujera en el medio el inferior sin sumergir el entrenudo. El incremento en la concentración del agar de 9 a 12 g/l disminuyó drásticamente el crecimiento de los brotes según lo establecido por Debergh (1983). Las condiciones de invernadero cálido permitieron mantener la presión por turgencia en las hojas, creando condiciones constantes de estrés hídrico (Ghashghaie *et al.*, 1991). Esto aunado a la mejor cantidad y calidad de la iluminación natural, desarrollaron uno o como máximo dos brotes axilares con hojas de mayor tamaño, grosor y de un verde intenso; tallos más vigorosos con tricomas visibles y de color café-rojizo como los de los individuos adultos. Se evitó de este modo, la proliferación tisular excesiva (brotación múltiple y desarrollo exagerado de las hojas que tenían contacto con el medio) de la base del explante, lo que dificultaba la separación y corte en el subcultivo. La cicatrización del segmento inferior del entrenudo inmerso en el medio, se presentó

como un muñón con un ligero engrosamiento de la punta a manera de pedúnculo. Esto facilita la posterior manipulación de la planta para el enraizamiento. La incidencia de callo también se disminuyó a una frecuencia de 2 ó 3 individuos por cada 40.

c. Ensayos de establecimiento en suelo y sustratos afines.

Se encontraron rotundas diferencias en el establecimiento de los brotes y su enraizamiento *in vitro* en distintos sustratos. La sobrevivencia de las plantas en vermiculita fue nula y del 3% en el suelo de bosque y vermiculita 1:1. Por la apariencia quemada de las plantas y la nula o casi nula sobrevivencia, se deduce que hubo un efecto tóxico de la vermiculita debido probablemente, a la acidificación del medio por el autoclaveo o a una concentración de metales traza vertidos al medio (Sreenivasa y Bagyaraj, 1988). La sobrevivencia en el suelo de bosque fue más prolongada (15 días) aunque no muy grande (4%) y también se atribuye a algún efecto tóxico debido al autoclaveo del suelo (Wilson, 1984). La producción de varias raíces ramificadas en la agrolita, la mayor y más prolongada sobrevivencia (75% a las cuatro semanas), aspecto y crecimiento de las plantas, permitieron escogerla como sustrato de aclimatación y enraizamiento *in vitro*. Este sistema simula a un cultivo hidropónico estéril en el que la planta no es ajena a su régimen mineral y se proporciona una gran aereación (que permite este sustrato una vez autoclaveado) favoreciendo el desarrollo de las raíces y demostrando con esto que es completamente inerte.

II. Efectos de la inoculación arbuscular en el establecimiento en suelo de *Cosmos atrosanguineus*.

a. Parámetros de evaluación para observar el efecto de la micorrización arbuscular.

Los efectos de la micorrización arbuscular fueron cuantificados con base a los parámetros establecidos por De la Viña (1994): largo del tallo, medidas de la hoja más grande (sustituído por número de hojas por planta, dado que era heterogéneo desde el cultivo *in vitro*) y número de entrenudos desarrollados. Si bien la inoculación se hizo en una fase temprana de aclimatación *ex vitro*, la sobrevivencia total y los parámetros anteriores, se consideran hasta una fase tardía (en el primer trasplante después de la inoculación a los cuatro meses), en las que las plantas pudieron manifestar realmente los efectos de la micorrización (Hamnatt, 1994). Se esperó a que las plantas tuvieran la madurez y funcionalidad metabólica normal para regular el desarrollo de la simbiosis (Morandi *et al.*, 1979; Azcón *et al.*, 1994; Jaizme *et al.*, 1994; Padilla *et al.*, 1994). Por otro lado, el haber establecido la inoculación *ex vitro* en esta etapa, se fundamenta en las experiencias observadas por muchos investigadores: la renovación total de las raíces producidas *in vitro* y la funcionalidad de las generadas rápidamente en suelo (Conner y Thomas, 1981; Palmujoki *et al.*, 1994; Uosukainen y Vetsberg, 1994; Rapparini *et al.*, 1994), la transición a un estado autótrofo normal al establecer una regulada tasa fotosintética por el completo dominio en la fisiología del estrés hídrico (Vestberg y Estaún, 1994), la disminución en los riesgos de contaminación por

el propágulo y el sustrato utilizado (Vidal, 1991; Avanzato *et al.*, 1994). Por otro lado, la adición de un germicida no ejerce un daño para el hongo y previene a la planta contra el ataque de fitopatógenos oportunistas (Guillemin *et al.*, 1994; De la Viña *et al.*, 1994), teniendo el suelo un efecto protector.

b. Efecto de la micorrización arbuscular en la longitud del tallo.

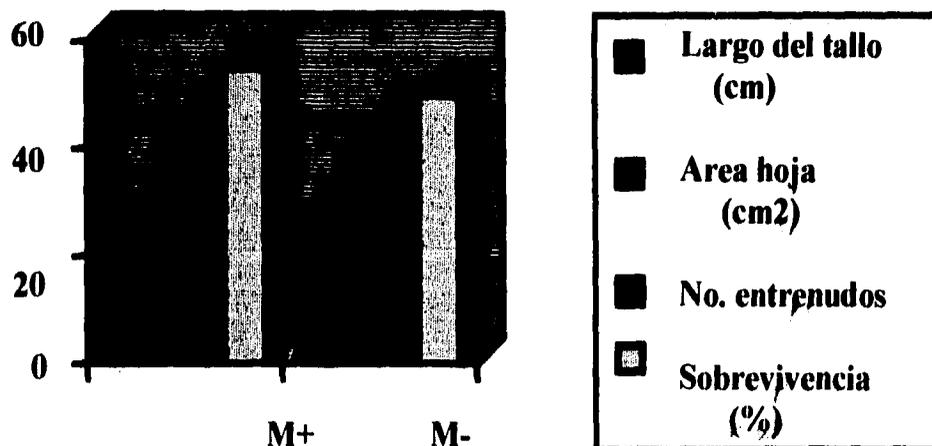
Los efectos de la micorrización arbuscular en la longitud del tallo son significativos y han sido observados también para otros cultivares: De la Viña *et al.*, (1994) y Rapparini *et al.*, (1994) encuentran un incremento en la longitud del tallo hasta tres veces mayor. El largo de los tallos se refleja en la altura de las plantas, que en este caso es de un 40% mayor para las micorrizadas.

* Los resultados se observan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto de la micorrización arbuscular en la adaptación de plantas micropropagadas de *Cosmos atrosanguineus*.

Parámetro:	M ⁺ (X)	M ⁻ (X)
1. Longitud del tallo (cm):	21.9*	13.3
2. Medidas de la hoja l x a (cm):	3.4 x 0.9	3.7 x 0.9
3. Numero de entrenudos:	13	10
4. Distancia internodal (cm):	1.7	1.3
5. Porcentaje de sobrevivencia:	55	50
6. Porcentaje de colonización:	15.8	0

* Existe una diferencia significativa debida al efecto de la micorrización ($\alpha=0.05$) para la prueba de comparación de medias poblacionales (Infante y Zárate, 1986).



Esto se puede atribuir a una mejor nutrición mineral como se observa en los cultivos *in vitro* con distintas concentraciones del medio. Si bien el tallo fue ligeramente más grueso, en ninguno de los dos tratamientos se logró el tamaño y aspecto de las plantas originales en donde los tallos soportan a una planta completamente erecta y tienen un diámetro decenas de veces mayor. Los tallos de las plantas micropropagadas tuvieron como característica principal, su crecimiento rastrero y torsión dando una o dos vueltas asentadas en el sustrato y dejando únicamente una tercera parte de su longitud totalmente aérea.

c. Efecto de la micorrización arbuscular en el tamaño de la hoja.

El efecto de la micorrización en el tamaño de las hojas (largo y ancho), así como en su morfología, no se manifestó siendo inclusive, muy ligeramente mayor en el largo para las plantas no micorrizadas (8 %). Si estas diferencias fueran significativas, podrían deberse a un mecanismo de las plantas para captar más luz y con eso tener una tasa fotosintética mayor. Sin embargo, dado que se conserva la media del ancho, no es factible considerar que exista una diferencia dado que la longitud de las demás hojas de cada planta varía considerablemente para cada individuo. Un factor importante, es que no se sacaron plantas con el mismo número y tamaño de hojas dado que su crecimiento *in vitro* no es tan homogéneo aún teniendo el mismo tiempo y condiciones de subcultivo. Probablemente las diferencias se expresen en etapas posteriores (Azcon *et al.*, 1994) o estén determinadas por el grado de colonización de las plantas (Parent, 1990) ya que la variación en los tamaños entre un mismo tratamiento fue grande.

d. Efecto de la micorrización arbuscular en el número y distanciamiento de entrenudos.

Esta característica mostro que efectivamente hubo una diferencia de 23% (aunque estadísticamente no significativa), probablemente como una consecuencia del incremento en la longitud del tallo. Sin embargo este valor no concuerda adecuadamente con la proporción de longitud tallo/número de entrenudos y su distanciamiento. Es decir que las plantas micorrizadas, elongan más el tallo y la distancia internodal, más no gastan su energía en producir un mayor número de entrenudos y como consecuencia, de hojas. Esto sólo se atribuye a un efecto totalmente hormonal que es muy común en las plantas colonizadas y que ha sido observado anteriormente (Rapparini *et al.*, (1994); Elmeskaoui *et al.*, 1994).

e. Efecto de la micorrización arbuscular en la sobrevivencia.

Es este el parámetro considerado de mayor importancia, dado que la micorrización de las plantas se llevó a cabo sustentada en un aumento en la sobrevivencia de las plantas. Como se ha hecho notar, los parámetros anteriormente mencionados dependen primordialmente del endófito (especie de hongo micorrízico arbuscular) que se utilice. En el caso de la sobrevivencia y en relación a esto, se pueden esperar:

1. Que se vea disminuída por efectos depresivos de la colonización (de una relación simbiótica a una parásita) (Varma y Schuëpp, 1994) atribuibles a la no bien regulada fisiología de la planta (Cassells, 1994) o a condiciones ambientales no propicias para la misma (Chávez y Ferrera, 1990).

2. Que se conserve sin variación, lo cual se puede deber a un no establecimiento de la simbiosis por causas de especificidad ecológica (Lovato *et al.*, 1994), de eficiencia del endófito (Palacios *et al.*, 1994), de dependencia micorrízica (Brundrett, 1991), de tiempo en el que se manifiesta el efecto de la micorrización (Hammatt, 1994), de etapa en la que se realiza la micorrización y factores que la influyen (Vidal, 1991; Vestberg y Estaún, 1994).

3. Que se aumente, gracias a la adecuada combinación de ambos simbiontes y/o a la influencia en la optimización de la nutrición mineral, pero fundamentalmente por la contribución en la regulación del estrés hídrico y de transplante.

Para esta investigación, el haber obtenido casi el mismo porcentaje de sobrevivencia se atribuye de acuerdo al inciso 2, a:

* Especificidad ecológica: el aislado de *Glomus fasciculatum* es una especie de hongo muy común en las investigaciones de micorrización arbuscular ya que es altamente inespecífico y de fácil propagación (Sreenivasa y Bagyaraj, 1988; Schellembaum *et al.*, 1991). Sin embargo, cabe destacar que la utilización de un inóculo mixto, probablemente hubiera descartado la posibilidad de cierta afinidad ecológica. Del mismo modo, el aislado de cepas nativas originales del hábitat, hubieran podido determinar si este resultado se debió a la especie de hongo micorrízico.

* La utilización de esporas para llevar a cabo la micorrización pudo no haber sido el mejor propágulo seleccionado ya que la colonización de las raíces depende de la viabilidad de las esporas, su porcentaje de germinación y crecimiento en el sustrato (Ortega, 1994). El empleo de otros propágulos como raíces colonizadas podría tener un mejor efecto (González, 1993).

Por otro lado, el grado de dependencia micorrízica de esta especie no pudo ser determinado con individuos naturalmente establecidos, ni tampoco por aquellos representados en el cultivo ornamental. Los sustratos que se emplean para la propagación de estos últimos, así como la dependencia micorrízica de las plantas domesticadas por cierto tiempo, disminuye notablemente ya que están siendo constantemente fertilizadas en su manejo. Se refirió la micorrización a otras especies del género (Berch *et al.*, 1988) y se intentó establecer la micorrización para conocer si era factible su colonización.

Por tanto, el tiempo en el que se manifiesta el efecto de la micorrización no se conoce y podemos decir que también puede haber una influencia en la sobrevivencia en este sentido (ya que ésta ha ido disminuyendo gradualmente conforme pasa el tiempo). Las plantas que fueron transplantadas y soportaron la fase de endurecimiento, aclimatación temprana, retransplante y post aclimatación; llegan a morir aún habiendo crecido y respondido durante todas estas etapas. Probablemente sea más adecuado establecer el efecto de la simbiosis en la sobrevivencia hasta que se realice el establecimiento al ambiente externo fuera del invernadero, siendo que la sobrevivencia abarca también la conclusión de un ciclo de vida que se continúa en la formación de flores, frutos, semillas y nuevas plantas. En el caso particular de *C. atrosanguineus* en el que sus semillas no son fértiles, podemos cuantificar la sobrevivencia a través del rizoma subterráneo a lo largo de un año. La formación de botones florales se ha presentado en plantas micorrizadas y no, aunque cabe destacar que ocurrió primero y en más individuos de las plantas micorrizadas.

Acerca de la etapa en la que se lleva a cabo la micorrización, se piensa que se seleccionó la más adecuada según los ensayos preliminares de establecimiento de las plantas en suelo, aunque también podría tener un mejor efecto el haberla llevado a cabo en el enraizamiento *in vitro*. No obstante que los factores que influyen la colonización, trataron de ser controlados en su totalidad (pH, contenido de fósforo disponible, aireación y contenido de agua del suelo, iluminación, humedad relativa, etc.).

f. Porcentaje de colonización de las raíces.

El establecimiento de una baja pero presente colonización arbuscular en las raíces de *Cosmos atrosanguineus* es uno de los resultados más importantes en esta tesis. Todos los factores anteriormente discutidos influyen este parámetro, aunque el caso no es conocer exactamente cuál de ellos pudo haber sido determinante, si no el de poder proponer otras alternativas para la micorrización, una vez demostrado su establecimiento. En relación a la morfología radical, podemos decir que no se apreciaron diferencias cualitativas debidas a la micorrización, teniendo en ambos casos, raíces finas y ramificadas, con pelos absorbentes muy homogéneos y que se distribuyen a lo largo de todo el terrón dando vueltas en la base del contenedor, las raíces primarias.

III. Establecimiento de *Cosmos atrosanguineus* en un suelo natural proveniente de su hábitat original.

a. Análisis fisicoquímicos y determinación taxonómica del suelo.

La caracterización del suelo utilizado en la adaptación de la planta, permitió determinarlo como un *Luvisol háptico* según el sistema de clasificación FAO/UNESCO (1991):

Suelos con un horizonte B árgico, capacidad de intercambio $> 24 \text{ cmolKg}^{-1}$ de arcilla, grado de saturación de bases del 50% o mayor en B, sin horizonte A móllico y E delimitado bruscamente sobre uno lentamente permeable. Horizonte B no pardo fuerte ni rojo, sin E álbico ni horizonte cálcico, ni concentraciones de caliza pulverulenta.

Para el sistema de clasificación de la Soil Taxonomy (1967), encontramos que corresponde a un *Paleudalf* con las siguientes características:

Horizonte arcilloso bajo uno óxico, sin epipedón móllico, saturación de bases mayor al 35 %, sin ser tau húmedo como los aqualfs ni tan frío como los boralfs, con sola de más de 1.5 m de profundidad, distribución de arcilla disminuída en menos de un 20% de su máximo a 1.5 m.

En general, las características de estos suelos, corresponden a climas templados húmedos y subhúmedos y/o de regiones tropicales y subtropicales Ocupan grandes extensiones de tierras forestales y se asocian a suelos de otros órdenes donde los patrones de microclimas se relacionan con aspectos de los terrenos de topografía madura, como sucede en el caso de la Sierra de Alvarez. En estos suelos se han lixiviado los carbonatos provocando una reacción del mismo ácida y desplazamiento de coloides. Esto viene seguido de la deposición de arcilla en el horizonte B principal,

creando un epipedón ócrico y la común presencia de cutanes de iluviación y sesquióxidos en B. No toda la arcilla de este horizonte proviene de la migración; también hay formación de la misma por intemperización de minerales. Por otro lado, los árboles proporcionan casi toda la materia orgánica del suelo y son susceptibles a sufrir una acelerada erosión (Buol y Hole, 1991).

Particularmente para este suelo, es interesante resaltar el hecho de que se piensa que es un paleosuelo formado en otra época geológica, donde las condiciones climáticas permitieron que se desarrollara el excesivo intemperizmo que demuestra (Gamma, 1996). Las condiciones climáticas actuales (véase anexo 2), no permitirían la génesis de un suelo de esta naturaleza.

En relación a sus características fisicoquímicas (cuadro 3), podemos interpretar lo siguiente:

A 1 m de profundidad, encontramos la presencia de dos horizontes (un A ócrico hasta los 40 cm y a partir de éstos un B argílico). Los colores van de un café amarillento en seco y café en húmedo (hasta los 20 cm), a un amarillo pardo en seco y café amarillento en húmedo en su profundidad. La textura es de un limo arcilloso hasta los 20 cm y posteriormente se manifiesta constantemente arcillosa. La relación limo/arcilla sólo es de 1 en las dos primeras capas y menor para el resto, lo que habla de la dominancia del material arcilloso y sus repercusiones en la estructura, plasticidad, compactación, y permeabilidad. La densidad aparente corresponde adecuadamente a la de un suelo arcilloso y la real a uno de constitución media. Ambas densidades no varían mucho a lo largo del perfil y permiten una porosidad menor al 50% desde los 20 cm, lo que dificulta el desarrollo radical. En relación al contenido de agua que está determinado

por la dominancia en la proporción arcillosa del perfil, se observa que aún a 1.5 KPa, es relativamente alta (alrededor del 10%) para un suelo seco. La permeabilidad es cada vez más lenta conforme crece el perfil siendo menor el frente de avance de 2 cm/h desde los 40 cm. Esto se relaciona con la porosidad (<50%) y el menor desarrollo de raíces. Los contenidos de materia orgánica son bastante bajos (aún en el epipedón) para un suelo que sustenta a una vegetación de bosque de encino, probablemente por la escasa densidad vegetal en el lugar de colecta (claro de bosque). El % de C y N como consecuencia, son muy bajos repercutiendo en la fertilidad del mismo: para los 10 primeros cm de profundidad, la relación C:N es mayor a 13 correspondiendo a hojarasca no muy descompuesta y mantillo más fragmentado hasta los 20 cm. A partir de los 30 cm, el contenido de materia orgánica y % de carbono es insignificante. Las bases intercambiables tienen valores elevados para los cuatro cationes. El calcio, apesar de encontrarse en una zona yesífera, no se encuentra en cantidades suficientes para constituir un horizonte de esta naturaleza; el magnesio también se encuentra en cantidades medias al igual que el sodio y sobre todo el potasio que es bastante su concentración en todo el perfil. Esto nos habla de que el lavado de bases no es muy grande por lo que la precipitación actual no pudo haber formado un suelo tan intemperizado y rico en bases. La capacidad de intercambio catiónico es alta por la fracción arcillosa, lo que resulta en un porcentaje de saturación de bases (PSB) también bastante alto. Esto si redundo en la fertilidad del suelo, que por lo general cumple con las características potenciales de los alfisoles o luvisoles (> del 50%). Los valores de pH son significativamente ácidos y muy ácidos después de los 60 cm de

profundidad. La acidez puede reflejar concentraciones significativas de aluminio, dado que las bases intercambiables no son tan reducidas, aunque en las mismas. Finalmente, el contenido de fósforo se determinó únicamente hasta donde se utilizó el suelo para el establecimiento de las plantas. Su disponibilidad es considerablemente alta a los 20 cm, en los que la actividad por la fracción orgánica es más intensa y disminuye drásticamente a los 30 cm.

b. Establecimiento de *Cosmos atrosanguineus* en un Luvisol.

El establecimiento de las plantas no presentó ningún problema en comparación al otro suelo utilizado. Si bien, la compactación de este suelo es PSB se incrementa ligeramente con la profundidad, nos hablan de un lavado de muy grande, se mejoró su textura con agrolita (una vez establecidos sus beneficios), para incrementar la aereación y mejorar el drenaje. La mezcla se preparó tamizando el suelo colectado (malla 0.8 mm) y autoclavándolo junto con la agrolita. El bajo contenido de materia orgánica impidió la retención de humedad como en el otro suelo, teniéndose que regar a las plantas más seguido y con más agua. El crecimiento de las plantas no micorrizadas en ambos suelos, fue muy similar en tamaño aunque las características morfológicas del tallo variaron ligeramente, siendo un poco menos delgados. Las raíces fueron también finas, pero su distribución a lo largo del terrón no se dio tan profusa debido a la gran compactación aún presentada.

Cuadro 3. Análisis fisicoquímicos del suelo (Luvisol).

Profundidad (cm)	Horizonte	Color		Textura				Clase textural USDA, 1990	Limo/arcilla	Densidad aparente	Densidad real	Porosidad %	Contenido de agua	Permeabilidad cm/h
		Seco (1.5KPa)	Húmedo (0.33KPa)	Gravas (>2 mm)	Arena (%)	Limo (<0.002 mm)	Arcilla							
0-10	A ₁	10 YR 5/4	10 YR 4/3	-	43	29	28	Limo-arcilloso	1.03	1.03	2.30	55.2	22.0	4.70
10-20	A ₂	10 YR 5/4	10 YR 4/3	-	42	29	29	Limo-arcilloso	1.00	1.10	2.35	54.2	18.0	4.30
20-30	AB	10 YR 6/4	10 YR 5/4	3	40	27	33	Arcilloso	0.82	1.20	2.40	50.0	15.0	3.70
30-40	AB	10 YR 6/4	10 YR 5/4	5	40	25	35	Arcilloso	0.71	1.20	2.40	50.0	11.0	2.40
40-50	B _{1t}	10 YR 6/6	10 YR 5/6	2	36	25	39	Arcilloso	0.64	1.30	2.35	44.7	7.0	1.80
50-60	B _{2t}	10 YR 6/6	10 YR 5/6	6	34	26	40	Arcilloso	0.65	1.30	2.35	44.7	7.5	1.20
60-70	B _{2t}	10 YR 6/6	10 YR 5/6	6	33	27	40	Arcilloso	0.67	1.35	2.35	42.6	7.8	1.10
70-80	B _{1t}	10 YR 6/6	10 YR 5/8	3	33	25	42	Arcilloso	0.59	1.35	2.35	42.6	7.9	1.00
80-90	B _{2t}	10 YR 6/6	10 YR 5/8	3	33	25	42	Arcilloso	0.59	1.37	2.37	42.2	10.0	0.95
90-100	B _{2t}	10 YR 6/6	10 YR 5/6	3	31	25	44	Arcilloso	0.57	1.37	2.37	42.2	10.0	0.95

Profundidad (cm)	Materia orgánica (%)	Nitrógeno total (%)	C/N	Bases intercambiables			Ca ⁺ /Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺ +Mg ⁺⁺ K	Saturación bases (%)	CaSO ₄ ·2H ₂ O (% V)	P soluble ppm	C.I.C.T		pH	
				*Ca	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺					2CH:2.5	CaCl ₂ 1:2.5		
0-10	3.50	0.128	15.86	17	5	1.0	2.0	3.40	11.0	71.4	3.5	1.28	35.0	5.82	4.90
10-20	2.70	0.128	12.24	15	4	0.8	1.3	3.75	14.6	66.6	2.0	7.35	32.0	5.50	4.35
20-30	1.40	0.110	7.38	13	4	0.5	1.7	3.25	10.0	71.1	4.0	3.0	27.0	5.20	4.20
30-40	0.85	0.095	5.19	13	3	0.6	1.7	4.33	9.4	73.2	4.0	-	25.0	5.20	4.10
40-50	0.60	0.030	11.60	12	4	0.4	1.8	3.00	8.9	79.1	5.5	-	23.0	5.10	4.10
50-60	0.55	0.025	12.76	13	4	0.4	1.8	3.25	9.4	83.5	5.5	-	23.0	5.00	3.90
60-70	0.50	0.025	11.60	11	3	0.5	1.7	3.66	8.2	77.1	6.2	-	21.0	5.10	3.90
70-80	0.47	0.020	13.63	14	3	0.5	1.7	4.66	10.0	86.7	6.5	-	21.0	5.10	3.75
80-90	0.47	-	-	15	3	0.5	1.6	5.00	11.2	100.5	7.0	-	20.0	5.20	3.90
90-100	0.45	-	-	13	4	0.3	1.3	3.25	13.1	93.0	7.0	-	20.0	5.20	3.90

El porcentaje de sobrevivencia para este tratamiento también fue similar (alrededor del 50%), aunque se utilizaron únicamente la mitad de los individuos. Esta adaptación de las plantas demuestra que pueden ser establecidas en suelos naturales procedentes de su edafosistema nativo, aún cuando éstos presenten deficiencias, como la compactación ocurrida en estecaso. Se puede entonces demostrar, que es un intento válido, el establecer y adaptar a las plantas micropropagadas en suelo colectado en campo para ser considerado y aplicado en estudios de reintroducción.

IV. Análisis de la variación genética de *Cosmos atrosanguineus* micropropagados a través del estudio de isoenzimas.

a. Isoenzimas analizadas.

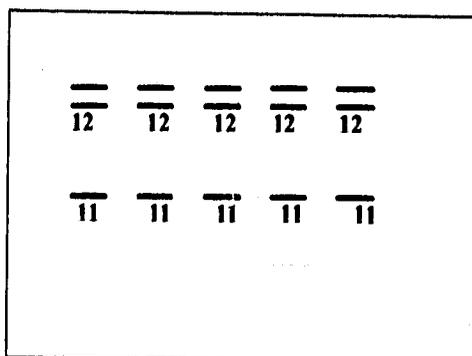
Se probaron un total de 14 enzimas: MDH, PGD, PGM, IDH, PHI, ACPH, GD, ME, APX, CPX, PGI, LAP, GOT, EST. Se seleccionaron aquellas en las que las bandan definieron lo más homogéneamente posible para todos los individuos que se corrieron. Algunas de ellas vertieron información para varios loci, por lo que se condiera la variación total por loci cuantificados más que por isoenzima(Pérez, 1996). Los resultados se resumen en el cuadro 4 y se esquematizan en los siguientes zimogramas.

Cuadro 4. Resultado de la variación encontrada en las isoenzimas analizadas.

Enzima	Estructura	Sistema de corrida	No. loci totales	loci polimórficos	No. alelos
Peroxidasa (APX y CPX) E.C.1.11.1.7	Monómero	LiOH8	2	---	2
Fosfoglucosa isomerasa (PGI) E.C.5.3.1.9	Dímero	LiOH8	5	---	1
Leucina-amino peptidasa (LAP) E.C.3.4.11.1	Monómero	LiOH8	3	---	1
Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT) E.C.2.6.1.1	Dímero	LiOH8	2	2	3
Diaforasa (DIA) E.C.1.6.4.3	Tetramero	LiOH8	3	1	3
Fosfatasa ácida (Acph) E.C.3.1.3.2.	Dímero	LiOH8	4	--	2
Esterasa (EST) E.C.3.1.1.1	Dímero ó Monómero	LiOH8	1	1	2
Enzima málica (ME) E.C.1.1.1.40	Tetramero ó Monómero	LiOH8	2	1	2

Zimogarmas. Esquemas de los patrones de bandeo que presentaron los loci de las enzimas del cuadro 3.

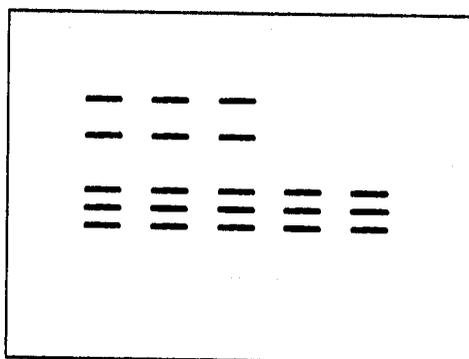
APX



APX-1

APX-2

PGI

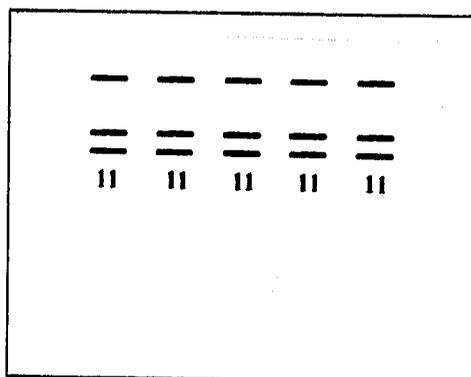


PGI-1

PGI-2

PGI-3

LAP

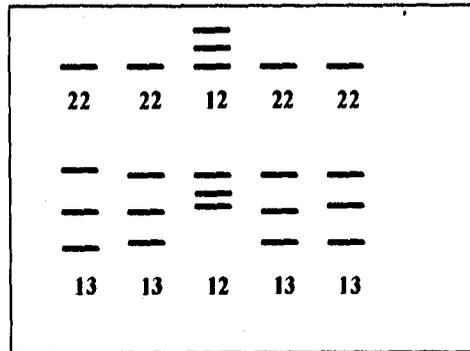


LAP-1

LAP-2

LAP-3

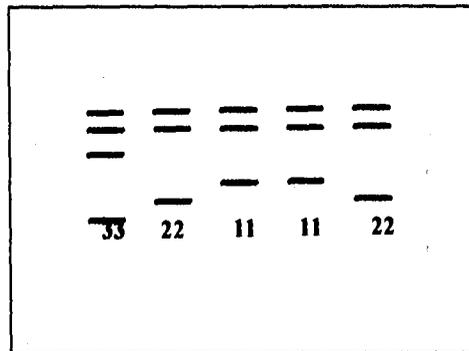
GOT



GOT-1

GOT-2

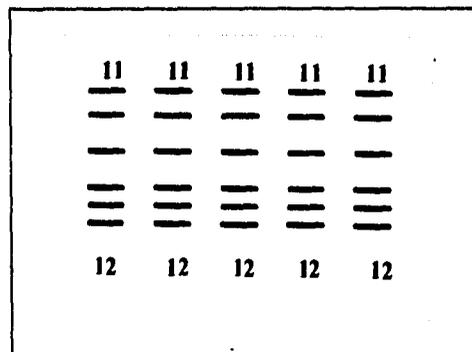
DIA



DIA-1
DIA-2

DIA-3

ACPH



Acph-1

Acph-2

Acph-3

Acph-4

EST

<u>12</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

EST-1

ME

<u>11</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
<u>22</u>	<u>22</u>	<u>12</u>	<u>22</u>	<u>22</u>

ME-1

ME-2

b. Análisis de la variación de *Cosmos atrosanguineus* debida a la micropropagación.

En relación a los zimogramas presentados anteriormente, encontramos que se manifiesta variación genética en el clon micropropagado *in vitro* para algunas isoenzimas. Entre ellas, se encontró variación de un individuo para los dos loci de GOT, una variación casi completa e irregular manifestada en casi todos los individuos para uno de los loci de DIA; variación para algunos individuos en un loci de EST y para algunos otros de ME. El resto de las enzimas permanecieron sin cambios en las frecuencias alélicas. La isoenzima DIA es la que presentó una mayor heterogeneidad y cantidad de variación, seguida de la EST y ME. El cálculo del porcentaje de polimorfismo y las frecuencias alélicas se da a continuación:

$$\% \text{ Polimorfismo} = (\text{no. loci polimórficos} / \text{total}) \times 100 = (5/19) \times 100 = 26 \%$$

Cuadro 5. Frecuencias fenotípicas en los distintos loci.

APX-1	12=1	GOT-2	13=0.97	ACPH-2	11=1
APX-2	11=1		12=0.03	ACPH-3	11=1
PGI-3	12=1	DIA-1	11=1	ACPH-4	12=1
LAP-1	11=1	DIA-2	11=1	EST-1	11=0.75
LAP-2	11=1	DIA-3	11=0.44		12=0.25
LAP-3	11=1		22=0.48	ME-1	11=1
GOT-1	22=0.97		33=0.07	ME-2	12=0.23
	12=0.03	ACPH-1	11=1		22=0.77

El porcentaje de polimorfismo que se manifestó es considerable y en el caso de uno de los alelos de la DIA-3, se ven completamente modificadas las frecuencias génicas no siendo posible determinar a la original. Para el caso de la EST-1 y

ME-2, también encontramos una alteración significativa de las frecuencias génicas y un comienzo para GOT-1.

Las fuentes de variación se explican no precisamente como una consecuencia de los factores propios del subcultivo, si no a una imprecisión en el seguimiento del evento morfogénico que dió lugar a la regeneración de nuevos individuos. Esto significa que muchas de las plantas forman callos que regeneran nuevos brotes; la cuantificación y monitoreo de estos eventos morfogénicos no pudo precisarse en un momento del subcultivo (Sánchez, s.f.). Esto aunado a las concentraciones y combinaciones hormonales que se estuvieron llevando a cabo para establecer condiciones óptimas de subcultivo, así como la excesiva proliferación de la planta *in vitro*, pudieron generar esta incipiente y fortuita variación en algunas de las isoenzimas. Para el caso de la DIA, se presentó una gran variación, posiblemente porque ésta es mucho más inestable ante eventos acelerados de multiplicación celular, a la influencia hormonal y/o inestabilidad en el proceso de desdiferenciación (Maurer, 1971).

Estos resultados acerca de la variación espontánea que ocurre en un cultivar, podrían permitir explicar las causas de la heterogeneidad morfológica de algunas plantas tanto *in vitro* como *ex vitro*, ya que como se estableció anteriormente, la eficiencia bioquímica del metabolismo se ve afectada y con esto el crecimiento (Goodman y Stuber, 1983). Aunque, el aspecto más importante de considerar, es que el cultivo de tejidos vegetales ha sido considerado como una de las vías más exitosas de propagación vegetativa y preservación del genoma. Por lo visto, se

deben cuidar los aspectos del subcultivo cuando no se precise inducir una variación dentro del cultivar. Para el caso particular de *Cosmos atrosanguineus*, esta variación es requerida, cuanto más pudiera serlo por estos mecanismos en los que se logra estabilidad genética (no se observan ploidías en los patrones de bandedo), mucho mejor que la producida por radiación u otros métodos. Esto abre una posibilidad para recomendar a la micropropagación por cultivo de tejidos, como mecanismo de reproducción de especies en extinción con una base genética reducida para posteriores intentos de reintroducción.

CONCLUSIONES

* La micorrización arbuscular de plantas micropropagadas es una práctica potencialmente valiosa para lograr establecer exitosamente a las plantas a las condiciones *ex vitro*. Para que esto sea factible, se deben adecuar las condiciones del cultivar a las del endófito y a ambas con las que involucran un favorecimiento de la simbiosis.

* La reintroducción de plantas en peligro de desaparecer a sus ecosistemas nativos, se verá grandemente favorecida si se considera el papel que juegan los microorganismos de la rizosfera y el suelo como factor determinante de las condiciones de adaptación.

* Las isoenzimas son una arma poderosa para detectar cambios en las poblaciones que se sujetan a la micropropagación y ésta es a su vez, una técnica adecuada para la multiplicación de especies en peligro ya que se pueden inducir a través de la misma, mutaciones en individuos de escasa representación genética natural.

ANEXO 1. Descripción botánica de especies afines.

A continuación se dan las diferencias botánicas entre *Dahlia*, *Cosmos* y *Bidens* (Rodríguez y Porras, 1985) puesto que esta especie ha sido colocada taxonómicamente en estos tres géneros:

En *Cosmos*, los filamentos son pubescentes, los aquenios básicamente tetragonales en corte transversal y con un surco en cada cara. En la *Dahlia*, los filamentos son glabros con aquenios rara vez tetragonales en corte transversal y con un surco en cada cara. Las raíces son tuberosas, las brácteas involucrales exteriores carnosas, los aquenios fuertemente comprimidos a veces triangulares en corte transversal, lineares a oblongos u oblonceolados, plantas generalmente robustas rara vez de menos de 50 cm de alto con cabezuelas frecuentemente de más de 5 cm de diámetro. El género *Bidens* no tiene las raíces tuberosas, las brácteas involucrales exteriores no son carnosas, las cabezuelas de menos de 5 cm de diámetro con aquenios sin alas nunca anchamente ovados, básicamente tri o tetragonales en corte transversal y frecuentemente alado comprimidos y acostillados.

Los tres géneros comparten en común los aquenios de las flores del disco similares a las flores liguladas o bien las flores liguladas estériles con páleas planas o a penas cóncavas sin abrazar, los aquenios de las flores del disco dorsoventralmente comprimidos a veces lineares. Flores liguladas sin androceo y en la periferia de las cabezuelas corolas 2 a 4 dentadas en el ápice sin látex ni vilano.

Se proporciona la descripción botánica de *Cosmos scabiosoides* H. B. K., la especie más similar a *C. atrosanguineus* (Montesinos, 1985).

Hierba perenne erecta de 70 a 130 cm de alto, raíces fasciculadas y tuberosas, tallo subcuadrangular, ramificado, pubescente; con hojas generalmente pecioladas y pinnatipartidas o a veces simples, con peciolo alado de 2.5 a 10 cm de largo, segmentos casi lineares o lanceolado-ovados, rómbicos o de otras formas, hasta de 1.7 cm de ancho, ápice acuminado con márgenes ciliados, aserrados, envés pubescente y haz glabro, hojas indivisas lanceoladas, ovado lanceoladas o de otras formas; cabezuelas generalmente 3 a 4 sobre dunculos delgados, hasta de 20 cm de longitud, en la anthesis de 2 a 4.3 cm de ancho; involucre glabro, brácteas externas 7 a 8 linear-lanceoladas de alrededor de 3.5 mm de longitud, ápice obtuso agudo, brillante y endurecido, verdes con 5 a 7 estrías de color modo, brácteas internas moradas más grandes que las externas; flores liguladas alrededor de 8 con lígulas de color guinda obscuro casi negruzco de 1 a 1.5 cm de longitud, obovadas con el ápice redondeado frecuentemente con 3 dientes obtusos, páleas lineares o lanceoladas, amarillas con los bordes morados, glabras, aquenios angostamente fusiformes con un rostro alargado tetragonales con un surco en cada cara glabros de 1.2 a 2 cm de longitu y 0.8 a 1 mm de ancho con vilano de aristas delgadas, retrorsamente barbadas de 2.5 a 3.5 mm de longitud. Se conocen dos variedades de las cuales en el Valle de México se encuentra la Var. scabiosioides con segmentos de las hojas en formas diversas pero nunca oblongos. Crecen en altitudes de 2 350 a 3 000 msnm en Bosque de *Quercus*, *Pinus*, *Juniperus*, *Cupressus*, pastizal. También se distribuye de Nayarit a Veracruz y Chiapas.

ANEXO 2. Caracterización de la zona de estudio.

a. Clima, flora y conservación.

Para la Sierra de Alvarez se encuentran reportados dos tipos de vegetación en las cartas topográficas del CETENAL que son Chaparral y Bosque. El clima según la carta climática del Instituto de Geografía de la UNAM es para la sierra seco o estepario semiseco con inviernos frescos, temperatura media anual entre 18 y 22 C, mes más frío <18 C (BShw''(w)(e)g). Para Alvarez es templado semiseco o semiárido con lluvias en verano siendo el menos seco de los climas secos, con un cociente de precipitación temperatura > 22.9, con veranos cálidos y temperatura media anual entre 12 y 18 C, siendo la del mes más frío entre -3 y 18 C y la del mes más cálido > 18 (BS₁Kw(e)g). El régimen de lluvias es en verano y es por lo menos 10 veces mayor la lluvia en el mes más húmedo que la mitad caliente del año del mes más seco, siendo el porcentaje de lluvias en invierno entre 5 y 10.2 de la total anual. La marcha de la temperatura es tipo Ganges presentándose el mes más cálido de todo el año antes de junio, extremoso con oscilación entre 7 y 14 C.

Según un estudio hecho por Flores y Gerez (1994), en el estado de San Luis Potosí, se tiene estimado que un 7.3 % del total de su flora, está representado por Bosque de Encino. Si bien se redujo en un 2.2 %, el 42.5 % del mismo todavía se conserva íntegro y el restante 57.5 % se considera ya perturbado. Es uno de los estados con mayor diversidad en cuanto a tipos de vegetación representados (20 según lo establecido por Rzedowski) y en el que el Bosque del Encino ocupa un 4.78 % de su superficie. El total de su flora protegida se calcula en un 0.6 % de su área y dentro de

esta insignificante cifra se encuentra circunscrito el Bosque de Encino dentro de "El Potosí" decretado como Parque Nacional con aproximadamente unas 20 000 hectáreas por SEDUE, SEDESOL y el IUCN. La Sierra de Alvarez también se decretó Reserva Natural por los mismos organismos además de una zona protectora de flora y fauna por la SAHR y que cuenta con alrededor de 16 900 hectáreas.

b. Geología y edafología.

La sierra de Alvarez constituye el macizo montañoso que separa el altiplano de las llanuras que forman la cuenca del Río Verde con yacimientos de yeso y mármol. Al oriente de la sierra se encuentran riolitas sedimentarias de tipo conglomerado macizo montañoso compuesto por calizas lutitas y brecha (CENEM, 1988). Se encuentra a los 22 101' y corresponde a la Provincia de la Meseta del Centro. Cuenta con 400 años de actividad minera con recursos de plata, plomo, estaño, mercurio, antimonio y los yacimientos de fluorita más importantes del país, así como yacimientos de yeso y azufre. También se explota la cantera rosa de la roca riolítica. En las guerras mundiales se explotó mercurio y antimonio siendo a principios de los años 50 cuando se descubrieron los yacimientos de fluorita. En la época porfirista se introdujo el ferrocarril y comenzó la minería de trasnacionales como la ASARCO (American Smelting & Refining Company) que suspende la explotación en tiempos de la Revolución ya que eran comunes los asaltos por bandoleros que aprovechaban la anarquía que imperaba en ese entonces (SEMIP, 1992). Para 1925 comienza nuevamente la explotación de las minas y tiene su mayor auge de 1930 a 1947, año en el que se retira esta compañía definitivamente. La extracción de Mercurio fue muy

importante en la década de los 60 hasta 1973, permaneciendo en total abandono el Municipio de San Nicolás Tolentino a partir de estas fechas. Esto a pesar de estar en el centro turístico ejidal de Santa Catarina, conocido como "El Valle de los Fantasmas".

Alvarez la población, se encuentra localizada a los 101 23' y 22 00' en la desviación de San Francisco (Km 53) de la carretera Federal MEX70 (Fig. 1). Dado que la Sierra de Alvarez forma parte de la Sierra Gorda, está consolidada por suelos jóvenes de origen sedimentario y aluvial. La caracterización edáfica según la Carta edafológica emitida por el CETENAL en 1974, refiere para el este de Alvarez (en la zona de colecta) Luvisoles órnicos con fase salina, de textura fina encontrándose en un terreno con disección de severa a montañosa con pendientes mayores de 20 % , cuya caracterización se hizo sin muestreo y con pozos a cielo abierto (Lo + I / 3c). Para el noroeste de Alvarez se describen Litosoles y Luvisoles crónicos de fase lítica con lecho rocoso, entre 10 y 50 cm de profundidad (I+Lc/3c). Para el suroeste se presentan Litosoles y Phaeozems lúvicos y rendzinas de textura media (I+HI+E/2c).

Las altitudes según la carta topográfica del CETENAL para la zona de colecta son de 2 300 msnm con un tope de 2 600 m hacia el sur de Alvarez y 2 500 m hacia el norte.

ANEXO 3. Consideraciones taxonómicas de *Glomus fasciculatum*.

Varela (1994) hace una síntesis de lo que ha sido la trayectoria taxonómica de las micorrizas arbusculares: comenzó en 1809 con Link y a partir de entonces, ha habido numerosos cambios a varios niveles: desde haberlos situado en los Tuberales (Fries, 1849) y posteriormente como Mucorales (Bucholtz, 1922). A este nivel, ya para 1974, su situación quedó definida en los Ficomycetos y es cuando Gerdemann propone cuatro géneros para las micorrizas arbusculares. Para 1979 se añade otro género más y para 1986, todavía se hicieron reordenaciones a nivel género, e inclusive la propuesta de una nueva familia por Pirozinski y Dalpé en 1989 (Glomaceae). Morton y Benny en 1990 proponen dos nuevas familias y un nuevo orden (Glomales).

Estos increíbles devenires en la taxonomía, son a causa de ser asexuados, considerándoseles como *morfoespecies* que mantienen caracteres lo suficientemente conservados aunque distintos, como para diferenciarlos en aproximadamente 150 especies diferentes (Varela, 1994).

A esto hay que añadir que las investigaciones en micorrizas arbusculares han centrado su atención en las respuestas de las plantas, y pocas de ellas consideran con detalle la taxonomía de los endófitos. En el caso de *Glomus fasciculatum*, se generó un problema realmente complicado con su taxonomía, probablemente a consecuencia de su amplia distribución natural y denotada plasticidad genética (Morton, 1988). Esta morfoespecie no ha sido identificada aún con precisión (Walker y Koske, 1987), siendo probable que en muchos reportes bibliográficos en los que se le ha descrito, se refieren a otras especies todavía no determinadas. El complejo de especies

desconocidas que encierra la palabra *Glomus fasciculatum*, debe ser aclarado con urgencia por taxónomos con mucha experiencia. Esta es una tarea muy laboriosa y para muchos trabajos infructífera puesto no se ha dejado ninguna evidencia fotográfica o esquemática. Por esta razón, y en justificación a que el aislado utilizado para llevar a cabo este trabajo proviene de una descripción taxonómica no actual, se dejarán depositadas algunas preparaciones fijas en el Laboratorio de Biología del Suelo del Departamento de Edafología del Instituto de Geología, UNAM.

LITERATURA CITADA

- Altamirano P. R. 1993. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-PA-LRN-001/93, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, raras, endémicas, amenazadas, en peligro de extinción y sujetas a protección especial. En: *Primera Sección del Diario Oficial de la Federación*. Pp. 12-40. Lunes 2 de agosto.
- Aguilera H. N. 1990. *Tratado de edafología de México*. Tomo I. UNAM, México. 222 p.
- Ancora G., Belli-Donini M. L., Cuzzo L. 1981. *Scientia Horticulturae* 14: 207-213.
- Andrews A. T. 1985. *Electrophoresis*. Clarendon Press, Oxford. 452 p.
- Atkinson D., Norman J. R., Hooker J. E. 1994. Potential of AM fungi for the biological control of Phytophthora in strawberry. En: Eds. Gianinazzi S., Schüepp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 108. Commission of European communities, 254 p.
- Avanzato D., Cherubini S., Dominici A. C., Liberali M., Speranza S., 1994. Preliminary trials on direct rooting of apple microcuttings ex vitro, inoculated with *Glomus mosseae* y *Azospirillum brasilense*. En: Gianinazzi S., Schüepp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 64-65. Commission of European communities, 254 p.
- Azcón-Aguilar C., Encina C. L., Azcón R., Barea J. M. 1994. Effect of arbuscular mycorrhiza on growth and development of annona cherimola micropropagated plants. En: Eds. Gianinazzi S., Schüepp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 56. Commission of European communities, 254 p.
- Baas R. 1990. Effect of *Glomus fasciculatum* and isolated rhizosphere microorganisms on growth and phosphate uptake of *Plantago major* sp. pleiosperma. *Plant and Soil* 124: 187-193.
- Barea J. M., Azcón-Aguilar C., Azcón R. 1992. Mycorrhiza and crops. En: Ed. Tommerup I. C. *Advances in plant pathology. Mycorrhiza: A synthesis*. Academic Press, New York.
- Becard G., Fortin J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on RiT-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Berry R. J. 1970. Conservation aspects of the genetical constitution of populations. En: Ed. Duffey E. *The scientific management of animal and plant communities for conservation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 652 p.
- Berta G., Trotta A., Fusconi A., Cardinale F., Hooker J. E., Atkinson D., Munro M., Giovanetti M., Tisserant B., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 1994. AM fungi induces changes to the root morphology of micropropagated *Prunus cerasifera*. En: Eds. Gianinazzi S., Schüepp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 52. Commission of European communities, 257 p.

Bianchini F., Carrara A. 1975. *Guía de plantas y flores*. Ed. Grijalbo, España, 448 p.

Blal B., Morel C., Gianinazzi-Pearson V., Fardeau J. C., Gianinazzi S. 1990. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on phosphate fertilizer efficiency in two tropical acids soils planted with micropropagated iol palm (*Elaeis guineensis* jacq.) *Biol. fertil. Soils* 9: 43-48.

Boudarga K., Lapeyrie F., Dexheimer J. 1990. A technique for dual vesicular-arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal infection of Eucalyptus *in vitro*. *New Phytol.* 114: 73-76.

Buol S. W., Hole F. D., McCracken R. J. 1991. *Génesis y clasificación de suelos*. Ed. Trillas, México. 417 p.

Brainerd K. E., Fuchigami L. H. 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA and CO₂. *J. Exp. Bot.* 33: 388-392.

Brand M. H. 1992. Tissue culture variations: problems y solutions. *Am. Nurseyman* 175:60-71.

Branzanti B., Ravolanirina F., Gianinazzi S. 1989. Endomicorizzazione di fruttiferi micropropagati. Symposium: Culture *in vitro* e micropropagazione in Ortoflorofrutticoltura. Cesena, Italia. 77-82.

Brundrett, M. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. En: Eds. Begon, M., Fitter A. H., MacFadyen A. *Advances in Ecological Research*. Vol. 21. Pp. 171- 313. Academic Press, London, 403 p.

Brundrett M. C., Piché Y., Peterson R. L. 1985. A developmental study of early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can. J. Bot.* 63: 184-194

Cassells A. C. 1994. Towards autotropic micropropagation: an opportunity to establish AMF under "axenic" conditions?. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 71. Comission of European communities, 254 p.

Centro Nacional de Estudios Municipales de la Secretaría de Gobernación (CENEM). 1988. Los Municipios de San Luis Potosí. En: Colección Enciclopédica de los Municipios de México. México, 280 p.

Champney C. 1992. Tissue culture. *Am. Nurseyman* 175:30-39.

Chávez A. V. M., 1994. *Reporte del manejo de los individuos donados por Kew*. 13 de enero.

Chávez M. C. G., Ferrera-Cerrato R. 1990. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on tissue culture derived plantlets of strawberry. *HortScience* 25(8): 903-905.

Chávez A. V. M., Rublao Y. A. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. En: Ed. Linares E., Dávila P., Chiang F., Bye R. Elias T. S. *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Pp. 123-131. UNAM, México. 175 p.

Chée R. 1984. How to improve growth and yield in tissue culture. *Am. Nurseyman* 160 88): 51-63.

Comision de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1974. Carta edafológica 1:50,000. Santa Catarina. Según FAO/UNESCO 1970, modificada por CETENAL. F14A85 México.

Comision de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1974. Carta topográfica 1:50,000. F14A85. México.

Conner A. J., Thomas M. B. 1981. Re-establishing plants from tissue culture: a review. *Pl. Propagator's Soc. Proc.* 31: 342-357.

Conner L., Conner A. J. 1984. Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant Sci. Lett.* 36: 241-246.

Daniels B. A., Wilson G. T. W. 1989. Suppression of mycorrhizal fungus spore germination in non sterile soil: relationship to mycorrhizal growth response in big bluestem. *Mycologia* 81(3): 382-390.

Debergh P. C. 1983. Effects of agar brand concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant* 59: 270-276.

Dehne H. W. 1990. Application of inocula of VA mycorrhizal fungi in inorganic carrier material materials in practical agriculture and horticulture. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eigth North American Conference on Mycorrhizae*. Pp. 73.

De la Viña G., Azcón-Aguilar C., Barea J. M., Pliago-Alfaro F. 1994. Effects of VA mycorrhizas (*Glomus* sp.) in acclimatization of micropropagated avocado (*Persea americana*) Mill. En: *Abstracts del 4th. European Symposium on Mycorrhizae*. Pp. 260. Alhambra, España.

Diop T. A., Piché I. 1990. Long-term outcome of an endomycorrhizal symbiosis under aseptic conditions.

Ecker L. 1989. Rare plant reintroductions. *Agave* 3(3): 6-8.

Elmeskaoui A., Damont J. P., Poulin M. J., Piché Y., Desjardins Y. 1994. Establishment of *in vitro* endomycorrhizal culture system intended for growth enhancement of micropropagated plantlets. *Mycorrhiza*: En prensa.

Estaún V., Calvet C., Camprubi A. 1994. Arbuscular mycorrhizae and growth enhancement of micropropagated *Prunus* rootstock in different soilless potting mixes. *Agric. Sci. Finn.* 3.

FAO/UNESCO. 1991. Mapa mundial de suelos. Leyenda revisada. Roma. 142 p.

Fay M. 1993. SOS to return Cosmos to México. *Plant Heritage* 3(3): 22.

Ferrera-Cerrato R. 1944. Importancia de la micorriza arbuscular en la fruticultura. En: *Memorias del 5o. Congreso Nacional de Micología*. Pp. S-19. Gto., Guanajuato.

Filipini R., Caniato R., Cappelletti E. M., Piovan A., Innocenti G., Cassina G. 1994. *In vitro* regeneration of *Haplophyllum patavinum* (L.) G. Donfil, a rare and endangered plant. En: Ed. Fay M. *Botanical Gardens micropropagation news*. Pp. 87-90. Vol. 1 part 7.

Flegmann A. W., George R. A. T. 1979. *Soils and other growth media*. McMillan Press, Hong Kong. 170 p.

Flores V. O., Gerez P. 1994. *Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo*. Edic. técnico científicas, México, 439 p.

Fortuna p., Citeresi S., Morini S., Giovanetti M., Loreti F. 1992. Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S 2/5 plum rootstock. *Agronomie* 12: 825-830.

ESTA TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA

- Frankel O. H., Soulé M. E. 1981. *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gamma J. 1996. Caracterización edáfica del perfil. Comunicación personal.
- Ghashghaie J., Brenckmann F., Saugier B. 1991. Effets of agar concentration on water status and growth of rase plants cultured *in vitro*. *Physiologia plantarum* 82: 73-78.
- Gianinazzi S., Schuëpp H. 1994. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Comission of European communities, 254 p.
- Gianinazzi S., Schuëpp H. 1994. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. pp. 13-23. Birkhäuser-Verlag, Suiza. 226 p.
- González M. C. 1993. La endomicorriza vesículo-arbuscular. En: Eds. Ferrera C. F., González M. C. A., Rodríguez M. N. *Manual de Agromicrobiología*. Ed. Trillas, México. 142 p.
- Goodman M. M., Stuber C. W. 1983. Maize. En: Eds. Tanksley S. D., Orton T. J. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part B. Pp. 1-35. Elsevier, Amsterdam.
- Griffins J. L. 1984. How we have overcome the problems of establishing plantlets in soil. *Am. nurseryman* 160 (8): 73-75.
- Guillemin J. P., Gianinazzi S., Gianinazzi-pearson V. 1994. Micropropagation of pineapple, endomycorrhization and plant development. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 51. Comission of European communities, 254 p.
- Granger R. L., Planchette c., Fortin J. A. 1983. Effect of vesicular-arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. *Canadian Journal of Plant Science* 63:551-555.
- Gryndler M., Vosatka M., Vejsaadovš H., Hiselovš H. 1994. Effect of dual inoculation by VAM fungi and rhizosphere bacteria on the growth of strawberry. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 142. Comission of European communities, 254 p.
- Hall L. A. 1987. Transplantation of sensitive plants as mitigation for environmental impacts. En: Ed. Elias T. S. *Conservation and Management of rare and endangered plants*. Pp. 413-420. Native Plant Society, Sacramento.
- Halperin W. 1973. The use of cultured tissue in studying developmental problems. *Can J. Bot.* 51: 1801-1806.
- Hammatt N. 1994. Mycorrhization of micropropagated mature wild cherry (*Prunus avium*) and common ash (*Fraxinus excelsior*). En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 53. Comission of European communities, 254 p.
- Hepper C. 1984. Regulation on spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Trans. br. mycol. Soc.* 83(1): 154-156.

Hernández F. 1943. *Historia de las plantas de la Nueva España*.

Hernández C., Poulin M. J., Piché Y., Desjardins Y. 1994. Effecto of VAM fungi on water relations of micropropagated strawberry plantlets during rooting phase. Poster presentado en *el 4th European simposium on mycorrhizas*. 11-14 julio, Granada, España.

Hewitt . 1966. *Sand and water methods in the study of plant nutrition*. Commonwealth Agriculture Bureau. Comm. 22. Farnham Royal, England.

Hooker. 1861. *Cosmos diversifolius var. atrosanguineus* pl. 5227. Curtis's Botanical Magazine 87, Jan. 1s.

Hooker J. E., Jaime-Vega M., Atkinson D. 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi S., Schüepp H. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Pp. 191-200. Birkhäuser-Verlag, Suiza, 226 p.

Howarth J. R. 1993. Comunicación personal dirigida al Dr. R. Bye el 29 de abril.

Hrzelova H., Gryndler M., Vancura V. 1989. Influence of inoculation with VA mycorrhizal fungus *Glomus* sp. on the growth of strawberry and runner formation. *Agricultural Ecosyst. and Environ.* 29: 193-197.

Hurtado M. D. 1988. Adaptación de plantas obtenidas in vitro a condiciones naturales. En: Eds. Hurtado D. V., Merino M. E. *Cultivo de tejidos vegetales*. Pp. 154-161. Ed. Trillas, México. 232 p.

Infante S., Zárate G. P. 1986. *Métodos estadísticos*. Ed. Trillas, México. 643 p.

Instituto de Geografía, UNAM. 1970. Carta Climática 1: 50,000.

Jaime-Vega M. C., Berta G., Gianinazzi S. 1994. Effect of *Glomus intraradices* on root systems morphology of micropropagated banana plants. Pp. 152. En: *Memorias del 4th European simposium on mycorrhizas*. Pp. 94. Gráficas Alhambra, Granada, España, 260 p.

Jenkins W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.

Kew Royal Botanical Gardens. 1994. *Cosmos atrosanguineus* a well-know but endangered member of Compositae. *Kew Scientist Issue* 5: 8

Kew Royal Botanical Gardens. 1994. Propagation of orchids from seeds. *Kew Information sheet K 14*.

Kew Royal Botanical gardens. 1994. The sainsbury orchid conservation project: propagation for conservation. *Kew Information sheet K 15*.

Klein-Cox C. 1984. There are many pitfalls inoperating a tissue culture lab. *Am. Nurseyman* 160:

Knuttel A. J. 1989. Tissue culture troubles. *Am. Nurseyman* 170: 43-49.

Koide R. T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand y plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.* 117: 365-386.

Koide R. T. 1989. Appropriate controls for vesicular-arbuscular mycorrhiza research. *New Phytol.* 111: 35-44.

Kough J. L., Gianinazzi-Pearson V. 1985. Physiological aspects of VA mycorrhizal hyphae in root tissue and soil. En: *Mycorrhizae: physiology and genetics*. Pp. 223-226. INRA, Paris, 1986 p.

Lei J., Piché Y. 1990. Nutrient uptake and its role in the in vitro culture of the VAM fungus *Gigaspora margarita*. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eigth NorteAmerican Conference on Mycorrhizae*. Pp. 181.

Leitch S. W. W., Smith S. E., Langridge P., 1990. The effect of inoculation with ericoid mycorrhiza on the growth of tissue cultured rhododendrons. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eigth NorteAmerican Conference on Mycorrhizae*. Pp. 182.

Lin M. T. 1990. Commercial utilization of VAM fungi. The brazilian experience. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eigth NorteAmerican Conference on Mycorrhizae*. Pp. 185.

Lin M. T., Lucena F. B., Mattos M. A. M. Paiva M., Assis M., Caldas I. S. 1987. Greenhouse production of mycorrhizal plants of nine transplanted crops. En: Eds. Sylvia D. M, Hung L. L., Graham J. H. *Mycorrhizae in the next decade. 7th. NACOM*, May 3-8, Gainesville, Florida. University of Florida, 281 p.

Linderman R. G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78 (3): 366-371.

Lovato P., Guillemin J. P., Gianinazzi S. 1992. Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. *Agronomie* 12: 873-880.

Lovato P., Hammatt N., Gianinazzi-Pearson V. y Gianinazzi S. 1994. Mycorrhization of micropropagated wild cherry (*Prunus avium* L.) and common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Agric. Sci. Fin.* 3.

Marks G. C. 1991. Causal morphology and evolution of mycorrhizas. *Agric. Ecosyst. and Environ.* 35: 89-104.

Martínez M., G. Matuda. 1979. Flora del Estado de México II.

McCown D. D. 1992. Tissue culture shopping. *Am. nurseyman* 175:51-59.

McGonigle T. P., Fitter A. H. 1990. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological Research* 94 (1): 120-122.

Maurer H. R. 1971. *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*. Walter de gruyter, Berlín. 222 p.

Mezitt R. W. 1988. Will tissue culture last?. *Am. Nurseyman* 167: 61-65.

Moncousin C., O'Rourke, Gavillet S., Maschke M. 1994. Application of the method of systematic variations for the determination of an optimal ionic equilibrium for the rooting of jork and the germination of *Glomus* spores. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 75-79. Comission of European communities, 254 p.

Montesinos M. D. 1985. Cosmos Cav. En: Ed. Rzedowski J., Calderón G. Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Pp. 536- 538. Instituto de Ecología, Michoacán. 674 p.

Morandi D., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 1979. Intérêt de l'endomycorhization dans la reprise et la croissance du Framboisier issu de multiplication végétative *in vitro*. *Ann. Amélior. Plantes* 29(6): 623-630.

Morte M. A., Honrubia M. 1994. Study of ectendomycorrhizal interaction between *Helianthemum almeriense* micropropagated plantlets and *Terferzia clavaryi* in different culture condition. Pp. 160. En: *Memorias del 4th European symposium on mycorrhizas*. Pp. 94. Gráficas Alhambra, Granada, España, 260 p

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 5: 473-497.

Noss R. 1987. Corridors in real landscapes: a reply to Simberoff and Cox. *Conservation Biology* 1: 159-164.

Nuutila A. M., Vetsberg M., M. Uosukainen M., Kauppinen V. 1994. Studies on infection of strawberry hairy roots with arbuscular mycorrhizal fungus. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 67. Comission of European communities, 254 p.

Ortega L. M. P. 1994. Germinación de un hongo endomicorrícico vesículo-arbuscular (*Glomus fasciculatum*) en medios axénicos y ensayo de inoculación *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli*. Tesis de licenciatura, Departamento de Biología, Fac. de Ciencias. UNAM; México. 92 p.

Padilla I. G., Encina C. L., Caro E., Azcón-A. C. 1994. Photosynthesis rate estimation in micropropagated cherimoya plants inoculated with different arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 163. En: *Memorias del 4th European symposium on mycorrhizas*. Pp. 94. Gráficas Alhambra, Granada, España, 260 p.

Palacios-Mayorga S., Shimada K., Salinas C. 1987. Efecto de la inoculación de dos variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) con cuatro hongos micorrizicos en un suelo muy deficiente en fósforo. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 29: 329-336.

Palmujoki H., Parikka P., Vetsberg M., Uosukainen M. 1994. Control of strawberry crown root (*Phytophthora cactorum*) with arbuscular mycorrhizal fungi. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 60. Comission of European communities, 254 p.

Palmujoki H., Parikka P., Vetsberg M., Uosukainen M. 1994. Control of strawberry crown rot (*Phytophthora cactorium*) with arbuscular mycorrhizal fungi. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 60. Comission of European communities, 254 p.

Parent S. 1990. Problems associated with the formulation of a premixed medium containing VAM. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eighth North American Conference on Mycorrhizae*. Pp. 234.

Pérez N. 1966. Interpretación de las lecturas de los geles. Comunicación personal.

Phillips J. M., Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. mycol. Soc.* 55: 158-161.

Pons F., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Navalet J. C. 1983. Studies of VA mycorrhizae in vitro: mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. *Plant and Soil* 71: 217-221.

Pospisilova J., Solarova J., Catski J., Ondrej M., Opatrny Z. 1988. The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. *Photosynthetica* 22: 205-213.

Prece J. E., Sutter E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouses and field. En: Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H. *Micropropagation, technology and applications*. Pp. 71-93. Klumer Academic Publishers, Dordrecht. 484 p.

Rapparini F., Baraldi R., Bertazza G., Branzanti B., Predier S., 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit trees. *J. Hort. Science* 69(6): 1101-1109.

Raven P. H. 1984. Foreword. The IUCN/NSF Plants Conservation Program. pp. 1.

Raven P. H. 1976. *Ethics and attitudes in conservation of threatened plants*. En: NATO Conference Series no. 1. Ecology. Pp. 155-180. Plenum Press, New York.

Ravolanirina F., Gianinazzi S., Trouvelot A., Carre m. 1989. Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks. *Agriculture, Ecosist. and Environ.* 29: 323-327.

Reader's Digest. 1967. *El libro del jardín y la terraza*. The Readers's Digest Association Limited, México, 528 p.

Renou J. P., Brochard P., Jalouzot R. 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzveler) after hygromycin resistance selection. *Plant Science* 89: 185-197.

Rodríguez B., Porras M. C. 1985. *Botánica sistemática*. UACH, México, 424 p.

Rewcastle J. 1994. Crop protection using arbuscular mycorrhizal fungi. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 58. Commission of European communities, 254 p.

Romano A., Noronha C., Martins-Lou_ao M. A. 1994. The role of ectomycorrhizals during acclimatization of cork-oak micropropagated plantlets. Pp. 205. En: *Memorias del 4th European symposium on mycorrhizas*. Pp. 94. Gráficas Alhambra, Granada, España, 260 p.

Rovert A. V., Matthews D. 1995. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. *Plant cell, tissue and organ culture* 40: 191-193.

Rubluo I. A., Flores-Martínez G. S. f. Hacia un modelo de micropropagación de catáceas como herramienta para su conservación. Manuscrito para publicación.

Rubluo I. A. Chávez M. V., Martínez P. A., Martínez Vázquez O. 1993. Strategies for the recovery and endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biol. Conservation* 63: 163-169.

Rubluo I. A. S. f. Logros y perspectivas del cultivo de tejidos vegetales en especies mexicanas amenazadas de extinción. Manuscrito.

Rzedowski J., Calderón G. Eds. 1985. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Vol. II. México, 674 p.

Rzedowski J. 1986. *Claves para identificar los géneros de la Familia Compositae en México*. UASLP, SLP.

Sánchez V. A. 1987. *Conservación biológica en México*. UACH, México, 136 p.

Sánchez S. O. 1980. *La flora del valle de México*. Ed. Herrero, México, 519 p.

Sánchez E. S.f. Características del proceso de diferenciación celular en cultivos *in vitro* de plantas superiores. Pp. 3-7.

Sánchez-D_az M., Honrubia M. 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. Pp. 167-178. En: eds. Gianinazzi S., Scudépp H. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser-Verlag, Suiza, 226 p.

Sallanon H., Coudret A. 1990. Flux d'eau entre vitroplants et atmosphère en micropropagation. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III*. 310: 607-613.

Schubert A., Martinelli M. 1988. Effect of vesicular-arbuscular on growth of *in vitro* propagated *Pistacia integerrima*. *Acta Hort*. 441-443.

Schellenbaum L., Berta G., Ravolanirina F., Tisserant B., Gianinazzi S., Fitter A. H. 1991. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany* 68: 135-141.

Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal. 1992. *Monografía geológico-minera del estado de San Luis potosí*. México, 217 p.

Sherff E. E. 1932. A revision of Genus *Cosmos*. En: Eds. Sherff E. E., Dutilgreen B. E. *Field Museum of Natural History*. Botanical Series 8 (6). Studies of American Plants III. Pp. 401-447. Chicago.

Singer M. J., Munns D. N. 1992. *Soils: an introduction*. McMillan Publishing Co., New York. 473 p.

Schubert A., Bodrino C., Gribaudo I. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plants. *Agronomie* 12: 847-850.

Schubert A., Mazzitelli M., Ariusso O. Eynard I. 1990. Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevines: influence of endophyte strain, P fertilization and growth medium. *Vitis* 29: 5-13

Schubert A., Mazzitelli M., Gribaudo I. 1987. Effect of inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* Kober 5 BB. *Proceedings Symposium, Florizel* 87, Bélgica. 144-153.

Soil Survey Staff. 1967. Supplement to soil classification, a comprehensive system -7th approximation. U. S. Dept. Agr. Us. Govt. Printing office, Washington.

Sreenivasa M. N., Bagyaraj D. J. 1988. Selection of a suitable substrate for mass multiplication of *Glomus fasciculatum*. *Plant and Soil* 109: 125-127.

Strullu D. G., Romand C. 1987. Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorrhizes et ré-association *in vitro* de racines de Tomate. *CR. Acad. Sci. Paris* t 305 Serie III p.15-19.

Sutter E. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 113: 234-238.

Sutter E., Langhans R. W. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 104: 493-496.

Torres P., Honrubia M. 1990. *In vitro* synthesis of mycorrhizae between *Pinus halepensis* Miller and some presumed ectomycorrhizal fungi from southern spanish forests. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eigth North American Conference on Mycorrhizae*. Pp. 287.

Tuinen D. V., Dulieu H., Zézé A., Gianinazzi-Pearson V. 1994. Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizal fungi at the molecular level. En: Eds.

Uosukainen M., Vetsberg M. 1994. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaning and subsequent growth of micropropagated *Mallus* (L.) Moench. *Agric. Sci. Finl.* 3.

Uosukainen M., Vetsberg M. 1994. Effects of carbohydrates on subsequent growth of plum. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 54. Commission of European communities, 254 p.

Varela L. 1994. Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares (Glomales). En: *Memorias del 5o. Congreso Nacional de Micología*. Pp. 53. Guanajuato.

Varma A., Schuëpp H. 1994. Infectivity and effectiveness of *Glomus intraradices* on micropropagated plants. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp H. *Cost 8.10 Vesicular-arbuscular mycorrhizas report of 1993 activities*. Pp. 140. Commission of European communities, 254 p.

Vázquez J. M., Estrada A. 1994. Inoculación con hongos micorrízicos arbusculares a nivel de almácigo en un cultivo de tomate verde y su respuesta en campo. En: *Memorias del 5o. Congreso Nacional de Micología*. Pp. 52. Gto., Guanajuato.

Vetsberg M. 1992. The effect of growth substrate and fertilizer on the growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of three hosts. *Agric. Sci. Finl.* 1: 95-105.

Vetsberg M., Estaún V. 1994. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. En: Eds. Gianinazzi S., Schuëpp *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Pp. 217-226. Birkhäuser Verlag, Suiza. 226 p.

Vetsberg M., Palmujoki H., Parikka P., Uosukainen M. 1994. Effects of arbuscular mycorrhiza on crown rot (*Phytophthora cactorum*) in micropropagated strawberry plants. *Agric. Sci. Finl.* 3.

Vidal D. M. T. 1991. Contribución al estudio de los factores que influyen en el crecimiento *in vitro* de hongos de las micorrizas VA y su establecimiento en plantas micropropagadas. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.

Vidal M. T., azcón-Aguilar C., Barea J. M. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortSci.* 27: 785-787.

Vovides A. P. 1995. Experiencias y avances en el conocimiento de las plantas mexicanas en peligro de extinción. En: *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Eds. Linares E. Dávila P., Chiang F., Bye R., Elias T. S. Pp. 139-144. UNAM, México, 175 p.

Williams P. G. 1990. Recognizing a VA in axenic culture. En: Eds. Allen M. F., White S. E. *Eighth North-American Conference on Mycorrhiza*. pp. 307.

Wilson J. M. 1984. Inhibition of germination of spores of a *Gigaspora* species in sterilized soils. *Soil Biol. Biochem.* 16 (4): 433-435.

Wochok Z. S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biol. Conservation* 20:83-90.

Wood T., Cummings B. 1992. Biotechnology and the future of VAM commercialization. En: Ed. Allen M. F. *Mycorrhizal functioning*. Pp. 468-487. Chapman and Hall, New York, 534 p.

Zhipeng Z., Shiuchien K. 1990. Production of axenic VA mycorrhiza inoculum and its inoculation effect on the tissue-cultured plantlets of Paulownia. En: Eds. Allen M. F., White S. E., *Eighth North-American Conference on Mycorrhizae*. Pp. 323.

Ziv M., Schwartz A., Fleminger D. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. *Plant Sci.* 52: 124-127.