



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**Posgrado en Recursos Bióticos**

**Protocolo para la Restauración de una Población de  
*Mammillaria mathildae* en la Provincia de Juriquilla, Qro.**

**T E S I S**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN RECURSOS BIÓTICOS**

**P r e s e n t a:**

**M. en C. OSCAR RICARDO GARCÍA RUBIO**

**Director de Tesis: Dra. Guadalupe X. Malda Barrera**

**Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre 2009**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Recursos Bióticos

## **Protocolo para la Restauración de una Población de *Mammillaria mathildae* en la Provincia de Juriquilla, Qro.**

### **TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Recursos Bióticos

#### **Presenta:**

M. en C. Oscar Ricardo García Rubio

#### **Dirigido por:**

Dra. Guadalupe X. Malda Barrera

### **SINODALES**

Dra. Guadalupe X. Malda Barrera  
Presidente

Dr. Robert W. Jones  
Secretario

Dr. Humberto Suzán Aspíri  
Vocal

Dr. Rolando T. Barcenás Luna  
Suplente

Dr. Yoav Bashan  
Suplente

~~Dr. Jaime Angeles Angeles  
Director de la Facultad de  
Ciencias Naturales~~

~~Dr. Luis Hernández Sandoval  
Director de Investigación y  
Posgrado~~

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2009, México

## RESUMEN

*Mammillaria mathildae* es un cactus endémico de Querétaro considerado en peligro de extinción por su escaso número. La población de la Cañada de Juriquilla presenta condiciones favorables para iniciar un proceso de restauración. Los siguientes criterios, considerados fundamentales para la restauración de una población, fueron atendidos para esta investigación: 1) El conocimiento preciso de su distribución en base a las condiciones del macro y microhábitat. 2) El efecto de los factores abióticos sobre la población. 3) El desarrollo de un método de propagación y cultivo eficiente. 4) El estudio de los factores bióticos que influyen en el establecimiento, crecimiento y reproducción exitosa. El análisis de la distribución se hizo con un modelo de predicción de nicho. El análisis espacial mejoró el proceso de búsqueda de nuevas poblaciones de *M. mathildae*, a través de la ubicación de las especies asociadas (*Lysiloma microphylla* y *Bursera fagaroides*) y disociadas (*Anisacanthus quadrifidus* y *Prosopis laevigata*). Con estos datos se localizaron seis nuevas poblaciones (dos en un Parque Nacional). El patrón de lluvias de la región ha cambiado en los últimos años, ocasionando un cambio en la estructura poblacional de *M. mathildae*, así como en su fenología. El cactus florece y fructifica de finales de mayo a agosto; sin embargo, en 2005 y 2006 la floración ocurrió 1.5 meses antes que en 2003, año en que las lluvias empezaron tarde y fueron abundantes, como consecuencia la población disminuyó de 209 plantas a 111 en 2005. En contraste, la distribución homogénea de la precipitación en 2005 y 2006 favoreció la producción de frutos y semillas, además permitió el reclutamiento de 31 plántulas en 2006. Con la finalidad de restaurar la población de la Cañada de Juriquilla se desarrolló un protocolo de re-introducción. Las plantas necesarias se obtuvieron por cultivo de tejidos. La activación de explantes se hizo en medio MS, sin reguladores de crecimiento, se obtuvieron  $4.09 \pm 0.13$  tallos por explante. Las plántulas cultivadas en medio MS generaron raíz en dos meses. El 98% de las plántulas sobrevivió a su aclimatación en el invernadero; sin embargo, después de su re-introducción se registró una caída

del 48% en cinco meses. La alta mortalidad se asoció con la baja disponibilidad de agua. Para lidiar con este problema, las plantas fueron inoculadas con un consorcio nativo de micorrizas vesículo arbusculares usando cultivo aeropónico. Las micorrizas colonizaron el 100% de las plántulas en 60 días, y en 74 días el lote mostró diferencias significativas respecto del control en tamaño, diámetro y contenido de P (2.0, 1.4 cm y  $0.552 \pm 0.01$  mg P<sup>-1</sup> seco/g suelo Vs. 2.9, 2.4 y  $0.344 \pm 0.01$ ). En 10 meses, las plántulas alcanzaron el tamaño de plantas silvestres de cuatro años de edad; y tras seis meses floreció el 66% en invernadero y 14% en campo. El 89% de las plantas sobrevivió a la estación seca del bosque tropical caducifolio, en contraste el 49% de las plantas no micorrizadas murió en el mismo período. El tamaño alcanzado por la planta y la alta acumulación de P ayudaron a esta especie a adaptarse rápidamente a la vida silvestre, donde la escasez de agua y la baja disponibilidad de nutrientes es una constante. Esta investigación fue la base para lograr el nombramiento como área natural protegida de la Cañada de Juriquilla.

## ABSTRACT

*Mammillaria mathildae* is an endemic cactus. It is considered an endangered species due to its restricted population size. The population of Cañada de Juriquilla presents favorable conditions to initiate a restoration process. The following criteria are considered essential for the restoration of a population, and were taken into account for this research: 1) Knowledge of the distribution on the basis of macro and microhabitat conditions. 2) Inference of natural phenomena on the population. 3) Development of micropropagation and cultivation method. 4) Study of biotic factors influencing establishment, growth and successful reproduction. The distribution analysis was performed by niche model prediction. Spatial analysis improved the process of locating new populations of *M. mathildae*, because their location was indirectly detected by screening of spatially associated species (*Lysiloma microphylla* and *Bursera fagaroides*) and negatively associated species (*Anisacanthus quadrifidus* and *Prosopis laevigata*). With these data, six new populations were located (two in a National Park). The pattern of rainfall in the region has recently changed, modifying the population structure of *M. mathildae*, as well as its phenology. *M. mathildae* flowers and fructifies from late May to August; however, in 2005 and 2006, flowering occurred 1.5 months earlier than in 2003 when the rains started late and were extremely abundant. As a result the population declined from 209 plants to 111 in 2005. In contrast, the even distribution of rainfall in 2005 and 2006 favored the production of fruits and seeds, allowing the recruitment of 31 seedlings in 2006. In order to restore the population of Cañada de Juriquilla a reintroduction protocol was developed. Plant material was obtained by tissue culture. Activation of explants was done on MS medium without growth regulators;  $4.09 \pm 0.13$  shoots per explant were obtained. Plantlets grown on MS medium generated roots after two months in culture. During acclimatization 98% of seedlings survived in greenhouse, but after its reintroduction the lot dropped 48% in five months. The high mortality was associated to low water availability. To deal with this problem, the plants were inoculated with a consortium of native

vesicular arbuscular mycorrhizae using aeroponic culture. Mycorrhizae colonized 100% of seedlings in 60 days and, 14 days after, the lot showed significant differences from the control in size, diameter and P content (2.0, 1.4 cm and  $0.552 \pm 0.01 \text{ mg P}^{-1} \text{ dry / g soil}$  Vs 2.9, 2.4 and  $0.344 \pm 0.01$ ). In 10 months, the seedlings reached the size of four year old wild specimens; and six months after 66%, flowered in greenhouse and 14% in field. 89% of the plants survived the dry season in tropical deciduous forest, in contrast to 49% of non-mycorrhizal plants that died in the same period. The size attained by the plants and the high accumulation of P helped this species adapt rapidly to the wild, where water scarcity and low nutrient availability is a constant. This research was fundamental in order to achieve the protected area status of Cañada Juriquilla.

# **DEDICATORIA**

**A mi pequeña familia...**



## AGRADECIMIENTOS

La consecución de esta tesis fue gracias a la sucesión de varios eventos afortunados, de los cuales el primero fue el encontrarme con la Dra. Lupita, quien supo encausar mi inquietud sobre el estudio de la micropropagación y re-introducción de cactáceas.

Es indefectible decir que la conclusión del trabajo se logró gracias a las contribuciones de diferentes personas e instituciones que me place enumerar a continuación.

En primera instancia expreso mi más profundo y sentido agradecimiento a mi asesora la Dra. Guadalupe X. Malda Barrera, quien no solo me ayudó en la planeación, desarrollo y consecución de mi trabajo de tesis, sino que siempre se ocupó en poner a mi disposición los recursos necesarios para llevar a buen puerto esta investigación. Además de asignarme un par de becas, así como impulsarme a impartir algunas asignaturas para los alumnos de las licenciaturas en Biología, Nutrición y Biotecnología.

Tengo que agradecer de forma muy especial todos los oportunos comentarios, diferentes perspectivas, acertados aportes y asesorías puntuales que sobre mi trabajo de tesis hicieron los integrantes de mi comité tutorial conformado por los doctores Aurelio Guevara Escobar, Hector Hernández Macias, Humberto Suzán Azpirí, Robert W. Jones, Rolando T. Bárcenas Luna y Yoav Bashan.

Le agradezco a los doctores Luis Hernández Sandoval y Robert W. Jones quienes amablemente accedieron a formar parte de mi comité de examen predoctoral. Además, el Dr. Luis me ayudó en la identificación algunas de las especies vegetales asociadas a la cactácea en estudio. Por otro lado, quiero reconocer la meticulosidad, paciencia y las horas de trabajo que el Dr. Jones dedicó a la identificación de algunos insectos asociados con la *M. mathildae*.

Durante el desarrollo de este trabajo siempre tuve abiertas las puertas de los doctores Mahinda Martínez y Díaz, Margarita Teresa de Jesús García Gasca,

Carlos López González, Héctor Andrade Montemayor; Pedro Gutiérrez Yurritia y Raúl Pineda López, quienes, además de ayudarme a puntualizar algunos conceptos, me facilitaron diversos equipos y reactivos de laboratorio.

Para la identificación de las especies vegetales agradezco la ayuda de las M. en C. Lucero Quistian Rangel, Marisela Gómez Sánchez y Yolanda Pantoja Hernández, a quien además agradezco su ayuda en el modelaje en GARP del nicho potencial de la *M. mathildae*. Para esta tarea, fueron de gran ayuda los consejos y la facilitación de las capas topográficas y climáticas por parte del M. en C. Roberto Carlos Almazán Nuñez.

Agradezco al Biól. Alejandro Cabrera Luna que me enseñó a localizar en campo a la *M. mathildae* y me llevó a la población tipo de la misma.

Durante mi estancia en el CIBNOR fui muy bien recibido por el Dr. Yoav Bashan y sus colaboradores. En especial tengo que mencionar a la Dra. Esther Puente quien me compartió sus conocimientos sobre las micorrizas arbusculares y ecología del área. De mucha ayuda fueron el M en C. Juan Pablo Hernández, el Biól. Marino Bernardo Salazar Aguilar, la Ing. Rocío Lizzet Villalpando.

Agradezco a los M. en C. Norma Hernández Camacho, Bertha Zuñiga Tovar y Heli Coronel Arellano, así como a las biólogas Patricia Salinas, M. de la Luz Ruiz Maqueda, Daniel Avila Aguilar y Joshue Pedro Fernando Baltazar Rivera quienes me ayudaron a diversas tareas en el laboratorio y en el campo.

La ilustración de la *M. mathildae*, que me hubiera sido imposible realizar en tan buena forma, fue concebida por mi talentoso amigo el Biól. Aslam Narváez Parra, a quien además tengo que agradecer que me permitió adornar algunas páginas de este escrito con otras de sus magníficas ilustraciones.

La traducción al francés y la revisión del artículo IV fue realizada por mis amigas Alba Caiceros Gallegos y Céline Allouche, gracias.

El uso práctico de algunas investigaciones aquí descritas fue impulsado por la Sra. América Vizcaino Sahún, gracias América por no darte por vencida ante nuestras ineficientes y frustrantes Instituciones Ambientales.

Todos los hostigantes trámites administrativos fueron más pasaderos gracias a la ayuda de Carolina Zumaya Malagón, quien me facilitó buena parte de esta engorrosa actividad.

Mis últimos agradecimientos personales, no por ello menos importantes, son para mis padres Teresa Rubio y Ricardo García, y para mi esposa Gabriela Madrid Cuevas quienes me ayudaron en variadas actividades, desde el arduo trabajo de campo, hasta el cuidado de las plantas que usamos en esta investigación; así como en la revisión del trabajo escrito, ¡muchas gracias por todo!

Fueron varias las instituciones que ayudaron a realizar esta tesis aportando recursos, becas, entrenamiento técnico o equipo, a continuación las enumero.

Dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro las siguientes direcciones y jefaturas asignaron recursos para la realización de este trabajo: La Coordinación de la Maestría en Gestión Integrada de Cuencas, a cargo del Dr. Raúl Pineda López, pagó el transporte para asistir al “Biodiversity Assessment and Monitoring Course, 2005” impartido por el Smithsonian Institution.

La Coordinación de la Maestría y Doctorado en Recursos Bióticos, a cargo del Dr. Edmundo Díaz Pardo, cubrió los viáticos para realizar una estancia de entrenamiento técnico en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La misma instancia aportó recursos para asistir al XVII Congreso Mexicano de Botánica 2007.

La Jefatura de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales, a cargo del Dr. Humberto Suzán Azpirí, aportó recursos para la presentación de algunas ponencias en diversos foros y congresos: Foro de Investigación y Posgrado 2006 (Facultad de Biología, UAQ); XVII Congreso Mexicano de Botánica 2007; Symposium Climate Change and Biodiversity 2008; 56 Southwestern Association of Naturalists Meeting 2009; y Simposio sobre Conservación y Manejo de Recursos Vegetales en América Latina 2009.

La Dirección de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, representada primero por el Dr. Carlos Sosa; y a últimas fechas por el M. en C. Jaime Ángeles Ángeles, realizó varias gestiones para lograr la consecución de apoyos y trámites. Además cubrió parte de los viáticos para asistir al Symposium Climate Change and Biodiversity 2008 y a la 56<sup>th</sup> Southwestern Association of Naturalists Meeting 2009.

La Dirección de Investigación y Posgrado de la UAQ, a cargo del Dr. Luis Hernández Sandoval, aportó recursos para asistir al Symposium Climate Change and Biodiversity 2008.

La Secretaría Académica de la UAQ, representada por el Dr. Guillermo Cabrera López, eximió el pago de los gastos de titulación como reconocimiento por haber obtenido el mejor promedio de la generación.

Tengo que reconocer y agradecer las loables iniciativas de organismos gubernamentales y no gubernamentales, nacionales e internacionales que se sumaron para acrecentar mi formación y la consecución de este trabajo de investigación.

Para realizar los estudios demográficos y de reintroducción sobre la *M. mathildae* el Fideicomiso Queretano para la Conservación del Medio Ambiente (FIQMA) amablemente nos permitió el libre acceso en la Cañada de Juriquilla (predio adquirido por este organismo para su conservación).

Durante los reconocimientos en campo para buscar nuevas poblaciones de *M. mathildae* les agradezco a todas las personas que me permitieron “husmear” en sus terrenos; asimismo agradezco a Pamela Siurob Carbajal por autorizar el acceso al Parque Nacional El Cimatario.

Los estudios de infestación con micorrizas vesículo arbusculares fueron realizados con una cámara de crecimiento aeropónico donada por la ONG americana “Idea Wild”.

El “Smithsonian Institution’s Center for Latino Initiatives” me otorgó una beca para asistir al “Smithsonian MAB Program’s 2005 Biodiversity Assessment and Monitoring Course”, muchas gracias a todos los investigadores invitados y compañeros que compartieron sus experiencias y conocimientos durante esos

meses de intenso trabajo. En particular tengo que agradecer las atenciones del Director de Monitoreo y Tasamiento de la Biodiversidad, Dr. Francisco Dallmeier; al Asistente del Director para la Conservación y Desarrollo, Dr. Alfonso Alonso; y, a la coordinadora de Educación y Entrenamiento, Jennifer Sevin.

Para mis estudios acerca de los efectos del cambio climático sobre la población de *M. mathildae*, fue muy oportuna la invitación del Gobierno de Canadá a través de “Minister of the Environment Canada” para tomar el “Climate Models: Scenarios for future climate change for impacts and adaptations studies, 2008” para cuyo efecto cubrieron los gastos necesarios para asistir a dicho evento.

Al Programa Estatal de Divulgación de la Actividad Científica y Tecnológica en Querétaro del CONCyTEQ, por cubrir parte de los viáticos para asistir al XVII Congreso Mexicano de Botánica 2007 y a la 56 Southwestern Association of Naturalists Meeting 2009.

A las becas otorgadas por los fondos mixtos, proyectos CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71 y CONACYT FOMIX QRO-2006-C1-53811.

Por último tengo que agradecer los reconocimientos que fueron otorgados a esta investigación. Muchas gracias a todos los revisores anónimos por considerar nuestro trabajo.

Premio Alejandrina 2008 a la Investigación en Ciencias Exactas y Ambientales. Con el trabajo: “Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro”.

Mejor exposición oral en el 2do. Foro de Investigación y Posgrado 2008. Facultad de Biología. Con el trabajo: “Sobrevivencia en campo de plántulas de *Mammillaria mathildae* inoculadas con micorrizas arbusculares.”

Finalista del Wilks Award que otorga la Southwestern Association of Naturalist, durante su 56<sup>ava</sup> reunión anual. 2009. Con el trabajo: “Re-introduction of *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) plantlets is improved by an arbuscular mycorrhizal fungi inoculum.”

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis esta basada sobre los siguientes artículos y un capítulo de libro, que son referidos en el texto por sus numerales romanos:

- I. García RO, Suzán-Azpiri H y Malda BG (2010) Predicted and confirmed distribution of the endangered endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) using niche prediction and spatial analysis. (Sometido)
- II. García RO y Malda BG (2010) Phenological changes of *Mammillaria mathildae* associated to climatic change in a deciduous tropical forest. Smithsonian Scholarly Publications. En: Dallmeier F, Fenech A, Maciver D y Szaro R (Edts.) Climate Change, Biodiversity, and Sustainability in the Americas. Smithsonian Institution's Scholarly Press
- III. García RO y Malda BG (2010). Micropropagation and reintroduction of *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to their natural habitat. HortScience (Aceptado)
- IV. García RO y Malda BG (2010) Rapide floraison de *Mammillaria mathildae* inoculé avec AM en culture aéroponique. (Sometido)
- V. García RO y Malda BG (2010) Field re-introduction of *Mammillaria mathildae* plantlets inoculated with native AMF consortium. (Sometido)

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	III
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	XI
ÍNDICE	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos	5
III. ANTECEDENTES.....	6
El Proceso de Restauración	6
Pérdida de la Biodiversidad: Consecuencia del Cambio en el Uso de Suelo.....	7
Otras Amenazas para la Biodiversidad	9
Mapas de Distribución.....	11
Obtención del Lote de Plantas	12
Población Mínima Viable. ¿Cuántos Individuos son Necesarios?.....	14
Facilitación del Crecimiento por MVA	16
Otros Factores a Considerar Durante la Re-introducción.....	18
IV. RESUMEN DE MATERIALES Y MÉTODOS	21
Área de Estudio.....	21
Diseño Experimental	22
Localización de Nuevas Poblaciones de <i>M. mathildae</i> .....	22

Fenología de <i>M. mathildae</i> .....	25
Selección y Caracterización del Área de Re-introducción	26
Micropropagación de <i>M. mathildae</i> por Cultivo de Tejidos.....	26
Germinación de <i>M. mathildae</i>	27
Conteo de Esporas, Estimación de la Colonización de las MVA y Cultivos Trampa.....	27
Cultivo Aeropónico e Inoculación de MVA	28
Determinación de la Concentración de Fósforo.....	29
Aclimatación y Re-introducción	29
Análisis Estadísticos.....	30
V. RESUMEN DE RESULTADOS	31
Predicción y Confirmación de la Ubicación de la Cactácea Endémica y en Peligro <i>Mammillaria mathildae</i> Usando Predicción de Nicho y Análisis Espacial ( <i>Artículo I</i> ).....	31
Cambios Fenológicos de <i>Mammillaria mathildae</i> Asociados al Cambio Climático en el Bosque Tropical Caducifolio ( <i>Artículo II</i> )	32
Micropropagación y Re-introducción de <i>Mammillaria mathildae</i> (Cactaceae) a su Hábitat Natural ( <i>Artículo III</i> ).....	34
Floración Precoz de <i>Mammillaria mathildae</i> Inoculada con MVA en un Cultivo Aeropónico ( <i>Artículo IV</i> )	35
Re-introducción de Plántulas de <i>Mammillaria mathildae</i> Inoculadas con un Consorcio Nativo de MVA ( <i>Artículo V</i> ).....	36
VI. DISCUSIÓN GENERAL	38



Caracterización del hábitat de <i>M. mathildae</i> y Ubicación de sus Poblaciones.....	38
Validación del Mapa Consenso	40
Alteraciones en la Fenología de <i>M. mathildae</i> Asociadas al Cambio Climático.....	41
Efecto de la Precipitación sobre el Reclutamiento de <i>M. mathildae</i>	43
Micropropagación de <i>M. mathildae</i> .....	44
Evaluación de las MVA en Campo y su Cultivo en Laboratorio	47
Estrategia de Inoculación.....	48
Efecto del Inóculo Micorrízico sobre el Crecimiento de <i>M. mathildae</i>	50
Promoción de la Floración por MVA.....	51
Selección de la Parcela Experimental	53
Contribución de las MVA a la Supervivencia en Campo de <i>M. mathildae</i> .....	55
Cultivo de Tejidos y Cultivo Aeropónico: ¿Son Biotecnologías Costeables?	58
Implicaciones para la Conservación del Hábitat.....	60
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. REFERENCIAS.....	65
IX. PUBLICACIONES	82
Artículo I.....	83
Artículo II	102
Artículo III.....	114
Artículo IV	131
Artículo V.....	150

X.	ABREVIATURAS.....	172
XI.	APÉNDICE	173

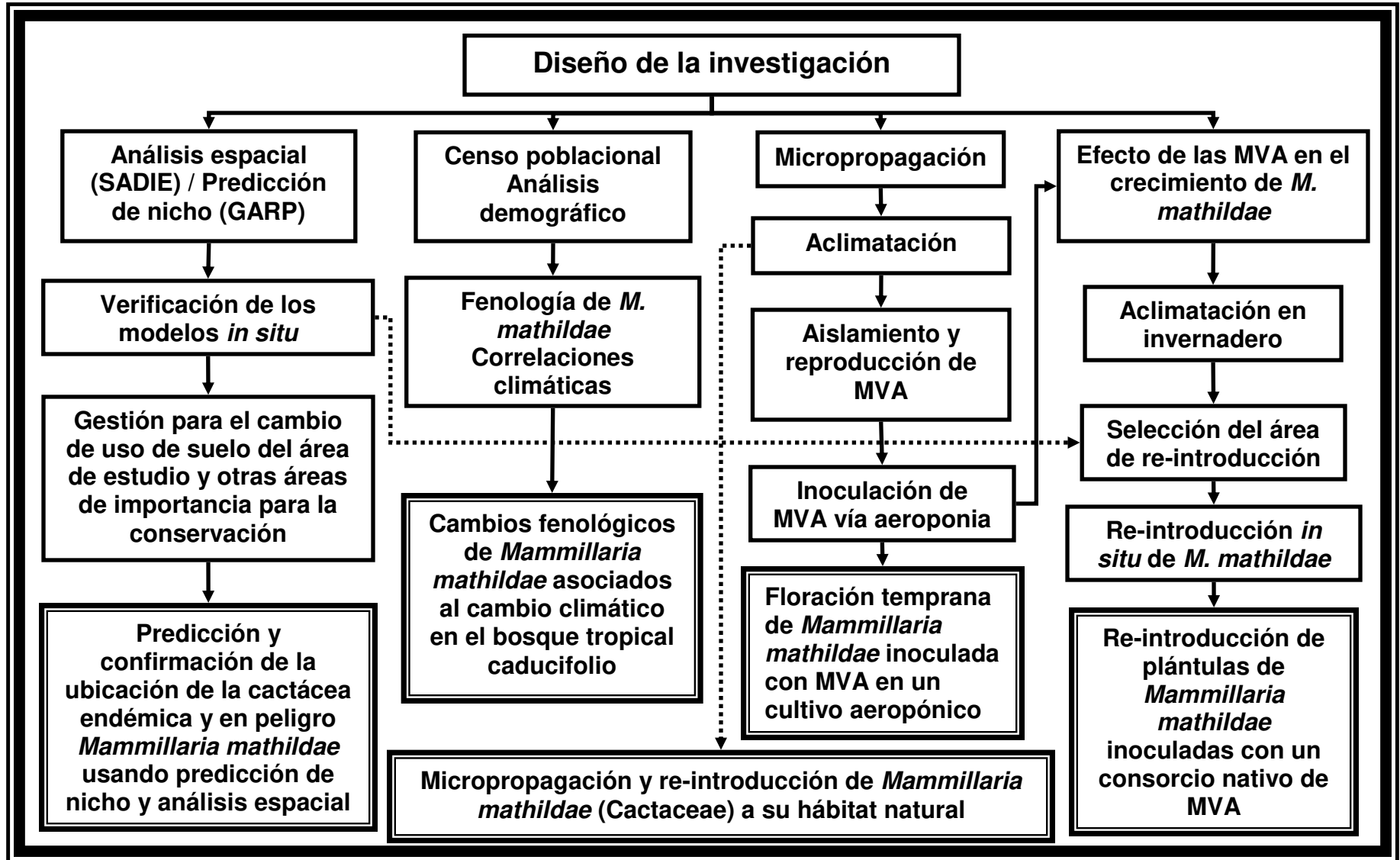


Figura 1. Diseño experimental.

datos tienen una resolución de grano de  $0.01^\circ$ . La descripción completa del proceso de modelado puede ser consultada en Stockwell y Noble (1992) y en Stockwell y Peters (1999).

El proceso de modelado genera una variedad de resultados debido al algoritmo empleado, cada análisis produce un único conjunto de datos de ocurrencia con diferente patrón, por tanto se construyó un mapa representativo de los 100 obtenidos. Siguiendo las recomendaciones de Anderson *et al.* (2003), se seleccionaron los mejores 10 modelos de entre aquellos que presentaron un 20% de error de omisión (áreas predichas como de ausencia, cuando de hecho se encuentran ahí). Subsecuentemente los mapas fueron acomodados por su error de comisión (predicción de la presencia de la especie cuando de hecho no está). El método da el menor error de omisión y comisión. Los 10 modelos fueron procesados como una gradilla de ASCII e importados a GIS ArcView 3.2 (ESRI, 2000). Usando la función de “map calculator” los mapas fueron sobrelapados para producir un mapa consenso que representa la distribución predicha de *M. mathildae*.

Las asociaciones de *M. mathildae* con la flora vecina se estimaron con el programa de análisis espacial SADIE Shell 1.22 (libre distribución en: [http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/pie/sadie/SADIE\\_home\\_page\\_1.htm](http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/pie/sadie/SADIE_home_page_1.htm)). SADIE permite calcular, entre otros parámetros, un índice de agregación ( $I_a$ , usualmente, los datos muestran un patrón de distribución agregado si  $I_a > 1$ , distribución regular con un  $I_a < 1$  y un arreglo fortuito si  $I_a \approx 1$ ); y un índice de asociación espacial ( $X$ , chi griega; las especies están disociadas cuando  $X < 0$ , o asociadas si  $X > 0$  ó presentan una disposición azarosa cuando  $X = 1$ ) de dos poblaciones que fueron contadas simultáneamente en la misma área (Perry 1995; Perry y Dixon, 2002). Además, SADIE provee de información visual explícita sobre la naturaleza del arreglo de las especies. Los datos fueron tomados de una parcela de 10 X 10 m dividida en sub-parcelas de 1 X 1 m, donde la posición de cada individuo de las diferentes especies fue registrada en un mapa de dos dimensiones. Se corrieron 75 simulaciones y 26,108

permutaciones. Los mapas fueron construidos usando Surfer 8.0 (Golden Software Inc., Colorado, USA).

Para validar el modelo de GARP, fueron realizadas varias búsquedas en las áreas de mayor probabilidad de ocurrencia para *M. mathildae*. En campo se procedió a buscar manchones de árboles asociados a la cactácea, seguidos de una búsqueda más fina en esas zonas.

### **Fenología de *M. mathildae***

En el *Artículo II* se describen los efectos del cambio climático sobre la estructura de la población de Cañada Juriquilla y la fenología de la misma. Fue necesario levantar un censo completo de la población y determinar los cambios fenológicos de la misma durante los años 2005 y 2006 para compararlos con los valores reportados por Hernández-Oria *et al.* (2003). El censo de la población de Cañada Juriquilla fue hecho por observación directa de finales de diciembre de 2005 a principios de enero de 2006. Cada individuo fue medido (diámetro y altura) y sistemáticamente etiquetado. Para la fenología, se hizo una toma periódica de datos de principios de febrero a finales de octubre de 2005 y 2006 para determinar el inicio y final del periodo de floración y fructificación de *M. mathildae*. El tamaño de las plantas mostró una correlación positiva con la amplitud de la floración; por ello, sólo se consideraron 20 individuos (genetos) con tamaños de entre 1.8 y 5 cm de diámetro. El número de flores y de frutos por individuo fue contado. El esfuerzo reproductivo (RE) fue calculado para cada año, como el radio de la producción de flores/frutos. La colecta de las semillas se hizo durante agosto de 2005 y 2006, siguiendo las recomendaciones de Ross (2004). En el laboratorio las semillas fueron extraídas, contadas y almacenadas.

Los valores de precipitación y temperatura del área de estudio fueron obtenidos de la Comisión Nacional de Aguas (CONAGUA) en la estación meteorológica de Querétaro (20° 35' N; 100° 24' W).

## **Selección y Caracterización del Área de Re-introducción**

Los experimentos de campo descritos en los *Artículos III y V* fueron realizados en la Cañada de Juriquilla. La selección del área de re-introducción se hizo en base a los resultados del análisis espacial y predicción de nicho (*Artículo I*); y del reconocimiento del microhábitat de *M. mathildae*. Este último fue realizado en dos poblaciones: la población tipo (16 Km al noroeste de Cañada Juriquilla) ubicada en la zona conocida como Cañada de Hércules y en la Cañada de Juriquilla (población de *M. mathildae* y parcela experimental). En la primera se encontró una gran perturbación por el crecimiento de la mancha urbana, de hecho su población ha sido diezmada en gran parte por la explotación de una mina de cantera sobre la que se desarrolla. Los propietarios de los terrenos no quieren cederlos para la conservación de la especie (Glass, 1998) así que la población está por desaparecer. En contraste, la población de la Cañada de Juriquilla (Hernández y Sánchez, 2002) presenta un estado de conservación aceptable, que provee de las condiciones microambientales óptimas para el desarrollo de *M. mathildae* (*Artículo III*).

## **Micropropagación de *M. mathildae* por Cultivo de Tejidos**

El desarrollo de un protocolo de micropropagación fue indispensable para poder disponer de un número suficiente de plantas para hacer los experimentos reportados en los *Artículos III, IV y V*. De particular importancia fue la selección de las líneas de micropropagación. Para mantener la mayor parte de la variación genética de la población de la Cañada de Juriquilla, se colectaron semillas de 62 individuos de *M. mathildae* que representa el 57.4% de la población (Permiso SEMARNAT NRA: GARSX2201411). Con una mezcla de semillas se iniciaron los cultivos *in vitro*. Las semillas fueron germinadas en condiciones asépticas dentro de frascos conteniendo 30 mL de medio MS una concentración de 0.5. Cuando las plántulas alcanzaron 1 cm de altura fueron usadas como fuente de explantes. La activación de aréolas y enraizamiento se logró empleando un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) libre de hormonas. Los cultivos fueron

mantenidos a  $26 \pm 1$  °C bajo un flujo fotosintético total de  $120-130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  emitido por lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 16 h luz.

### **Germinación de *M. mathildae***

Se determinó el porcentaje de germinación de semillas de *M. mathildae in situ*, así como su viabilidad después de ser expuestas a escarificación química (EQ) y mecánica (EM) en suelo micorrizado (SM) y suelo estéril (SE), con la finalidad de usarlas como base de comparación en otros experimentos. *In situ*, se sembraron semillas de *M. mathildae*, usando charolas plásticas (para proteger a las plántulas de la herbivoría por insectos) rellenas del suelo proveniente del área de estudio. Para provocar la EQ, las semillas fueron sumergidas en HCl 1 N durante 1 h. Para simular un evento de arrastre por lluvia se hizo una EM, donde las semillas se agitaron por 15 minutos en una mezcla de rocas de 0.5 y 1.0 mm de  $\varnothing$  (50:50). Semillas tratadas y sin tratar, fueron sembradas sobre orificios de rocas (colectadas en la Cañada de Juriquilla) empleando SM con 31.5 esporas/g suelo, o SE; a 25°C, con un fotoperiodo de 8 X 16. Las rocas y el SM fueron esterilizados con calor seco, siguiendo el procedimiento descrito por Neal (2000).

### **Conteo de Esporas, Estimación de la Colonización de las MVA y Cultivos Trampa**

Para estudiar la contribución de las MVA en el desarrollo de *M. mathildae* fue necesario determinar si esta cactácea era colonizada *in situ* por hongos micorrízicos. En el *Artículo V* se describe como se determinó su presencia y grado de colonización, además del procedimiento de cultivo *ex situ* de estos simbioses obligados. Las esporas aisladas saludables se almacenaron en tubos eppendorf con agua, se guardaron a 4 °C por 48 h. Cualquier espora atípica o muerta en este tiempo se descartó. Para su conteo, las esporas se transfirieron a una caja de Petri y se examinaron con un microscopio a 40X.

Las esporas *in situ* presentaron una densidad baja, por lo que fue necesaria su reproducción en cultivos trampa. Existe una variedad de plantas

usadas como hospederas (*e.g.* cebolla, varios tipos de pastos, sorgo, etc.); para este estudio se eligió al sorgo, por ser colonizado por un amplio espectro de MVA. Fueron necesarios tres ciclos de crecimiento para alcanzar una densidad de esporas óptimas para el aislamiento e inoculación en *M. mathildae*. Para iniciar los cultivos trampa, se colectaron suelos de las rizósferas de *M. mathildae*, algunas plantas asociadas a ella (*J. dioica*, *O. pubescens*, *Melinis repens* y *L. microphylla*) y suelo sin vegetación.

La tinción de raíces se hizo siguiendo el método desarrollado por Vierheilig *et al.* (1998). Este método es más rápido de llevar a cabo que el método tradicional de azul de tripano, además de ser más seguro al sustituir este compuesto por tinta china. Brevemente, las raíces limpias y cortadas en secciones de 1 cm de las diferentes muestras, se aclararon sumergiéndolas 5 min en una solución de KOH al 10% en “baño María”; después se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con tinta china negra (Shaeffer) disuelta en una solución de ácido acético al 5% (vol/vol). 30 porciones de raíces se examinaron con un microscopio a 40X para detectar la colonización de las MVA siguiendo el método de intersección en gradilla descrito por Giovannetti y Mosse (1980). La frecuencia de infección por micorrizas (F%) se calculó mediante la ecuación  $(IR \times 100)/TR$ , donde IR corresponde a las raíces infectadas y TR se refiere al total de segmentos de la muestra.

### **Cultivo Aeropónico e Inoculación de MVA**

El consorcio de MVA fue inoculado en plántulas de *M. mathildae* micropropagadas. Para ello, en primer instancia, se probó la compatibilidad de la cactácea para crecer en un sistema de cultivo aeropónico y la capacidad del inoculo para colonizar las raíces del cactus (*Artículo IV*); posteriormente se determinaron los efectos sobre el crecimiento de *M. mathildae* y se evaluó la capacidad del inoculo para incrementar la sobrevivencia de las plántulas *in situ* (*Artículos IV y V*). Las condiciones de cultivo aeropónico fueron establecidas al ensayar dos intervalos de aspersion. La duración de la aspersion fue de 5 seg y se probaron intervalos de 10 y 30 min en un diseño 1X2 factorial. Las



condiciones de cultivo fueron las mismas que las empleadas en el cultivo *in vitro*. Como solución nutritiva de empleo la formulación del MS sin agar y fue reemplazada cada semana. El sistema de cultivo aeropónico fue manufacturado por AgriHouse, Inc. Div. Aeroponics International.

Plántulas de *M. mathildae* de siete meses ( $1.79 \pm 0.04$  cm de alto y  $1.37 \pm 0.02$  cm de diámetro en promedio) se inocularon al escurrir sobre sus raíces 200  $\mu\text{L}$  de una solución de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de alginato de sodio conteniendo 1,025 esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las raíces se sumergieron inmediatamente en una solución 0.05 M de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para solidificar el alginato (Weber *et al.*, 2005). Las raíces se aspersaron durante 5 seg cada 30 min las 24 horas del día. La solución nutritiva se cambió cada semana. El cultivo se mantuvo a  $26 \pm 1$  °C y fue iluminado bajo las mismas condiciones de los cultivos *in vitro*.

### **Determinación de la Concentración de Fósforo**

Además del notorio incremento de tamaño de las plántulas micorrizadas la acumulación de P es un factor importante de determinar, ya que es necesario para disparar fenómenos como la floración y fructificación. Por ello, en los *Artículos IV y V*, se determinó el contenido de P por medio de una digestión micro Kjeldahl (Allen, 1989) del material seco de plantas micorrizadas y no micorrizadas obtenidas del cultivo aeropónico.

### **Aclimatación y Re-introducción**

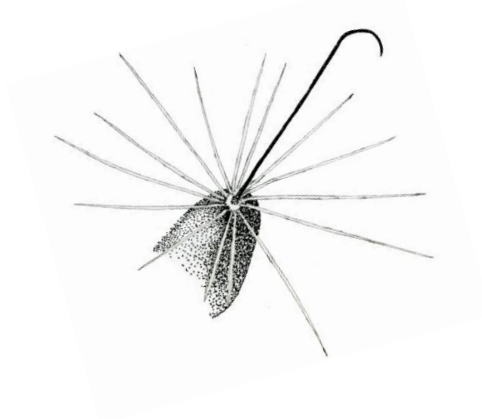
Los experimentos de re-introducción de plántulas no micorrizadas y micorrizadas son reportados en los *Artículos III y V* respectivamente. Debido a la baja tasa de sobrevivencia en campo de las plantas de *M. mathildae* micropropagadas, se probó el aporte de las micorrizas en el establecimiento de un segundo lote. Todas las plantas fueron trasplantadas a maceteros de 2.5 cm  $\varnothing$  empleando una mezcla comercial de suelo para siembra (1:1 Pro-Moss, Premier<sup>®</sup> y Hortiperl, Termalita<sup>®</sup>). Se cubrieron por una semana con plástico para evitar la desecación excesiva y para la segunda semana se colocaron en un sombreadero que filtra el 50% de luz solar ( $451.7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en promedio). La

intensidad luminosa fue determinada con un sensor de cuantos (LI-COR modelo LI-190). La temperatura y humedad relativa (HR) fue registrada con un sensor HOBO H8 (Onset Computer Corporation 2000) Las plantas se regaron cada tercer día hasta su transferencia al campo.

Cada lote experimental contenía 100 plantas, que fueron transferidas a una parcela experimental de 75 X 10 m ubicada en la Cañada Juriquilla. Las plantas se midieron (diámetro y altura) y se marcaron sistemáticamente. Para evaluar el efecto de la micorrización sobre la sobrevivencia (*Artículo V*), 100 plantas colonizadas con MVA y 100 plantas sin MVA (control) se plantaron en la misma parcela experimental. Las plantas se midieron (diámetro y altura) y se marcaron sistemáticamente. Los porcentajes de sobrevivencia de ambos experimentos se determinaron cada 3 días la primera semana; después, se determinó cada semana durante un mes. Eventualmente el registro se hizo cada mes.

### **Análisis Estadísticos**

Los datos de los *Artículos II, III, IV y V* fueron contrastados mediante un ANDEVA  $P < 0.05$ . El análisis estadístico se hizo con el programa JMP 6.0 (SAS Institute, Inc. 2005). Los datos del porcentaje de colonización de raíces por MVA fueron previamente transformados a sus valores del arco seno. Las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey-Kramer  $P < 0.05$ .



## V. RESUMEN DE RESULTADOS

### **Predicción y Confirmación de la Ubicación de la Cactácea Endémica y en Peligro *Mammillaria mathildae* Usando Predicción de Nicho y Análisis Espacial (Artículo I)**

El SADIE determinó la distribución espacial de *M. mathildae* y de otros componentes de la flora local, además estableció las asociaciones y disociaciones con árboles, matorrales y otras cactáceas en el área. *M. mathildae* presentó una distribución agregada, al igual que el resto de las plantas, con excepción de *M. geometrizzans* que mostró un arreglo regular. Por otro lado, los valores de  $V_i$  de *L. microphylla* y *Prosopis laevigata*, indican su tendencia a crecer en grupos. Los mapas de los índices de agrupación muestran claramente los parches que conforman *M. mathildae*, *L. microphylla* y *P. laevigata* dentro del área de estudio.

El SADIE de *M. mathildae* y la vegetación circundante se llevó a cabo en tres parcelas dentro del área de estudio. La cactácea se asoció de forma significativa con *L. microphylla*, *B. fagaroides* y *J. dioica*; mientras que su asociación con *C. aesculifolia*, *M. geometrizzans* y *O. pubescens* fue positiva pero no de forma significativa. Los árboles asociados a *M. mathildae* registraron un IAF entre 2.68 y 3.36 unidades. En contraste, el SADIE mostró que *P. laevigata*, *S. polyantha* y *I. murucoides* se encuentran disociados de la cactácea; estas especies presentaron valores de IAF fuera del rango de las especies con asociación positiva (IAF = 4.84, 1.42 y 1.39 respectivamente). El arbusto *A. quadrifidus* también está fuertemente disociado de *M. mathildae*. Los mapas del índice de asociación muestran las áreas donde *M. mathildae* se asoció a *L. microphylla* y donde se disoció de *P. laevigata*.

El modelaje del nicho potencial de *M. mathildae* abarcó un área aproximada de 207,036 ha. El mapa consenso muestra que las áreas con mayor probabilidad de albergar a la cactácea se distribuyen alrededor de la mancha urbana de Querétaro, en los relictos de BTC. El modelo predijo una alta probabilidad de encontrar a *M. mathildae* hacia la parte oriente de la ciudad,

formando una media luna que abarca desde la Cañada de Juriquilla, en el norte, hasta la Cañada de la Plata, en el sur.

La ubicación teórica de las poblaciones fue indicada por el modelo construido con GARP, que fue validado con éxito al confirmar la existencia de seis poblaciones no reportadas; dos en Peña Colorada, dos en el Cerro del Cimatario, una en la Cañada de la Plata y una en el Cerro del Tangano. Todas las poblaciones se encontraron en BTC. Sólo 2 poblaciones nuevas, que se encuentran en el Parque Nacional Cerro del Cimatario, y la antes descrita en la Cañada de Juriquilla se encuentran en áreas naturales protegidas. El resto están distribuidas en los relictos de BTC, que aparecen muy fragmentados a lo largo de la zona oriente de la ciudad de Querétaro.

### **Cambios Fenológicos de *Mammillaria mathildae* Asociados al Cambio Climático en el Bosque Tropical Caducifolio (Artículo II)**

La fenología de las poblaciones conocidas de *M. mathildae* se encuentra bien sincronizada; las 8 poblaciones conocidas (Artículo I) coincidieron en su periodo de floración. Los datos de las dos poblaciones estudiadas presentaron el mismo periodo de floración y fructificación. Durante 2001 la población de la Cañada de Juriquilla floreció hacia finales de mayo y hasta junio; y en ese mismo año, fructificó de junio a agosto (Hernández-Oria *et al.*, 2003). Cabrera y Gómez (2003) reportaron un comportamiento fenológico similar para la población localizada en la Cañada de Hércules. En contraste, en la Cañada de Juriquilla, durante 2005 y 2006 se registraron a principios de abril las primeras flores y fue hasta finales de junio que terminó el periodo de floración, alcanzando su máxima producción a mediados de mayo. Mientras que la estación de fructificación comenzó en los primeros días de mayo y se prolongó hasta finales de julio.

El patrón de temperatura observado durante 2003, 2005 y 2006 no fue significativamente diferente ( $F = 0.1903$  Prob.  $>F < 0.9024$ ). En cambio las precipitaciones registradas en esos mismos años mostraron una secuencia diferente. En 2003 la primera precipitación importante ocurrió la última semana

de mayo. Por el contrario en 2005 y 2006 se presentaron precipitaciones desde marzo. En estos años las precipitaciones se sucedieron de manera uniforme a lo largo de la estación de lluvias; en cambio, durante 2003 la frecuencia con que se presentaron las precipitaciones fue muy espaciada; y además fueron inusualmente intensas. El impacto de las lluvias extremas de 2003 sobre la producción de frutos de *M. mathildae*, mostró diferencias significativas respecto de la producción en otros años. En 2003 la producción de frutos fue significativamente menor a la de 2005 y 2006. Asimismo, se registró una reducción en el número de individuos, de las 209 plantas registradas en 2003, sólo sobrevivieron 111 plantas en 2005.

Se germinaron semillas de *M. mathildae* bajo diferentes condiciones para tasar la pérdida de viabilidad. Se emuló un evento de arrastre de las semillas durante una lluvia fuerte por 15 min; el tratamiento disminuyó la viabilidad de las semillas de 70% (control) a 32%. Se hizo una escarificación química con HCl 1N por 1 h, la viabilidad cayó al 16%. Para tasar la contribución de las MVA en la germinación de *M. mathildae*, se germinaron semillas en suelo micorrizado (SM) y suelo estéril (SE). En SM las semillas alcanzaron un 76% de germinación, con su máximo en el día 17; por el contrario, en el SE sólo germinó el 37% del lote y fue hasta el día 43 cuando se registró la última emergencia de un tallo, estas plántulas murieron alrededor de los 100 días. Plántulas de 25 días, sembradas en SM presentaron un diámetro promedio de  $2.89 \pm 0.02$  mm que es significativamente superior al  $1.96 \pm 0.03$  mm de diámetro promedio mostrado por plántulas de igual edad sembradas en SE ( $F = 500.199$  Prob.  $>F < 0.0001$ ).

En 2005 y 2006 la distribución homogénea de las precipitaciones promovió un incremento de la población, 133 individuos fueron contabilizados en 2006 (incluidas 31 plántulas). Las precipitaciones de marzo de 2005 estimularon una temprana producción floral ( $14.5 \pm 4.34$  flores). En 2006 las lluvias de finales de marzo dispararon la emergencia de flores que alcanzó un promedio de  $16.0 \pm 5.22$  flores, similar al periodo de 2005 ( $F = 2.1992$  Prob.  $>F < 0.1463$ ). No obstante, el periodo de fructificación fue diferente, a diferencia de 2005, en 2006 las precipitaciones fueron constantes a partir de finales de abril, lo que promovió

una producción de  $9.0 \pm 4.58$  frutos, que fue significativamente diferente de los  $6.5 \pm 2.87$  frutos producidos durante 2005 ( $F = 7.4602$  Prob.  $>F < 0.0095$ ).

### **Micropropagación y Re-introducción de *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) a su Hábitat Natural (Artículo III)**

En su hábitat natural, la germinación de *M. mathildae* fue del 40%; sin embargo, de este porcentaje sólo sobrevivió el 0.6% de las plántulas. En contraste, las semillas germinadas *in vitro* en medio MS 0.5, alcanzaron un 91% de germinación. La emergencia del tallo se registró entre los 15 y 25 días. Se determinó la respuesta morfogénica de tres tipos de explantes (basal, lateral y apical) extraídos de plántulas de tres meses de edad. Todos los explantes expuestos a alguna combinación hormonal (particularmente al AIA), desarrollaron callo profusamente. Éste fue compacto, de color verdoso, con porciones ligeramente rosas en la superficie. Las bajas concentraciones de AB promovieron la formación de pocos tallos, pero con la concomitante formación de callo. En contraste, sin la adición de hormonas los tres tipos de explantes formaron tallos, aunque en diferente proporción ( $F = 237.7489$  Prob.  $>F < 0.0001$ ). Los explantes basales mostraron la producción más baja  $0.59 \pm 0.11$ , además de que una proporción importante desarrolló callo ( $\approx 41\%$ ). Los explantes apicales y laterales produjeron  $1.14 \pm 0.07$  y  $4.09 \pm 0.13$  tallos respectivamente.

Para inducir la formación de raíces se probaron tres medios, medio MS 0.5 y medio MS con o sin AIB. Los tallos cultivados en medio MS mostraron una diferencia significativa en la frecuencia de formación de raíces respecto del medio MS 0.5 y el medio adicionado con AIB ( $F = 12.1849$  Prob.  $>F < 0.0009$ ) a pesar de que no hubo una diferencia significativa en la longitud de las raíces desarrolladas ( $F = 0.6817$  Prob.  $>F < 0.5106$ ). Las plántulas desarrollaron un vigoroso sistema radical entre siete y ocho semanas. La aclimatación de las plántulas a las condiciones *ex vitro* no presentó ningún problema, el 98% sobrevivió tras ocho semanas en el sombreadero.

En la parcela experimental se registró una intensa actividad de herbivoría causada por isópodos terrestres, 34.2% de la población silvestre sufrió algún ataque. Por ello, el trasplante se llevó a cabo a principios de octubre, casi al final de la temporada de lluvias cuando la presencia de isópodos disminuyó notablemente. El lote de plantas generadas por micropropagación tuvo una altura de  $1.79\pm 0.04$  cm y un diámetro de  $1.37\pm 0.02$  cm. Durante las primeras cuatro semanas el 43% de las plántulas sembradas murieron, en los siguientes tres meses otro 9% de estas cactáceas murieron. Tras cinco meses murió el 52% del lote sembrado en la parcela experimental.

### **Floración Temprana de *Mammillaria mathildae* Inoculada con MVA en un Cultivo Aeropónico (Artículo IV)**

Plántulas de *M. mathildae* micropropagadas, con un tamaño promedio de  $1.79\pm 0.04$  cm de alto y  $1.37\pm 0.02$  cm de diámetro, fueron transferidas a la cámara de cultivo aeropónico. Dos intervalos de aspersión fueron probados (10 y 30 min). El intervalo más corto generó un rango de HR de 80-85%. El 18% de las plántulas sufrió putrefacción de las radículas con la consecuente muerte de la plántula. Mientras que el intervalo de 30 min generó una HR de 45-50%; bajo esta condición se alcanzó un 97.6% de sobrevivencia.

Las dimensiones iniciales de los lotes de plántulas empleadas no mostraron diferencias significativas en altura y diámetro ( $F= 0.1879$  Prob.  $>F< 0.6651$  y  $F= 0.432$  Prob.  $>F< 0.5116$  respectivamente). Seguido de la inoculación de MVA, su colonización fue bastante rápida, en 30 días, arriba del 60% de las plántulas presentaron formación de arbusculos; en este periodo la diferencia de tamaño fue evidente. Alrededor de los 60 días el lote experimental alcanzó el 100% de colonización. Después de 74 días se registró una marcada diferencia entre el lote control y el experimental (2.0 y 1.4 cm Vs. 2.9 y 2.4 cm). La sobrevivencia en invernadero de las plántulas fue superior al 98%.

Después de 3.5 a 4 meses en el invernadero, las plántulas de *M. mathildae* colonizadas con MVA desarrollaron brotes florales. Un mes después, alrededor del 66% del lote floreció. En promedio formaron 5 flores durante la

estación de floración (de abril a finales de junio). Mientras que el lote control no floreció (plántulas no micorrizadas). En la siguiente estación de floración registrada entre finales de febrero y principio de mayo, ambos lotes florecieron. 21% de las plántulas control produjeron 1.6 flores en promedio; mientras que los cactus micorrizados incrementaron su porcentaje de floración a 94%, con un promedio de 9.7 flores por planta.

### **Re-introducción de Plántulas de *Mammillaria mathildae* Inoculadas con un Consorcio Nativo de MVA (Artículo V)**

Se determinó la presencia de MVA en raíces de *M. mathildae* y de las plantas asociadas. Asimismo, se analizó la presencia de esporas de MVA en los suelos circundantes de las plantas, con el fin de iniciar los cultivos trampa para MVA. Todas las plantas analizadas presentaron un grado de colonización similar, sólo *Melinis repens* mostró un grado de colonización superior. El número de esporas presentes en la rizósfera de las plantas analizadas fue muy similar en su composición. El consorcio de MVA estuvo compuesto por varias morfoespecies de *Glomus*, *Gigaspora* y otros hongos similares a las Glomales. El suelo sin vegetación no presentó un número significativo de esporas ( $1.4 \text{ esporas g suelo}^{-1}$ ). Fueron necesarios tres ciclos de esporulación para que los cultivos trampa generaran un número considerable de esporas  $\text{g suelo}^{-1}$ . El cultivo trampa de *M. repens* fue el único que produjo una cantidad superior de esporas ( $92.33 \pm 2.37 \text{ esporas g suelo}^{-1}$ ), mientras que el cultivo trampa de *M. mathildae* alcanzó valores de  $76.37 \pm 1.88 \text{ esporas g suelo}^{-1}$  similar al resto de los cultivos.

Plantas con un tamaño promedio de  $1.78 \pm 0.04 \text{ cm}$  de altura y  $1.36 \pm 0.02 \text{ cm}$  de diámetro, fueron inoculadas con MVA y colocadas en la cámara aeropónica. El lote fue completamente colonizado a los 60 días. Dos semanas después, las plantas micorrizadas exhibieron un mayor tamaño en altura ( $F= 116.5583 \text{ Prob. } >F < 0.0001$ ), diámetro ( $F= 142.8399 \text{ Prob. } >F < 0.0001$ ), así como en peso seco ( $F= 60.2369 \text{ Prob. } >F < 0.0001$ ), comparado con el lote

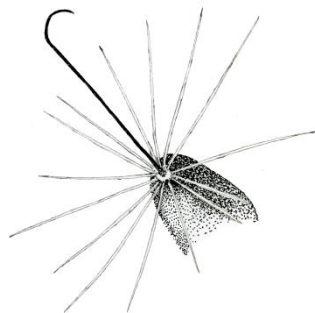


control. La acumulación de P también fue marcadamente superior en las plantas micorrizadas ( $F= 237.3721$  Prob.  $>F< 0.0001$ ).

Para la elegir la parcela experimental se determinaron las condiciones microclimáticas de los sitios seleccionados, y fueron comparadas con las registradas para la población de *M. mathildae* de la Cañada de Juriquilla. La radiación solar y la temperatura superficial fueron registradas en octubre de 2007. No se detectaron diferencias notables en radiación solar ( $F= 0.0234$  Prob.  $>F< 0.8815$ ) y temperatura superficial ( $F= 0.0075$  Prob.  $>F< 0.9327$ ). La composición de especies de la vegetación de la parcela experimental fue similar a la reportada para la población de *M. mathildae*.

La reintroducción de las plantas fue realizada a finales de octubre de 2007 poco antes del final del periodo de lluvias. Las plantas re-introducidas presentaron una altura de  $1.99\pm 0.07$  cm y un diámetro de  $1.54\pm 0.03$  cm. Después de tres meses el 49% de las plantas no micorrizadas murieron. La caída más pronunciada (39%) sucedió tras la primera semana sin lluvias en la parcela experimental. Por su parte, sólo el 9% de las plantas micorrizadas decayó después de una semana en campo. Tras esta caída inicial el lote de cactus plantado en campo se mantuvo estable por más de 160 días, y registró una sobrevivencia del 89%.

Cuando las plantas de *M. mathildae* comenzaron florecer en el invernadero (*Artículo IV*), se verificó el porcentaje de plantas que florecieron en la parcela experimental. 14% de las plantas sembradas en campo formaron flores después de las primeras lluvias a finales de abril de 2008, seis meses después de su traslado a campo.



## VI. DISCUSIÓN GENERAL

### **Caracterización del hábitat de *M. mathildae* y Ubicación de sus Poblaciones**

La conservación biológica requiere, necesariamente, de conocer ampliamente la distribución y el estado que guardan las poblaciones. En especies raras o poco estudiadas esta información puede ser difícil de obtener. Por ello, en este trabajo se usó un enfoque que nos permitió ubicar las probables áreas de distribución de la *M. mathildae*, empleando la predicción de nicho.

El mapa consenso construido con GARP ubica el nicho potencial de *M. mathildae* en áreas donde hay o hubo hace pocos años BTC. Debido a que el área de estudio es pequeña, las condiciones climáticas no varían significativamente en la zona. Así que las variables que más peso tuvieron para la construcción del modelo fueron las topográficas. Sin embargo, para la interpretación del modelo se tuvo el cuidado de eliminar el factor “urbanización”; debido a que áreas con una fuerte probabilidad de sostener poblaciones de *M. mathildae* han sido urbanizadas recientemente. Este cambio de uso de suelo ha sido muy intenso en la zona oriente de la ciudad, principalmente en las mesetas y cañadas; de hecho la pérdida de áreas silvestres en esta área alcanzó en 2006 una tasa de 190 ha/año (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008). Como consecuencia, una buena parte del hábitat donde probablemente se encontraba *M. mathildae* ha sido eliminado. No obstante, las áreas naturales de la ciudad de Querétaro abarcan alrededor de 29,205 ha, y aunque están muy fragmentadas aún mantienen las condiciones de hábitat propicias para el desarrollo de la cactácea.

El rápido cambio del paisaje, obliga a la oportuna actuación para la conservación de especies raras o amenazadas. Para ello, es indispensable conocer y entender las asociaciones que establecen la flora y fauna local. El SADIE ha demostrado ser una herramienta tecnológica muy robusta para establecer tales relaciones bióticas (Perry *et al.*, 1999; Perry y Dixon, 2002;

Zuñiga *et al.*, 2005); e inclusive, las bióticas - abióticas (Maestre y Cortina, 2002; Maestre, 2006) de un ecosistema.

*M. mathildae* es un pequeño cactus, de 7 cm de diámetro, que no es capaz de establecerse en áreas con iluminación solar directa, como muchos otros cactus (Leirana-Alcocer y Parra-Tabla, 1999); la presencia de una cubierta vegetal y suelos bien drenados son factores indispensables para su germinación y establecimiento (García y Malda 2008). Se conoce que en las áreas desérticas y semidesérticas, la formación de parches de vegetación es común, muchas especies arbóreas y arbustivas juegan un papel preponderante en la germinación y establecimiento de varias especies vegetales en un fenómeno conocido como nodricismo (Carrillo-García *et al.*, 2000; Suzán-Azpiri y Sosa 2006). El sistema de nodriza promueve un acomodo espacial agregado de las especies formando manchones de vegetación y áreas desprovistas de ella (Zuñiga *et al.* 2005). En contraste, el BTC no presenta claros de vegetación, por el contrario su cubierta vegetal es homogénea; sin embargo, bajo el dosel el patrón de sombreado puede variar drásticamente. En el área de estudio, con excepción de *M. geometrizans*, todas las especies estudiadas presentaron una distribución agregada. Las arquitecturas de los parches monoespecie generan patrones de sombreado de intensidad variable dentro del BTC; por ejemplo, *P. laevigata* produce el sombreado más intenso mientras que *I. murucoides* genera un sombreado menos profuso (determinado como IAF= 4.84 y 1.39 respectivamente). Ambos patrones de sombreado no favorecieron el establecimiento de *M. mathildae*; como lo muestran los índices de asociación de la cactácea con ambos árboles (*Artículo 1*). El mapa de agregación de *P. laevigata* muestra una clara tendencia de esta especie a formar parches, bajo de los cuales no se encontró ninguna *M. mathildae*, como lo ilustra el mapa de asociación generado por SADIE entre ambas especies (*Artículo 1*).

La arquitectura del dosel deja pasar poca luz, es posible que esta condición impida el proceso de germinación de *M. mathildae*. A este respecto Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000) mencionan que varias semillas de cactáceas son fotoblásticas positivas y que requieren de cierta calidad de luz

para su germinación. Por el contrario, *L. microphylla* y *B. fagaroides* generaron un microclima favorable para la germinación y establecimiento de *M. mathildae*, como lo reflejan los índices de asociación positiva registrados entre estas especies. Cabe mencionar que la germinación de semillas de *M. mathildae* se da a mediados de la estación de lluvias, cuando el dosel arbóreo está cubierto en su totalidad. El fenómeno es similar al reportado por Zúñiga *et al.* (2005), quienes mostraron que una sombra intensa no favorece el establecimiento de *Lophophora diffusa* (cactácea de tamaño similar a *M. mathildae*) mientras que sombras menos intensas permiten su germinación y establecimiento. Ambos árboles poseen una arquitectura del dosel que amortigua alrededor de 14°C la temperatura, sin disminuir sensiblemente la radiación fotosintéticamente activa, condiciones que en conjunto favorecen la germinación de las semillas de *M. mathildae*.

### **Validación del Mapa Consenso**

Los modelos de predicción de nicho requieren, además de su validación estadística, ser validados en campo. Los recursos para ubicar una especie en particular, con frecuencia son limitados, más si el área a cubrir es extensa. Por ello, el empleo de estrategias novedosas que ahorran tiempo y gastos de recursos, son cada vez más recurridas. Con la finalidad de validar *in situ* el mapa consenso, se realizaron una serie de reconocimientos en las áreas de mayor probabilidad de encontrar *M. mathildae*. Cabe mencionar que varias características hacen que su ubicación en campo sea particularmente difícil. El BTC se establece comúnmente en pendientes pronunciadas, y está conformado por una vegetación abundante y espesa. Aunado a esto, las dimensiones de *M. mathildae* son pequeñas, lo que la hacen una planta difícil de ubicar en campo.

Como se mencionó, SADIE mostró que en el ensamblaje del BTC se encuentran dos árboles fuertemente asociados a la cactácea (*L. microphylla* y *B. fagaroides*) que además tienden a agregarse formando parches bien diferenciados dentro de la vegetación. Durante el reconocimiento en campo se aprovechó esta característica, y se procedió a ubicar los parches más

abundantes de ambos árboles que crecían en afloramientos rocosos visibles, omitiendo los sitios que tuvieran cantidades importantes de las especies disociadas de *M. mathildae*. Siguiendo este procedimiento, la ubicación de las poblaciones de la cactácea fue más eficiente. Por ejemplo, cuando se buscó a *M. mathildae* en la Cañada de Juriquilla, fueron necesarias 86 h/hombre para encontrar las plantas, aun conociendo las coordenadas geográficas y las preferencias de hábitat reportadas para la especie. Por el contrario, cuando se siguió el procedimiento antes descrito en las áreas de Peña Colorada, el Cimatario y el Tángano se emplearon 8, 10, 2 h/hombre respectivamente.

### **Alteraciones en la Fenología de *M. mathildae* Asociadas al Cambio Climático**

La exorbitante generación de gases invernadero ha tenido como consecuencia un cambio, ya perceptible, en los patrones climáticos. Tan sólo el promedio de temperatura global se elevó 0.6° C de 1900 a 1990, fue el siglo más caliente, he incluyó la década más cálida en los últimos 1000 años. También se han registrado cambios en la cantidad y distribución de las precipitaciones. Las nevadas son menos intensas y los inviernos son más cálidos; los eventos extremos, como sequías e inundaciones son más comunes (Lawlor, 2005). El cambio climático afecta globalmente a los ecosistemas, desplazando a las especies de latitudes mayores por especies de latitudes menores, o alterando la fenología vegetal; con ello se ha convertido en una de las mayores amenazas para la biodiversidad. Para desarrollar planes de contingencia en escenarios de climas alternos es necesario, no sólo predecir los posibles cambios sino la magnitud de los mismos. Actualmente, las consecuencias a escalas regional y local han sido difíciles de predecir, debido al efecto conjunto de los factores de estrés. El desarrollo de las estrategias para lidiar contra esos factores requiere de la integración de la información a múltiples escalas. En este contexto, el monitoreo de poblaciones sensibles puede ser usado para identificar condiciones que ayuden a desarrollar modelos de predicción más precisos (a menor escala). Durante el proceso de re-introducción de *M. mathildae*, se

estudiaron los factores que podrían inducir cambios en la estructura poblacional de la especie. Uno de los que incidió mayormente fue el cambio en el patrón de precipitación, que desfasó la época de floración y ocasionó una disminución en el índice de reclutamiento.

Durante 2005 y 2006 la floración de *M. mathildae* se presentó un mes y medio antes de la época habitual (Hernández-Oria *et al.*, 2003; Cabrera y Gómez, 2003). Las razones pueden ser atribuidas a diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos fuertemente correlacionados con la temperatura (Taiz y Zeiger, 2006). Desde la detección de un cambio climático global se ha reportado el florecimiento temprano de muchas especies vegetales. Schwartz (1999) reportó que el incremento en las temperaturas de primavera en Europa, ha tenido como consecuencia el inicio temprano de las fases fenológicas (formación de hojas y floración). Asimismo, los cambios fenológicos en la flora africana están altamente correlacionados con el calentamiento global (Parmesan y Yohe, 2003). Weiss y Overpeck (2005) presentaron datos que muestran un aumento de los días calientes en las temporadas de invierno y primavera; y una disminución en la frecuencia de temperaturas congelantes, lo que incrementó la temperatura mínima de invierno por año. Estos fenómenos tuvieron un impacto directo sobre el comportamiento fenológico de la flora del Desierto Sonorense. A diferencia de estos reportes, los patrones de temperatura anuales observados durante 2003, 2005 y 2006 en el BTC no fueron significativamente diferentes ( $F=0.1903$  Prob.  $>F < 0.9024$ ). Así que los cambios observados en la floración de la *M. mathildae* no están relacionados directamente con la temperatura.

Existen otros factores climáticos que pueden correlacionarse con la alteración de la fenología. En ecosistemas áridos y semiáridos, así como en climas tropicales que experimentan sequías estacionales anuales (como en el BTC), este fenómeno es controlado primordialmente por la disponibilidad de agua (Justiniano y Fredericksen, 2000). La estacionalidad puede ser sensiblemente modificada por el cambio climático; promoviendo la ocurrencia de eventos extremos, tales como el alargamiento de las estaciones de lluvias y de secas o de eventos puntuales como inundaciones o sequías (Fauchereau *et al.*,

2003). A diferencia de la temperatura, los patrones de precipitación de 2003, 2005 y 2006 fueron muy diferentes (*Artículo II*). En 2003 no hubo una lluvia importante hasta la última semana de mayo. Mientras que en 2005 y 2006 se registraron lluvias a partir de marzo. La disponibilidad de agua en 2005 y 2006 le permitió al cactus iniciar su periodo de crecimiento anual y desarrollar las gemas florales. Sin embargo durante 2005, después del registro de las primeras lluvias, se presentó un periodo sin lluvia de 5 semanas, la falta de agua tuvo un impacto directo sobre el ER de la población que fue significativamente menor al calculado para la estación reproductiva de 2006 ( $F= 7.7186$  Prob.  $>F < 0.0084$ ).

### **Efecto de la Precipitación sobre el Reclutamiento de *M. mathildae***

La distribución de la precipitación anual en 2005 y 2006 fue más uniforme que la registrada durante 2003, cuando se presentaron lluvias particularmente intensas (*Artículo II*). Este inusual comportamiento alteró el tamaño y la estructura de la población. De 2003 a 2005 se perdió el 47% de los individuos y durante el censo de 2005 sólo se encontraron 5 plántulas. Durante los trabajos de campo se detectaron evidencias de la extracción ilegal de plantas de *M. mathildae*. Sin embargo, la mayor pérdida de individuos se atribuye a la sensibilidad de *M. mathildae* al exceso de agua (observación personal). Después de la estación de lluvias de 2003 el análisis de la estructura poblacional mostró que los individuos más jóvenes (1 – 3 años ó de 0.2 a 2 cm) fueron los que disminuyeron sensiblemente su proporción dentro de la estructura de la población. En contraste las plantas más grandes, con un sistema radicular más fuerte, resistieron las fuertes precipitaciones y los arrastres de lodos que generaron. Estos eventos extremos afectaron el reclutamiento de los siguientes años, ya que las semillas seguramente fueron arrastradas a lugares no aptos para su germinación y establecimiento. Las plántulas de *M. mathildae* se establecen muy cerca de la planta madre; el patrón de distribución espacial de la población sugiere a la hidrocoria como el medio más probable de dispersión de esta especie (observación personal). La germinación de semillas de *M. mathildae* en laboratorio, tras emular un fuerte arrastre por lluvia durante 15 min,

constató que la escarificación mecánica ocasiona una sensible disminución en el porcentaje de germinación (37%). Este porcentaje se encuentra por debajo de la germinación en campo de la especie (40%). Es importante considerar que de estas plántulas, sólo el 0.6% se establece para el siguiente año. Por tanto, se cree que la disminución de semillas de *M. mathildae* en el banco de semillas del suelo, aunado al daño que sufren por la escarificación mecánica ocasionada por las fuertes lluvias, limitó de forma drástica el reclutamiento de esta especie para los siguientes años.

Evidentemente hay un fenómeno climático de largo plazo ocurriendo a nivel mundial que requiere de explicación y entendimiento. El mayor reto es entender que ecosistemas y cuáles de sus constituyentes son más o menos susceptibles a los distintos escenarios de cambio climático. Hay diferentes enfoques para el desarrollo de los modelos de predicción algunos investigadores, como Trenberth *et al.* (2003), enfatizan que la mayor atención debe de centrarse sobre la cantidad de precipitación, más que sobre otros parámetros relacionados, como frecuencia, intensidad, distribuciones, eventos extremos, etc. Sin embargo, en este estudio se ha ilustrado como la distribución de la lluvia influencia el reclutamiento de *M. mathildae* afectando la dinámica de la población en el mediano plazo. De Steven y Wright (2002) encontraron que el reclutamiento de árboles tropicales y la producción de semillas están sincronizados; además, ambos eventos son influenciados por el fenómeno de “El Niño”. La consecuencia es una variación en tiempo y espacio. Debido a que las diversas especies presentan diferentes fases fenológicas es necesario realizar estudios de mediano y largo plazo para otras especies, en particular sobre las especies clave dentro de un ecosistema, como lo son las que funcionan como nodriza de una gran variedad de plantas y animales, incluida *M. mathildae*.

### **Micropropagación de *M. mathildae***

La obtención de material vegetal suficiente para realizar los experimentos de laboratorio y de campo fue uno de los primeros objetivos en atender. La micropropagación por cultivo de tejidos se eligió de entre otras alternativas por



varias razones. La principal fue que esta biotecnología permitiría reducir el tiempo de obtención de un gran número de plantas. Sin embargo, hubo que cuidar algunos factores que podrían incidir de forma negativa en el lote de plántulas generado. En primera instancia se cuidó que las líneas de micropropagación fueran representativas de la diversidad genética de la población blanco. Varios investigadores han cuestionado la pertinencia de usar la micropropagación, ya que genera una línea de cultivo con baja diversidad genética, ello debido a que los explantes usados para iniciar el cultivo provienen regularmente de una o de pocas plantas. Por ello, se colectaron semillas del 52% de la población de *M. mathildae* de la Cañada de Juriquilla y con la mezcla de semillas obtenida se produjeron los explantes usados en el proceso de organogénesis. Otro factor controversial es la adición de RCV, tanto para la producción de tallos, como para el enraizamiento. Como se explicará más adelante, este factor fue superado al no necesitar de los RCV para la micropropagación de *M. mathildae*.

La germinación *in vitro* de las semillas de *M. mathildae* no presentó dificultad alguna, alcanzando un elevado porcentaje en tres semanas (91%). Estas plántulas fueron empleadas para los experimentos de activación de tallos. Contrario a lo reportado para otras especies de *Mammillaria* (Papafotiou *et al.*, 2001; Poljuha *et al.*, 2003; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007), donde la adición de reguladores de crecimiento, en especial citocininas, es crucial para la generación de tallos; el medio MS fue suficiente para lograr su regeneración en los tres tipos de explantes ensayados. Se sabe que algunos cactus tienen la capacidad de sintetizar auxinas *in vitro*; por tanto su aplicación exógena estimula con frecuencia la formación de callo. Esto puede ser una desventaja en sistemas de micropropagación, ya que la adición de RCV puede promover cambios genéticos en las plantas que se expresen en conformaciones fenotípicas no deseables (Venkatachalam *et al.*, 2007). Palomino *et al.* (1999) demostraron la estabilidad cariológica de *Mammillaria san-angelensis* cultivada *in vitro* tras un largo periodo de subcultivos suplementados con auxinas. Sin embargo, el análisis cariológico no revela alteraciones en genes específicos o pequeños arreglos cromosomales

(Rout *et al.*, 1998; Venkatachalam *et al.*, 2007). Las variaciones genéticas promovidas por el cultivo de tejidos son de particular cuidado en cuestiones de conservación (Viswambharan *et al.*, 2006). Giusti *et al.* (2002) sostienen que tales variaciones genéticas pueden ser benéficas para la planta, al favorecer su sobrevivencia en un hábitat natural. Sin embargo, los efectos de largo plazo de las posibles variaciones genéticas no pueden ser previstos, y por tanto sus repercusiones sobre el ensamblaje de los ecosistemas es incierto.

En el caso de la micropropagación de *M. mathildae* (Artículo III), bastó el medio MS para promover la proliferación espontánea de tallos; sin embargo, el promedio de tallos fue bajo comparado con otras especies. La omisión de RCV en las formulaciones de los medios de cultivo no es común, pero si ha sido reportada. Su adición en las formulaciones generalmente aumenta la respuesta organogénica, lo que incentiva la respuesta de formación de tallos o raíces. Por ejemplo, *M. san-angelensis* produce por organogénesis indirecta entre 21 y 35 tallos por callo (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

Los RCV también son ampliamente usados para inducir el crecimiento de raíces en cactus (Fay y Gratton, 1992). Por el contrario, *M. mathildae* generó raíces de forma espontánea al ser cultivada en medio MS libre de RCV. Este es un fenómeno frecuente en las cactáceas, y ha sido reportado para muchas especies *e.g.* *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu y Bhau, 2000), *Turbinicarpus* spp. (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005), *Notocactus magnificus* (de Medeiros *et al.*, 2006), y en particular en aquellas especies que producen raíces adventicias, tales como *Opuntia amyclaea* (Escobar *et al.*, 1986), *Agave parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999), *Hylocereus undatus* (Mohamed-Yasseen, 2002) y *Agave tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006). Como en el caso de *M. mathildae*, la adición de RCV en estas especies induce la formación de callo. En vida silvestre *M. mathildae* presenta una extraordinaria capacidad de regeneración. *In vitro*, se observó un fenómeno interesante; a partir del abundante sistema radicular, se desarrollaron múltiples tallos sin la adición de RCV. Este fenómeno no es raro, ya que los especímenes silvestres frecuentemente regeneran el tallo a partir de las raíces; de igual forma, después

de un daño físico al tallo, éste tiende a formar rametos. Sriskandarajah *et al.* (2006) estudiaron la capacidad de regeneración de las cactáceas *Rhipsalidopsis* y *Schlumbergera*. Encontraron que durante los subcultivos *in vitro* el incremento del metabolismo de auxinas en sinergia con el aumento de la actividad de la citocinina oxidasa-deshidrogenasa “ajusto” el reservorio de auxinas y citocininas, favoreciendo la formación de tallos adventicios en *Rhipsalidopsis*. En cambio, la combinación de una baja actividad de la peroxidasa y la producción endógena de auxinas dificultó la formación de raíces en *Schlumbergera*. Aunque hacen falta estudios para afirmarlo, es probable que la capacidad para producir un sistema radicular fuerte en *M. mathildae*, este asociado a una elevada producción de RCV endógenos. Como consecuencia, la adición de cualquier RCV, inclusive en bajas concentraciones, fomenta una profusa producción de callo. A este respecto, Clayton *et al.* (1990) reportaron que las cactáceas producen una cantidad apreciable de RCV *in vitro*, que pueden promover la formación de callo durante su cultivo.

A pesar de la baja producción de plántulas con el protocolo descrito, la omisión de los RCV representó algunas ventajas. En principio los costos de producción se reducen; y más importante, se obtienen plantas genéticamente estables que son preferidas para los procesos de re-introducción *versus* una alta tasa de producción de plantas con posibles alteraciones genéticas que pueden representar un costo-beneficio negativo en el mediano o largo plazo.

### **Evaluación de las MVA en Campo y su Cultivo en Laboratorio**

Antes de iniciar el aislamiento del consorcio micorrízico, se determinaron los valores de colonización de las MVA en las especies vegetales distribuidas a lo largo del hábitat de *M. mathildae*. También se monitoreó el número de esporas presentes en las rizósferas de *M. mathildae* y de las plantas asociadas a la cactácea. Tanto *M. mathildae*, como el resto de las plantas (con índices de asociación positivos y negativos) presentaron algún grado de colonización micorrízica. Este resultado era esperado, pues se sabe que las micorrizas se encuentran en prácticamente en todos los ecosistemas (Corkidi y Rincón, 1997;

Sylvia *et al.*, 2003). Esporas de las familias Gigasporaceae y Glomaceae fueron encontradas en todas las muestras estudiadas. Estas especies son comunes en ecosistemas áridos y semiáridos (Diallo *et al.*, 1999; Bashan *et al.*, 2000). Los suelos procedentes de las plantas que presentaban un grado de micorrización aceptable fueron empleados para iniciar los “cultivos trampa”. Las esporas de muchos de estos hongos entran en dormancia durante la estación de secas en el BTC (observación personal), por ello, fueron necesarios tres ciclos de cultivo para obtener altos índices de esporulación. La diversidad inicial de esporas en los cultivos trampa mostró que todas ellas pertenecían a la familia Glomaceae, con excepción de un morfotipo de *Gigaspora* detectada en el cultivo trampa de la rizósfera de *M. repens*. Para el tercer ciclo de cultivo, no se detectó la presencia de *Gigaspora*; su desplazamiento se puede atribuir a una incompatibilidad con el hospedero (*Sorghum vulgare*) empleado. A este respecto, Liu y Wang (2003) encontraron que la planta hospedera ejerce una fuerte influencia sobre la diversidad de las especies de MVA detectadas en los cultivos trampa. De igual forma se sabe que las MVA difieren marcadamente sobre los efectos que promueven sobre una especie vegetal en particular (Liu y Wang, 2003; Rudgers *et al.*, 2004; Munkvold *et al.*, 2004). Es por ello que las MVA nativas no necesariamente exhiben una alta efectividad como inoculantes en agrosistemas (Enkhtuya *et al.*, 2000). El consorcio micorrízico nativo ha establecido una simbiosis específica con las especies locales, por ello su capacidad para colonizar una especie exótica (como el sorgo) puede no ser muy buena. Para los ensayos de micorrización de *M. mathildae* se seleccionó el consorcio producido en el cultivo trampa proveniente de la rizósfera de la cactácea, ya que muy probablemente este consorcio es altamente compatible con ella.

### **Estrategia de Inoculación**

La inoculación con ectomicorrizas es una práctica común en los sistemas agroforestales. A diferencia de estos hongos, las MVA necesitan de un hospedero para su reproducción, lo que hace más complejo el proceso de inoculación. El método más empleado es la adición de suelo micorrizado que

contiene las esporas de las MVA y las raíces de plantas colonizadas cortadas finamente. Por supuesto, el establecimiento de la simbiosis depende de los factores ambientales, de la compatibilidad del hospedero y de las características intrínsecas de la micorriza. Por ello, el uso de sistemas de inoculación tradicional presenta algunas desventajas. La obtención de grandes cantidades de inoculo y con un alto índice de infectividad no es común. Lo que representa un factor limitante para la inoculación, ya que hace necesario aplicar grandes cantidades de inoculo. En pequeña escala los procedimientos de inoculación de MVA han sido exitosos, aunque los índices de colonización no son notables (Tian *et al.*, 2004). Además la contaminación es común en estas prácticas limitando sus aplicaciones industriales. Superar estos problemas involucra un esfuerzo muy grande y una inversión de recursos que a mediano plazo puede ser onerosa.

Por otro lado, los métodos de inoculación directa de MVA ayudan a mejorar el porcentaje de eficiencia del inoculo y no presentan muchos problemas de contaminación. En este estudio el enfoque que se siguió fue el empleo de la aeroponía como vía para inocular MVA en *M. mathildae*. Fueron dos las razones que influyeron en esta decisión. El cultivo aeropónico es una herramienta biotecnológica muy útil para estudiar las interacciones planta-micorriza, ya que se pueden observar los procesos de colonización del hospedero directamente, y hacer las determinaciones sin ocasionar mayor daño al hospedero. Para infestar plantas con MVA, la aeroponía es altamente eficiente, comparada con los cultivos trampa en tierra (Weathers y Zobel, 1992), ya que ésta permite alcanzar índices de colonización cercanos al 100% (Martin-Laurent *et al.*, 1999). Es el alto grado de aeración en el cultivo aeropónico lo que potencia los efectos benéficos de la simbiosis planta-hongo (Weathers y Zobel, 1992). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los de Bagyaraj (1991), quien apunta que una alta aeración mejora la micorrización de las raíces. Recientemente, Kratsch *et al.* (2006) demostraron que una atmósfera rica en oxígeno induce una profusa nodulación en 4 semanas. En este estudio las raíces de *M. mathildae* fueron extensamente colonizadas por las MVA en 8 semanas.

La segunda razón para usar el cultivo aeropónico, fue que esta tecnología ha sido exitosamente usada para la producción a nivel comercial de especies leñosas (Martin-Laurent *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2005), de un gran número de vegetales (Kay y Lee, 1995; Cho *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; He y Lee, 1998; Biddinger *et al.*, 1998), tubérculos (Ritter *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2008), así como de plantas ornamentales (Scoggins y Mills, 1998; Molitor *et al.*, 1999). Hasta ahora, no se han reportado intentos de cultivo aeropónico con la familia Cactaceae. Aparentemente la alta HR que se genera en la cámara de crecimiento aeropónico parece un obstáculo para intentarlo. Sin embargo, las condiciones de alta HR del cultivo pueden ser disminuidas notablemente variando los periodos de aspersion, lo que permitiría tener éxito en el cultivo de especies de esta familia. El intervalo de aspersion (periodo entre aspersiones) y la duración (tiempo de aspersion) debe de ser ajustado para cada tipo de cultivo ya que cada uno requiere de una HR particular. Weber *et al.* (2005) ajustaron el intervalo de aspersion a 40 seg con un tiempo de aspersion de 30 seg para el cultivo del árbol tropical *Acacia mangium*, alcanzando niveles de HR de 80 a 85%. Para el cultivo de vegetales los fabricantes del sistema aeropónico empleado en este estudio recomiendan tres seg de aspersion, con intervalos de cinco a 10 min. Con ello se genera una HR de 56 a 70%. Se ha mencionado que *M. mathildae* es sensible a ambientes muy húmedos, por ello se probaron dos intervalos: 10 y 30 min (*Artículo IV*). El periodo de aspersion corto generó una HR elevada, que ocasionó la muerte de una alta proporción de plántulas. Por otro lado, el periodo de aspersion largo redujo la HR al rango de 40 a 45%. Esta condición mantuvo una atmósfera con un nivel de aeración elevado y la humedad necesaria para el buen desarrollo de las plántulas; de hecho el 97.6% de ellas sobrevivió bajo estas condiciones.

### **Efecto del Inoculo Micorrízico sobre el Crecimiento de *M. mathildae***

Las micorrizas son microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Fortín *et al.*, 2002). Un inoculo de MVA es efectivo cuando induce un aumento significativo en el crecimiento de las plantas. Empleando el sistema tradicional

de inoculación, Rincón *et al.* (1993) encontraron que las MVA incrementaron la producción de biomasa seca, el radio raíz/tallo y la longitud de la raíz de plántulas de *Pachycereus pecten-aboriginum*. Un resultado similar fue reportado por van der Heijden (2004), quien encontró que las plántulas de pasto crecen más largas y obtienen más P cuando están presentes las MVA. En el caso de las plántulas de *M. mathildae*, el inoculo micorrízico colonizó en 60 días el lote completo. Dos semanas después, estas plántulas mostraron una diferencia notable en altura (32%) y diámetro (24%), así como en peso seco (20%) respecto de las plántulas no micorrizadas (*Artículo V*). Otro efecto esperado de la micorrización fue el aumento en la cantidad de P acumulado por las plántulas de *M. mathildae*, que alcanzó casi un 40% más que el control.

En cultivo aeropónico, en sólo tres meses las plántulas de *M. mathildae* aumentaron en tamaño lo que les tomaría 1 año en vida silvestre. Martin-Laurent *et al.* (1999) reportaron que *Acacia mangium* colonizada con *Glomus sp.* y cultivada con aeroponía alcanzó el doble de la talla de las plantas cultivadas en suelo. El crecimiento de *M. mathildae* inoculada con MVA se incrementó notablemente durante el cultivo en aeroponía (0.66 cm de diámetro en tres meses), este rango de crecimiento contrasta mucho de los valores registrados en la población de la Cañada de Juriquilla (menos de 0.5 cm de diámetro por año). En el BTC, *M. mathildae* experimenta un periodo anual de sequía de entre seis y siete meses, con la consecuente reducción del metabolismo de la planta; es durante la estación de lluvias cuando el cactus crece de forma más activa. Por otro lado, el P acumulado fue mayor en plántulas micorrizadas, este fenómeno sin duda representó una ventaja para la planta que se reflejó en la producción de flores (ver siguiente sección). Finalmente, hay que resaltar que estas condiciones facilitaron la transferencia de las plántulas al invernadero; donde, tras dos meses el lote mostró un alto rango de sobrevivencia (98%).

### **Promoción de la Floración por MVA**

Los hongos micorrízicos promueven el crecimiento y la formación de productos consumibles y órganos de almacenamiento (Biddinger *et al.*, 1998;

Chang *et al.*, 2008), de perennación (Martin-Laurent *et al.*, 1999) y de reproducción (Molitor *et al.*, 1999). Todos estos autores reportaron un incremento notable de los tejidos aéreos de la planta con el subsiguiente aumento en la biomasa.

En su ambiente natural la primera floración de *M. mathildae* ocurre entre su cuarto y quinto año. Como antes se discutió, para esta especie la precipitación dispara el proceso de floración. Las plantas silvestres con un tamaño de entre 2.30 y 2.79 cm de diámetro producen un promedio de  $16 \pm 5.22$  flores. El pico máximo de producción se da a mediados de abril; aunque como se mencionó este periodo puede variar dependiendo del patrón de lluvias de cada año (*Artículo II*). Las plantas inoculadas con MVA que fueron transferidas al invernadero florecieron en el mismo periodo que las plantas silvestres en 2008 y 2009. Aparentemente las MVA no influyeron sobre el periodo de floración, pero si sobre el estado nutricional de la planta que permite disparar el proceso. Este fenómeno es controlado por factores ambientales (como se ha discutido) y por señales endógenas de la planta. Aunque los principales promotores de la floración son los factores abióticos (Yong *et al.*, 2000), algunos agentes bióticos pueden estar involucrados indirectamente.

Scagel y Schreiner (2006) inocularon *Glomus intraradices* en plantas de *Zantedeschia*, el resultado fue un incremento tanto en la productividad como en la cantidad de plantas en floración; incentivado por la deposición de P que está asociada con el peso y composición del bulbo, número y longevidad de las flores, e inicio de la antesis; al igual que con el reparto de carbono y nutrientes entre hojas y estructuras de floración. De igual forma, Gange y Smith (2005) reportan que las micorrizas incrementan casi en un 70% el número total de flores producidas anualmente en la planta *Centaurea cyanus*. Hasta donde sabemos, no existe un reporte sobre el incremento de la producción y la calidad de las flores en cactus inoculados con MVA. En el caso de *M. mathildae*, se registró un aumento del tamaño de las plantas y las características de la floración de las plantas mantenidas en el invernadero (número de flores y tamaño de flores). Durante la segunda semana de abril, las plantas de *M. mathildae* micorrizadas



exhibieron un 64% de floración en el invernadero; en contraste las plantas sin micorrizas no florecieron. Esta característica aumenta el valor en el mercado de las plantas ornamentales, ya que le confieren un componente estético que incrementa la calidad comercial, y por lo tanto la satisfacción del consumidor.

Por otro lado, las plantas re-introducidas también produjeron flores, aunque en un menor rango (14%). La notable diferencia respecto de las plantas en invernadero se puede atribuir a la disponibilidad de agua, que fue constante para éstas, mientras que las plantas re-introducidas experimentaron el periodo de sequía anual del BTC. Asimismo, como se ha mencionado, las reservas de P superiores promovidas por la micorrización ayudaron a la formación de flores en esta especie.

Originalmente se buscó que estas plantas tuvieran un tamaño suficiente para resistir el estrés del proceso de trasplante y de la carencia de agua. Sin embargo, no se consideró que las plantas se encontraran en etapa reproductiva, ya que las plantas con rangos de crecimiento lentos evidentemente tardan un tiempo considerable para alcanzar su estado reproductivo. Por ello, en restauración es raro el uso de plantas que cumplan con esta característica, sobre todo si se usan métodos de propagación tradicional. Es muy recomendable que las plantas empleadas en los procesos de re-introducción se encuentren en etapa reproductiva, ya que la producción de semillas generada incrementa el banco de semillas del suelo *in situ*; factor indispensable para acrecentar el porcentaje de reclutamiento en un periodo de tiempo relativamente menor.

### **Selección de la Parcela Experimental**

La germinación y el establecimiento de una plántula en su ambiente natural es un evento multifactorial; por tanto, reproducir las condiciones en un área diferente en la que históricamente ha habitado una especie, puede representar un reto. Se puede asumir que el área donde se desarrolla una población que exhibe un índice adecuado de reclutamiento posee todos los elementos necesarios para que la planta germine y se establezca. Por ello,

durante la selección del área de re-introducción hay que poner especial atención en seleccionar un área en la que los factores bióticos y abióticos sean lo más similares a la de la población original.

Los factores bióticos pueden modificar factores abióticos en pequeña escala. Por ejemplo, la arquitectura del dosel de un bosque puede determinar un microclima, que permite el desarrollo de una gran variedad de especies bajo su dosel. Los manchones de diferentes especies determinan condiciones microclimáticas disímiles en áreas muy pequeñas (metros). Leirana-Alcocer y Parra-Tabla (1999) encontraron que plántulas de *Mammillaria gaumeri* sobreviven exclusivamente en áreas con microhábitats sombreados. El tamaño y la densidad del dosel es un factor determinante para el establecimiento de pequeñas cactáceas, debido a que le proporcionan un balance de sombra e iluminación particular para su desarrollo. A este respecto, Zúñiga *et al.* (2005) encontraron que *Lophophora diffusa* se asocia a *Larrea tridentata* y *Acacia sororia*, mientras que se disocia de *Celtis pallida*, ésta última genera una sombra mucho más intensa que los otros arbustos. *M. mathildae* crece exclusivamente en pendientes con afloramientos rocosos bajo el dosel de ciertas plantas nodriza, como *L. microphylla* y *B. fagaroides*, (consultar la sección “Caracterización del hábitat de *M. mathildae* y Ubicación de sus Poblaciones”). Estos árboles reducen la pérdida de humedad del suelo y la incidencia solar, la estructura de su dosel reduce la temperatura superficial alrededor de 14° C, dotando a la *M. mathildae* de un ambiente propicio para su germinación y establecimiento. Por el contrario, cuando en el área de estudio fueron removidos algunos árboles de *L. microphylla* la estructura de la vegetación que protegían cambió; *J. dioica* y *O. pubescens* sobrevivieron, pero las plantas de *M. mathildae* y otras herbáceas murieron (observación personal). La parcela experimental fue seleccionada en base al conocimiento de las especies de árboles que fungen como nodriza de *M. mathildae*, los valores del IAF y de temperatura superficial del área elegida, que fueron similares a los determinados en las agregaciones más grandes de *M. mathildae*.

## **Contribución de las MVA a la Supervivencia en Campo de *M. mathildae***

En general el éxito de los procesos de re-introducción de plantas a su hábitat natural ha sido escaso. Algunas re-introducciones que han tenido éxito son las de *M. san-angelensis* con un 91% de supervivencia (Rubluo *et al.*, 1993); o la *Mammillaria pectinifera* y de *Pelecyphora aselliformis* (Giusti *et al.*, 2002), ambos fueron realizados en jardines botánicos donde los especímenes recibieron cuidados constantes. En contraste, cuando los cactus son re-introducidos en su hábitat natural, se reportan pérdidas significativas (muchas veces el lote completo) (Leirana-Alcocer y Parra-Tabla, 1999; Contreras y Valverde, 2002). Decruse *et al.* (2003) reportaron la re-introducción exitosa de la orquídea *Vanda spathulata* a su hábitat natural (50-70% de supervivencia). La principal causa de muerte para la orquídea fue atribuida a los factores abióticos (exposición a luz solar directa y a los vientos monzónicos). En otro estudio, Stiling *et al.* (2000) establecieron que durante la restauración de *Opuntia corallicola*, se alcanzó un 65% de supervivencia, aquí la principal causa de la muerte fue la pudrición de los tallos originada por una infección bacteriana.

Después de la re-introducción de *M. mathildae* (una vez que cesaron las lluvias), se registró una abrupta disminución del lote en los primeros 15 días. Es probable que la carencia de agua tuviera un impacto negativo sobre el lote sembrado. Bajo estrés hídrico, los estomas y otros componentes cuticulares de la hoja juegan un papel fundamental para mantener el balance hídrico de la planta. La supresión de las ceras epicuticulares, es común durante el cultivo de tejidos, el fenómeno se asocia a la alta HR y a la baja intensidad luminosa del proceso (Shepherd y Griffiths, 2006). Malda *et al.* (1999) mostraron que plantas de *Obregonia denigri* obtenidas por cultivo *in vitro* presentaron una baja cantidad de ceras epicuticulares. Tres meses después de su traspaso al invernadero las plantas generaron un nivel similar de ceras al de especímenes maduros. Cabe señalar que no encontraron una correlación entre el porcentaje de supervivencia en invernadero y su contenido de ceras. Las primeras observaciones de *M. mathildae* en campo sugieren que el proceso de aclimatación presentó tantas

bajas debido a que la planta no soportó la falta de agua. La carencia de la cubierta cerosa pudo influir en este desbalance hídrico, sobre todo porque el lote re-introducido experimento una rápida desecación al concluir el periodo de lluvias.

Las plantas silvestres se asocian a una gran variedad de bacterias y hongos (Brundrett, 2002). Entre estas asociaciones, las que establecen con los hongos micorrízicos juegan un papel fundamental en la absorción de P y la toma de agua en ambientes semiáridos y áridos (Sylvia *et al.*, 2003). Carrillo-García *et al.* (1999) reportaron la presencia de MVA en una amplia variedad de cactus del Desierto Sonorense, los simbioses ayudan a las plantas a incrementar su coeficiente de absorción de agua. Goicoechea *et al.* (2004) encontraron que los hongos micorrízicos incrementan la respuesta de *Anthyllis cytisoides* a la desecación, al inducir la deposición de cera epicuticular y la abscisión de hojas. Ellos sostienen que este fenómeno puede constituir una adaptación ecológica para combatir un desecamiento severo. Es probable que la carencia de simbioses benéficos en las plantas micropropagadas de *M. mathildae* resulte en una condición desfavorable al ser sembradas en su hábitat natural, ya que la disponibilidad de agua disminuyó en la época de siembra y la capacidad de toma de agua de las plantas no micorrizadas es menor. Si las plantas fueran a ser empleadas para su comercialización, el problema del agua no sería un factor clave a considerar, por el contrario para la re-introducción, su baja capacidad de absorción de agua es una condición limitante.

El aporte de los microorganismos de la rizósfera comienza desde el proceso de la germinación. Kiers *et al.* (2000) encontraron que las plántulas de especies con semillas pequeñas dependen del inoculo de micorrizas para su sobrevivencia y crecimiento inicial. La comunidad micorrízica tiene el potencial para influenciar diferencialmente el reclutamiento de plántulas de diversas especies, y por tanto es capaz de afectar la composición de la comunidad vegetal. Las micorrizas fueron determinantes para la germinación y el establecimiento de la *M. mathildae*. Las plántulas germinadas en SM lo hicieron antes y en mayor proporción que las puestas en SE; que murieron alrededor de

los 100 días. Por el contrario, plántulas micorrizadas de cinco meses fueron capaces de resistir un periodo de un mes sin recibir agua.

Se ha descrito como las MVA han mejorado el crecimiento de *M. mathildae*. Bajo condiciones controladas estas plantas se desarrollan de manera muy satisfactoria; sin embargo, una vez sembradas en su hábitat no sabemos cuál será su desempeño. Martin-Laurent *et al.* (1999) mencionan la necesidad de realizar experimentos de campo que verifiquen si los microorganismos inoculados por aeroponía siguen promoviendo el crecimiento de sus hospederos, y por consiguiente colaborando en su adaptación dentro de un hábitat silvestre.

En un segundo experimento de re-introducción, el lote control (*M. mathildae* sin micorrizas) tuvo un destino similar al de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos; no obstante, que éstas tuvieron un tamaño mayor, equivalente a plantas silvestres de 4 años ( $1.99 \pm 0.07$  cm de altura /  $1.54 \pm 0.03$  cm de diámetro Vs.  $1.79 \pm 0.04$  cm de altura /  $1.37 \pm 0.02$  cm de diámetro). Sólo el 46% de las plantas sobrevivió después de seis meses en campo. Por el contrario, el 89% de las plantas micorrizadas sobrevivieron durante este mismo periodo. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Matsubara *et al.* (1998), quienes mostraron que la inoculación con MVA en plantas jóvenes de *Asparagus officinalis* generadas por cultivo de tejidos aumentaron su índice de sobrevivencia durante el proceso de aclimatación. La simbiosis planta-hongo desarrollada en el cultivo aeropónico fue capaz de adaptarse a un ambiente de escasa humedad y así pudo explotar las reservas de agua de los resquicios más pequeños del suelo.

Por otro lado, durante el cultivo aeropónico, la toma de P de las plantas micorrizadas fue superior, este hecho le confiere una ventaja a los cactus que fueron sembrados en campo, dado que la disponibilidad de nutrimentos en ambientes silvestres son un fuerte factor de restricción. Este elemento es fundamental para la síntesis de azúcares fosfatados, ácidos nucleicos, fosfolípidos, etc. y es clave en el metabolismo energético. Su disponibilidad en el suelo es regularmente pobre para las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Por ello, el uso de microorganismos que ayudan a tomar P del suelo dota de una ventaja a

las plantas colonizadas. Usar un consorcio de MVA como promotores del crecimiento puede tener más ventajas que usar una especie única. Por ejemplo, la diversidad funcional entre las MVA sugiere que la combinación de algunas especies puede incrementar la efectividad en la extracción de P del suelo. El suelo en el área de estudio es superficial, muy delgado y tiene una apreciable cantidad de materia orgánica; como resultado la mayor cantidad de P en el suelo se encuentra poco accesible. Koide y Kabir (2000) descubrieron que la hifa extra radical de *Glomus intraradices* hidroliza el P orgánico en su forma inorgánica, aumentando su disponibilidad, lo que permite aprovechar este recurso.

### **Cultivo de Tejidos y Cultivo Aeropónico: ¿Son Biotecnologías Costeables?**

Muchos investigadores reconocen que la micropropagación de cactáceas es una biotecnología muy útil para la producción de grandes volúmenes de plantas, ya que reduce su tiempo de generación (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Santos-Díaz *et al.*, 2003). Sin embargo, los altos costos de producción hacen que el uso de esta tecnología sea insostenible para producir ciertas especies vegetales. A pesar de estos inconvenientes, el uso de esta herramienta puede ser justificado cuando otros métodos son muy lentos o muy caros, para incrementar nuevos cultivares de forma rápida, o para mantener y distribuir lotes de plantas mejoradas (Ibaraki y Gupta, 2006).

Para este estudio un cactus en peligro de extinción fue exitosamente micropropagado. En siete meses se obtuvieron plantas similares a plantas silvestres de 3 años. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Malda *et al.* (1999), compararon el crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima* y encontraron que su cultivo *in vitro* acelera notablemente el crecimiento. En adición, con la intención de reducir los costos de producción, en el protocolo desarrollado se sustituyó el agua doble destilada por agua destilada y la sacarosa por azúcar comercial refinada, además de prescindir del uso de RCV. Tan sólo el valor de la sacarosa grado reactivo es de aprox. 385 pesos por Kg, mientras que su equivalente de azúcar comercial refinada es de 9.5 pesos. Ya que la sacarosa es el principal componente del medio de cultivo, y

junto con las hormonas, contribuye a los altos costos del producto final, el medio de cultivo empleado en esta investigación fue bastante accesible. Namdeo *et al.* (2006), reportan que la sustitución de sacarosa en el medio de cultivo reduce alrededor de 25 veces el costo del proceso.

Por otro lado, el sistema de cultivo aeropónico fue muy efectivo para infectar las raíces con MVA. El uso de cepas individuales de MVA para mejorar el crecimiento de las plantas ha sido ampliamente reportado (Vestberg *et al.*, 2004; Zandavalli *et al.*, 2004; Aliasgharзад *et al.*, 2006) y su adquisición en ceparios es relativamente fácil. Sin embargo, Rai (2001) menciona que el uso de un inoculo integrado por un consorcio de microorganismos es más efectivo que la acción de una cepa individual. Este enfoque, es menos costoso y ahorra tiempo ya que evita el aislar la cepa nativa y probar su acción como bio-inductora del crecimiento vegetal, proceso largo y costoso para emplearse en la restauración de hábitat. Por ello, un enfoque bastante común, es el uso de una mezcla comercial de microorganismos benéficos que incluyen hongos y bacterias (Rincón *et al.*, 1993; Kiers *et al.*, 2000; Jayachandran y Shetty, 2003; van der Heijden, 2004). Actualmente muchos productos comerciales están conformados con esta mezcla, pero su aceptación en el mercado hortícola no ha sido bueno, debido a que los inoculos exóticos no están debidamente caracterizados en términos de sus requerimientos ecológicos y estabilidad dentro del ecosistema (Gianinazzi y Vosátka, 2004). Como antes se discutió Gigasporaceae no fue estable dentro del cultivo trampa y fue desplazada por las Glomales. En nuestra experiencia, el consorcio nativo de MVA mejoró exitosamente el crecimiento y apariencia (tamaño y número de flores) de *M. mathildae*. Por el contrario, no se recomienda el uso de inoculos comerciales para procesos de re-introducción, debido a que en adición a los costos directos, la implementación de un consorcio nativo conlleva un ahorro implícito. El uso de microorganismos benéficos nativos, que establecen una simbiosis con las plantas locales, determina la estructura de la comunidad y mantienen las redes tróficas del ecosistema blanco. Mientras que el uso de microorganismos exóticos promueve diferencias en el desempeño de las plantas, que puede diferir

marcadamente entre especies, alterando la estructura de la vegetación (O'connor *et al.*, 2002; Munkvold *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2006) o favoreciendo la intrusión de especies exóticas o de alguna especie local más que de otra (e.g. pastos invasores). El costo para revertir estos problemas puede ser inmenso (Schwartz *et al.*, 2006).

En resumen, ambas tecnologías pueden ser usadas para optimizar los sistemas de producción. Se espera, que además de emplearse en la aumentación de la población de la Cañada de Juriquilla, estas biotecnologías se usen para la producción comercial de cactáceas y así cubrir parte del mercado de estas plantas de ornato; ya que con ciertas modificaciones los protocolos disponibles para un gran número de especies pueden ser costo-efectivos.

### **Implicaciones para la Conservación del Hábitat**

La presente tesis muestra un protocolo que integra la información del hábitat, analizada con la tecnología de sistemas de información geográfica, y las relaciones de las especies que lo habitan, así como un protocolo de micropropagación e inoculación con MVA para ayudar a las plantas en su establecimiento en campo. Juntas forman una estrategia de conservación a nivel de paisaje basándose en la conservación de una especie endémica de la región. Es importante resaltar que el uso de estas tecnologías, reduce los costos significativamente, ya que los métodos tradicionales son muy costosos.

Como se mencionó, dos de las nuevas poblaciones de *M. mathildae* se encuentran en un Parque Nacional, la población de la Cañada de Juriquilla está en un área de conservación privada. Las cinco poblaciones restantes se encuentran distribuidas a lo largo de la zona oriente de la ciudad; que ha sido ampliamente fragmentada en las últimas décadas (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008), por los procesos que operan globalmente: urbanización, rápida migración, cambio del uso del suelo con poca o ninguna planeación, altos índices de pobreza, etc. (Behnke, 2008). Encontrar poblaciones de *M. mathildae* a lo largo de los fragmentos de áreas silvestres es de gran relevancia, debido a



que provee de sólidos argumentos para replantear las áreas de conservación en el Municipio de Querétaro.

En 2004 se gestionó con el Fideicomiso Queretano para la Conservación del Medio Ambiente (FIQMA) la adquisición de 6.35 ha donde se encuentra la población de la Cañada de Juriquilla. Con ello se garantizó que la población no desapareciera por el cambio de uso de suelo o prácticas no deseables (e.g. pastoreo o siembra); esta área ha sido declarada área natural protegida (Anexo I). Sin embargo, en el largo plazo, el fin más ambicioso es la creación de un corredor biológico que restaure la conectividad funcional y minimice el proceso de fragmentación del hábitat, al interconectar las áreas naturales protegidas actuales mediante la creación de pequeñas zonas de conservación entre ellas. Es importante apuntar que la adquisición de tierras para conservación ha sido determinante para incrementar la protección de la biota; tanto, que es una opción cada vez más recurrida por los programas de conservación (Hilty *et al.*, 2006).

El modelo de distribución potencial de *M. mathildae*, junto con otros trabajos sobre escurrimientos pluviales, intercepción e infiltración de lluvias, captura de CO<sub>2</sub>, etc. se están empleando en la declaratoria de Área Natural Protegida de uno de los manchones silvestres más importante de la ciudad de Querétaro: Peña Colorada, donde existen dos poblaciones de *M. mathildae* que comparten el hábitat con otras especies amenazadas (e.g. *C. dugesii*, *F. histrix* o *C. granula*).

Los resultados de esta investigación fueron empleados recientemente por la “Subdelegación de Gestión para la Protección Ambiental y Recursos Naturales” y la “Dirección de Ecología del Municipio de Querétaro”, para formular el proyecto de decreto de ANP para la Cañada de Juriquilla. Asimismo, serán empleados para buscar el nombramiento de ANP para Peña Colorada.

## VII. CONCLUSIONES

El mapa generado por GARP sirvió para localizar seis nuevas poblaciones que se encuentran alrededor de la ciudad de Querétaro. Asimismo muestra las áreas que probablemente albergan otras poblaciones de *M. mathildae*. El modelo de distribución potencial puede apoyar los argumentos de justificación para la conservación de algunas áreas naturales que rodean a la ciudad de Querétaro; ya que varias de sus poblaciones comparten el hábitat con otras plantas y animales que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana de especies nativas (NOM-059-ECOL-2001).

El conocimiento de las asociaciones positivas y negativas que establece *M. mathildae* con la flora vecina contribuyó a su rápida localización en campo. Posteriormente, la identificación de los árboles que funcionan como principales nodrizas de la *M. mathildae*, fueron indispensables para seleccionar los micrositios para la re-introducción de las plantas.

*M. mathildae* es afectada sensiblemente por el aumento de la precipitación. La disminución de la precipitación o su presencia irregular durante la estación de floración y fructificación, tiene un impacto negativo sobre la producción de semillas de la planta. La presencia de eventos extremos (lluvias muy intensas) promueve el decaimiento de *M. mathildae* en campo e impiden el establecimiento de las plántulas disminuyendo el porcentaje de reclutamiento de la siguiente temporada.

Se ha registrado un cambio en el patrón de precipitación en la ciudad de Querétaro; sus efectos sobre los ecosistemas locales son casi totalmente desconocidos. Por ello, las observaciones de la dinámica poblacional de organismos sensibles a tales cambios contribuirán al mejor entendimiento de cómo son afectadas y por lo tanto, facilitarán la construcción de modelos de predicción más finos, que podrían estimar la distribución potencial de una especie bajo diferentes escenarios climáticos.

La activación de explantes de *M. mathildae*, y su proceso de enraizamiento no requirieron de la adición de reguladores de crecimiento vegetal. Con ello se obtuvieron plántulas con un riesgo mínimo de presentar alteraciones genéticas, característica ideal del material vegetal empleado para los procesos de restauración.

El protocolo de micropropagación desarrollado fue útil para obtener grandes cantidades de material vegetal para la re-introducción. A pesar de que las plantas micropropagadas tenían un tamaño similar al de plantas silvestres de tres años de edad, éstas no presentaron un índice de sobrevivencia notable (49%).

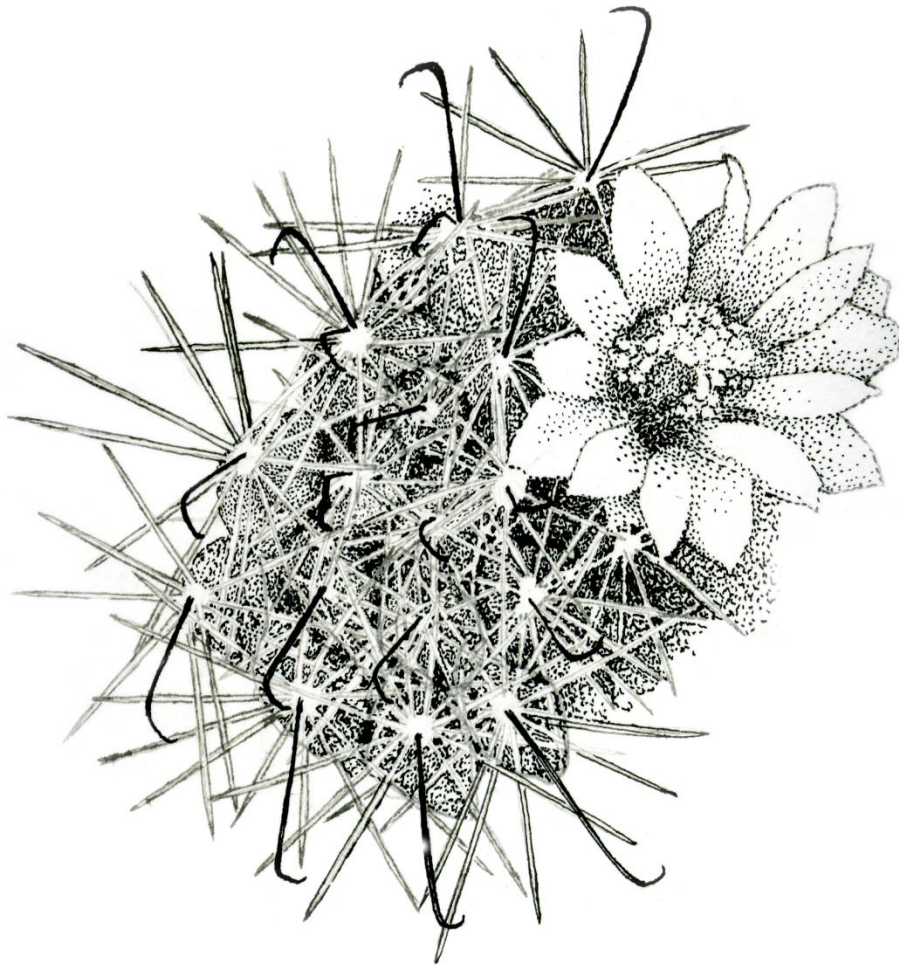
El cultivo aeropónico de plántulas de *M. mathildae* obtenidas por micropropagación y su inoculación con micorrizas nativas produjo en 10 meses cactus equiparables a plantas silvestres de cuatro años de edad en fase reproductiva. El 89% de las plantas lograron establecerse en campo, y fueron capaces de sobrevivir a la temporada de sequía, que experimenta el bosque tropical caducifolio anualmente.

La baja sobrevivencia de las plantas no micorrizadas, demuestra que la ausencia de la simbiosis con micorrizas vesículo arbusculares deja en desventaja a estas plantas respecto de las plantas micorrizadas, que se adaptaron a las condiciones locales de baja disponibilidad de agua del bosque tropical caducifolio.

Cabe remarcar que las técnicas empleadas generaron en el corto plazo plantas que produjeron flores (64% en invernadero y 14% *in situ*), condición considerada favorable en los procesos de re-introducción de especies vegetales.

La proporción de la germinación de esta especie y su posterior establecimiento en condiciones silvestres es comúnmente baja. Debido a este factor intrínseco, la recuperación de la población de forma natural puede ser muy tardada. La colonización de nuevas áreas se ha visto comprometida por la alta tasa de fragmentación del hábitat que han experimentado en los últimos años las áreas naturales que rodean a la ciudad de Querétaro.

El cultivo de tejidos requiere de instalaciones especiales y reactivos costosos, pero su sustitución por reactivos más baratos y buenas prácticas de manejo para reducir contaminaciones hacen que esta tecnología sea viable para los procesos de restauración. En este contexto, ambas biotecnologías, el cultivo de tejidos y la inoculación de micorrizas por medio de aeroponía han probado ser una práctica costo efectiva para lograr la re-introducción de *M. mathildae*, mostrando que estas mismas tecnologías pueden emplearse para la producción comercial de esta especie y potencialmente de otras más.



## VIII. REFERENCIAS

- Aliasgharзад N, Neyshabouri MR y Salimi G (2006) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* on drought stress of soybean. *Biologia*, Bratislava 61 (Supl. 19):S324–S328
- Allen MF (1989) Mycorrhizae and rehabilitation of disturbed arid soils: processes and practices. *Arid Soil Res* 3:229–241
- Anderson EF (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Portland OR. pp 776
- Anderson RP, Lew D y Peterson AT (2003) Evaluating predictive models of species distributions: criteria for select optimal models. *Ecol Model* 162:211–232
- Anderson RP, Lew D y Peterson AT (2003) Evaluating predictive models of species distributions: criteria for select optimal models. *Ecol Model* 162:211–232
- Anderson RP y Martínez-Meyer E (2004) Modeling species' geographic distributions for conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biol Cons* 116:167–179
- Arias S (1993) Cactáceas: conservación y diversidad en México. En: Gío R y López-Ochoterena E (Eds.) *Diversidad biológica en México*, Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, vol 64 (número especial)
- Arriaga L y Gómez L (2004) Posibles efectos del cambio climático en algunos componentes de la biodiversidad de México. En: Martínez J y Fernández B (Eds.) *Cambio Climático: una visión desde México*, SEMARNAT – INE. pp 363
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42
- Bagyaraj DJ (1991) Ecology of vesicular arbuscular mycorrhizae. En: Arora DK, Raj B, Mukerji KG y Knudsen GR (Eds.) *Handbook of applied mycology*. Vol. 1: soil and plants. Marcell Dekker Inc, New York, NY. pp 464

- Baltazar RJ, Mahinda M y Hernández S (2004) Guía de plantas comunes del Parque Nacional “El Cimatario” y sus alrededores. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. pp 88
- Bashan Y, Anne DE, Carrillo-García A y Linderman RG (2000) Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. *Appl Soil Ecol* 14:165–175
- Behnke RH (2008) The Drivers of Fragmentation in Arid and Semi-Arid Landscapes. In: Galvin KA, Reid RS, Behnke Jr. RH, Hoobs NT (eds.) *Fragmentation in Semi-Arid and Arid Landscapes*. Springer, The Netherlands. pp 411
- Bethlenfalvay GJ, Dakessian S y Pacovsky RS (1984) Mycorrhizae in a southern California desert: ecological implications. *Can J Bot* 62:519–524
- Biddinger EJ, Liu CM, Joly CM y Raghothama KG (1998) Physiological and molecular responses of aeroponically grown tomato plants to phosphorus deficiency. *J Ame Soc Hortic Sci* 123:330–333
- Bravo-Hollis H y Sánchez MH (1991) *Las Cactáceas de México*. Vol. 3. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 643
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154:275–304
- Bunn E, Senaratna T, Sivasithamparam K y Dixon KW (2005) *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. *In Vitro Cell Dev Biol P* 41:812–815
- Cabrera LJA y Gómez SM (2003) Algunos aspectos de la biología floral de *Mammillaria mathildae*, especie microendémica del estado de Querétaro y en peligro de extinción. *Memorias del Quinto Verano de la Ciencia de la Región Centro y Segundo Verano de la Ciencia de la UAQ, Querétaro, Mex. UAQ*, 50
- Calvente R, Cano C, Ferrol N, Azcón-Aguilar C y Barea JM (2004) Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi olive tree (*Olea europaea*

- L.) plantations and assessment the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Appl Soil Ecol* 26:11–19
- Carrillo-García A, Bashan Y, Diaz Rivera E y Bethlenfalvay GJ (2000) Effects of resource-island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonora Desert. *Restor Ecol* 8(1):65–73
- Cassells AC y Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64:145–157
- Chang DC, Park CS, Kim SY, Kim SJ y Lee YB (2008) Physiological growth responses by nutrient interruption in aeroponically grown potatoes. *Am J Pot Res* 85:315–323
- Chavas JP (2009) On the productive value of biodiversity. *Environ Resource Econ* 42:109–131
- Chen Z y Zhang X (2000) Value of ecosystem services in China. *Chinese Science Bulletin* 45(10):870–876
- Cho YD, Kang SG, Kim YD, Shin GH y Kim KT (1996) Effects of culture systems on growth and yield of cherry tomatoes in hydroponics. *J Agr Sci* 38:563–567
- Clayton PW, Hubstenberger JF, Phillips GC y Butler-Nance SA (1990) Micropropagation of members of the Cactaceae subtribu Cactinae. *J Ame Soc Hort Sci* 115:337–343
- Contreras C y Valverde T (2002) Evaluation of the conservation status of a rare cactus (*Mammillaria crucigera*) through the analysis of its population dynamics. *J Arid Environ* 51:89–102
- Corkidi L y Rincón E (1997) Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico. I. Mycorrhizal status and inoculum potential along a successional gradient. *Mycorrhiza* 7:9–15

- Costanza R y Voinov A (2004) Introduction: Spatially Explicit Landscape Simulation Models. En: Costanza R y Voinov A (Edts) Landscape Simulation Modeling. Springer, USA. pp 330
- Côte FX, Teisson C y Perrier X (2001) Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro Cell Dev Biol PI* 37:539–542
- Coulson T, Mace GM, Hudson E y Possingham H (2001) The use and abuse of population viability analysis. *Trends Ecol. Evol.* 16:219-221.
- Creedy J y Wurzbacher AD (2001) The economic value of a forested catchment with timber, water and carbon sequestration benefits. *Ecological Economics* 38(1):71–83
- Damman H y Cain ML (1998) Population growth and viability analyses of the clonal woodland herb, *Asarum canadense*. *J. Ecol.* 86:13-26
- Dávila-Figueroa CA, de La Rosa-Carrillo Ma L y Pérez-Molphe-Balch E (2005) *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol PI* 41:540–545
- de Medeiros LA, de Ribeiro RCS, Gallo LA, de Oliveira ET, Dematte MESP (2006) *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84:165–169
- de Steven D y Wright J (2000) Consequences of variable reproduction for seedling recruitment in three neotropical tree species. *Ecology* 83:2315–2327
- Decruse WS, Gangaprasad A, Seeni S y Saroniji-Menon V (2003) Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72:199–202
- Diallo AT, Sambb PI y Ducouss V (1999) Arbuscular mycorrhizal fungi in the semi-arid areas of Senegal. *Eur J Soil Biol* 35:65–75
- Domínguez-Domínguez O, Martínez-Meyer E, Zambrano L, Pérez- Ponce de León G (2006) Using ecological-niche modeling as a conservation tool for freshwater species: live-bearing fishes in central Mexico. *Conserv Biol* 20:1730–1739



- Ellestrand NC y Elam D (1993) Populations consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Systematics* 24:217-242.
- Enkhtuya B, Rydlová J y Vosátka M (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Appl Soil Ecol* 14:201–211
- Escobar H A, Villalobos V M y Villegas A (1986) *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 7:269–277
- ESRI (2000) ArcView GIS v. 3.2. Environmental System Research Inc., USA
- Falk DA, Millar CI y Olwell M (1996) Restoring Diversity: Strategies for Reintroduction of Endangered Plants. Island Press, Washington DC. pp 528
- Fauchereau NM, Trzaska M y Richard Y (2003) Rainfall variability and changes in southern Africa during the 20th century in the global warming context. *Nat. Hazards* 29:139–154
- Fay MF y Gratton J (1992) Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33–48
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpé Y, St-Arnaud M, Coughlan AP y Piché Y (2002) Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot* 80:1–20
- Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations. En: Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective. Soulé ME y Wilcox BA (Eds.). Sinauer, Massachusetts. U.S.A.
- Gange AC y Smith AK (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi influence visitation rates of pollinating insects. *Ecol Entomol* 30:600–606
- García A y Galvan R (1995) Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol Soc Bot Mex* 56:7–24
- García RO y Malda BG (2008) Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest as bio-indicator of climatic change. *Symposium Climate Change and Biodiversity in the Americas*. Panama
- Gianinazzi S y Vosátka M (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Can J Bot* 82:1264–1271

- Giovannetti M y Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84:489–500
- Giusti P, Vitti D, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F y Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci Hortic* 95:319–332
- Glass C (1998). Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México. Vol. 1. CONABIO-Cante, México. pp 216
- Goicoechea N, Merino S y Sánchez-Díaz M (2004) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the deciduous shrub *Anthyllis cytisoides* under water deficit. *Physiol Plantarum* 122:453–464
- Gucinski H, Neilson RP y McNulty S (2004) Implications of global climate change for Southern forests: Can we separate fact from fiction? En: Rauscher M y Johnsen K (Eds.) Southern forest science: past, present and future, Gen. Tech. Rep. GTR-SRS-75. Asheville, NC, pp 395
- Gutiérrez-Yurrita PJ (2004) Análisis de la legislatura mexicana en materia de impacto ambiental. *Scientiae Naturae* 7(1):5–25
- He J y Lee SK (1998) Growth and photosynthetic responses of three aeroponically grown lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.) to different root zone temperatures and growth irradiances under tropical aerial conditions. *J Hortic Sci Biotech* 73:173–180
- Hernández MMM y Sánchez ME (2002) Informe de una nueva localidad de *M. mathildae* y una propuesta para modificar su categoría legal de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47(1):4–10
- Hernández-Oria JG, Chávez R, Galindo M, Hernández G, Lagunas M, Martínez S, Mendoza R, Sánchez A y Sánchez M (2003) Evaluación de aspectos ecológicos de una nueva población de *Mammillaria mathildae* Kraehenbuehl & Krainz en Querétaro. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47:4–10
- Hilty JA, Lidicker Jr. WZ y Merenlender AM (2006) *Corridor Ecology*. Island Press. pp 324

- Ibaraki Y y Gupta SD (2006) Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Netherlands. pp 480
- Illoldi-Rangel P, Sánchez-Cordero V, Peterson AT (2004) Predicting distributions of Mexican mammals using ecological niche modeling. *J Mammal* 85:658–662
- Irfan-Ullah M, Amarnath G, Murthy MSR y Peterson AT (2007) Mapping the geographic distribution of *Aglaia bourdillonii* Gamble (Meliaceae), an endemic and threatened plant, using ecological niche modeling. *Biodivers Conserv* 16:1917–1925
- Jayachandran K y Shetty KG (2003) Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquatic Bot* 76:281–290
- Joyce L, Haynes R, White R, y Barbour J (2005) Bringing Climate Change into Natural Resource Management. Proceedings of a Workshop. USDA. pp 150
- Justiniano MJ y Fredericksen TS (2000) Phenology of tree species in Bolivian dry season. *Biotropica* 32:276–281
- Kalnay E y Cai M (2003) Impact of urbanization and land use change on climate. *Nature* 423:528–531
- Kate K y Laird SA (1999) The commercial use of biodiversity. Earthscan Publications Ltd., London. pp 398
- Kay CC y Lee SK (1995) Nutrient content in vegetables grown in soil and soilless systems. *ASEAN Food J* 10:1–5
- Kiers ET, Lovelock CE, Krueger EL y Herre EA (2000) Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecol Lett* 3:106–113
- Koch AM, Croll D y Sanders IR (2006) Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecol Lett* 9:103–110
- Koide RT y Kabir Z (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol* 148:511–517

- Koide RT y Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145–163
- Kräehenbuehl F y Krainz H (1973) *Mammillaria mathildae* Kräehenbuehl et Krainz spec. Nov. *Kakteen Sukk* 24(12):265–266
- Kratsch HA, Graves WR y Gladon RJ (2006) Aeroponic system for control of root-zone atmosphere. *Environ Exp Bot* 55:70–76.
- Lawlor DW (2005) Plant responses to climate change: Impacts and adaptation. En: Omasa K, Nouchi I y De Kok LJ (Eds.) *Plant Responses to Air Pollution and Global Change*. Springer-Verlag, Tokio. pp 300
- Leberg PL (1993) Strategies for population reintroduction: effects of genetic variability on population growth and size. *Conserv. Biol.* 7:194-199
- Leirana-Alcocer J y Parra-Tabla V (1999) Factors affecting the distribution, abundance and seedling survival of *Mammillaria gaumeri*, an endemic cactus of coastal Yucatán, México. *J Arid Environ* 41:421–428
- Lennartsson T y Oostermeijer GB (2001) Demographic variation and population viability in *Gentlanella campestris*: effects of grassland management and environmental stochasticity. *J. Ecol.* 89:451-463
- Lim BK, Peterson AT y Engstrom MD (2002). Robustness of ecological niche modeling algorithms for mammals in Guyana. *Biodivers Conserv* 11:1237–1246.
- Linares E, Dávila P, Chiang F, Bye R y Elias T (1995) Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. UNAM, México. pp 175
- Liu R y Wang F (2003) Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 13:123–127
- López GC, Gutiérrez GC y Pineda LR (2006) Áreas Prioritarias para la Conservación en el Estado de Querétaro. Manuscrito preparado para la Secretaría de Desarrollo Sustentable del Gobierno del Estado de Querétaro.
- Machado MFPS y Prioli AJ (1996) Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cell Dev Biol PI* 32:199–203

- Maestre FT (2006) Linking the spatial patterns of organisms and abiotic factors to ecosystem function and management: Insights from semi-arid environments. *Web Ecology* 6:75-87
- Maestre FT y Cortina J (2002) Spatial patterns of surface soil properties and vegetation in a Mediterranean semi-arid steppe. *Plant Soil*. 241:279-291
- Malda G, Suzan H y Backhaus R (1999) *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci Hortic* 81:71–87
- Martínez J y Fernández B (2004) Cambio Climático: una visión desde México. SEMARNAT – INE. pp 363.
- Martínez M y Hernández SL (2007) Una nueva especie de *Chaunanthus* (Cruciferae) endémica de Querétaro, México. *Acta Bot Mex* 81:1–7
- Martínez-Vázquez O y Rubluo A (1989) *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada. *J Hortic Sci* 64:99–105
- Martin-Laurent F, Lee SK, Tham FY, HeJ y Diem HG (1999) Aeroponic production of *Acacia mangium* saplings inoculated with AM fungi for reforestation in the tropics. *Forest Ecol Manag* 122:199–207
- Mata-Rosas M, Monroy de la Rosa MA, Moebius-Goldammer K y Chávez-Avila VM (2001) Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Dev Biol P* 37:400–404
- Matthies D, Braüer I, Maibom W y Tschardt T (2004) Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105:481–488
- Matsubara Y, Ogura Y, Watanabe T y Harada T (1998) Arbuscular mycorrhizal fungus infection enhances acclimation of *Asparagus* plantlets derived from tissue culture. *Acta Horticult (ISHS)* 513:221–228
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M y Chávez-Avila VM (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Dev Biol PI* 39:388–393

- Mohamed-Yasseen Y (2002) Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). In Vitro Cell Dev Biol PI 38:427–429
- Molitor HD, Fischer M y Popadopoulos AP (1999) Effect of several parameters on the growth of chrysanthemum stock plants in aeroponics. Volume I. Acta Horticulturae 481:179–186
- Mullen RB y Schmidt SK (1993) Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adoneus*: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. Oecologia 94:229–234
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S y Jakobsen I (2004) High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 164:357–364
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol Plant 15:473–479
- Muthukumar T, Udaiyan K y Shanmughavel P (2004) Mycorrhiza in sedges—an overview. Mycorrhiza 14:65–77
- Nantel P, Gagnon D y Nault A (1996) Population viability analysis of American ginseng and wild leek harvested in stochastic environments. Conserv. Biol. 10:608-621
- Namdeo AG, Mahadik RR y Kadam SS (2006) Cost effective medium for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. Pharmacognosy Mag 2(8):227–231
- Neal CR (2000) Issues involved in a Martian sample return: preservation and the curation and analysis planning team for extraterrestrial materials (CAPTEM) position. J Geophys Res 105(22):22487-22506
- O'Brien SJ (1994) Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. Annu. Rev. Gen. 28:467-489
- O'Connor PJ, Smith EH y Smith AF (2002) Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community in a semiarid herbland. New Phytol 154:209–218
- Padilla IMG, Carmona E, Westendorp N y Encina CL (2006) Micropropagation and effects of mycorrhiza and soil bacteria on acclimatization and

- development of *Lucuma* (*Pouteria lucuma* R. and Pav.) Var. *La molina*. In *Vitro Cell Dev Biol PI* 42:193–196
- Palomino G, Dolezel J, Cid R, Brunner I, Méndez I y Rubluo A (1999) Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. *Plant Sci* 141:191–200
- Papafotiou M, Balostis GN, Louka PT, Chronopoulos J (2001) *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tiss Org Cult* 65:163–167
- Park HS, Chiang MH y Park HS (1997) Effects of form and concentration of nitrogen in aeroponic solution on growth, chlorophyll, nitrogen contents and enzyme activities in *Cucumis sativum* L. plant. *J Korean Soc Hort Sci* 38:642–646
- Parmesan C y Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421:37–42
- Pavlik BM (1996) Defining and measurement success. En: Falk DA, Millar CI y Olwell M (Eds.) *Restoring Diversity: Strategies for Reintroduction of Endangered Plants*. Island Press, Washington DC. pp 528
- Pérez-Molphe-Balch E y Dávila-Figueroa C A (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). In *Vitro Cell Dev Biol PI* 38:73–78
- Perry JN (1995) Spatial analysis by distance indices. *J Anim Ecol* 64:303–314.
- Perry JN, Winder L, Holland JM y Alston RD (1999) Red-blue plots for detecting clusters in count data. *Ecology Letters* 2:106–113.
- Perry JN y Dixon P (2002) A new method for measuring spatial association in ecological count data. *Ecoscience* 9:133–141.
- Peterson AT, Ball LG y Cohoon KP (2002) Predicting distributions of Mexican birds using ecological niche modelling methods. *Ibis* 144: 27–32
- Pilbeam J (1999) *Mammillaria*. The cactus file. Handbook 6. Nuffield Press, Oxford UK. pp 376

- PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ (2008) Perspectivas del medio ambiente urbano: GEO zona metropolitana Querétaro. PNUMA, SEDESU, CONCYTEQ, Querétaro, México. pp 155.
- Podwyszyńska M (2005) Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. *J Fruit Ornament Plant Res* 13:109–122
- Poljuha D, Balen B, Bauer A, Ljubešić N y Krsnik-Rasol M (2003) Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 75:117–123
- Rai MK (2001) Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cell Develop Biol P* 37:158–167
- Ramírez-Malagón R, Aguilar-Ramírez I, Borodanenko A, Pérez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG y Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol PI* 43:660–665
- Reed DH, O'Grady JJ, Brook BW, Ballou JD y Frankham R (2003) Estimates of minimum viable population sizes for vertebrates and factors influencing those estimates. *Biol. Conserv.* 113:23–34
- Rillig MC y Steinberg PD (2002) Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol Biochem* 34:1371–1374
- Rincón E, Huante P y Ramírez Y (1993) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*. *Mycorrhiza* 3:79–81
- Ritter E, Angulo B, Riga P, Herran C, Relloso J y San José M (2001) Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Res* 44:127–135
- Robles G P, Dirzo R y Raven P H (1996) Mexican Diversity of Flora. 2da Ed. CEMEX, Japón. pp 191
- Rojas-Aréchiga M y Vázquez-Yanes C (2000) Cactus seed germination: a review. *J Arid Environ* 44:85–104



- Ross C (2004) Native seed collection and use in arid land reclamation: A low-tech approach. *Environ Monit Assess* 99:1–3
- Rout GR, Das P, Goel S y Raina SN (1998) Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot Bull Acad Sinica* 39:23–27
- Rubluo A, Chavez V, Martínez AP, Martínez-Vazquez O (1993) Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol Conserv* 63:163–169
- Rudgers JA, Koslow JM y Clay K (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecol Lett* 7:42–51
- Sánchez E y Galindo G (1989) Estado de conservación de las cactáceas queretanas. Reporte para la Dirección de Conservación Ecológica de los Recursos Naturales. 5 pp
- Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Pulido H y Rodríguez-Garay B (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56:163–167
- Santos-Díaz MS, Méndez-Ontiveros R, Arredondo-Gómez A y Santos-Díaz ML (2003) *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol P* 39:480–484
- Scagel CF y Schreiner RP (2006) Phosphorus supply alters tuber composition, flower production, and mycorrhizal responsiveness of container-grown hybrid *Zantedeschia*. *Plant Soil* 283:323–337
- Schwartz MD (1999) Advancing to full bloom: planning phenological research for the 21st century. *Int J Biometeorol* 42:113–118
- Schwartz MW, Hoeksema JD, Gehring CA, Johnson NC, Klironomos JN, Abbott LK y Pringle A (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecol Lett* 9:501–515
- Scoggins HL y Mills HA (1998) Poinsettia growth, tissue nutrient concentration, and nutrient up take as influenced by nitrogen form and stage of growth. *J Plant Nutr* 21:191–198

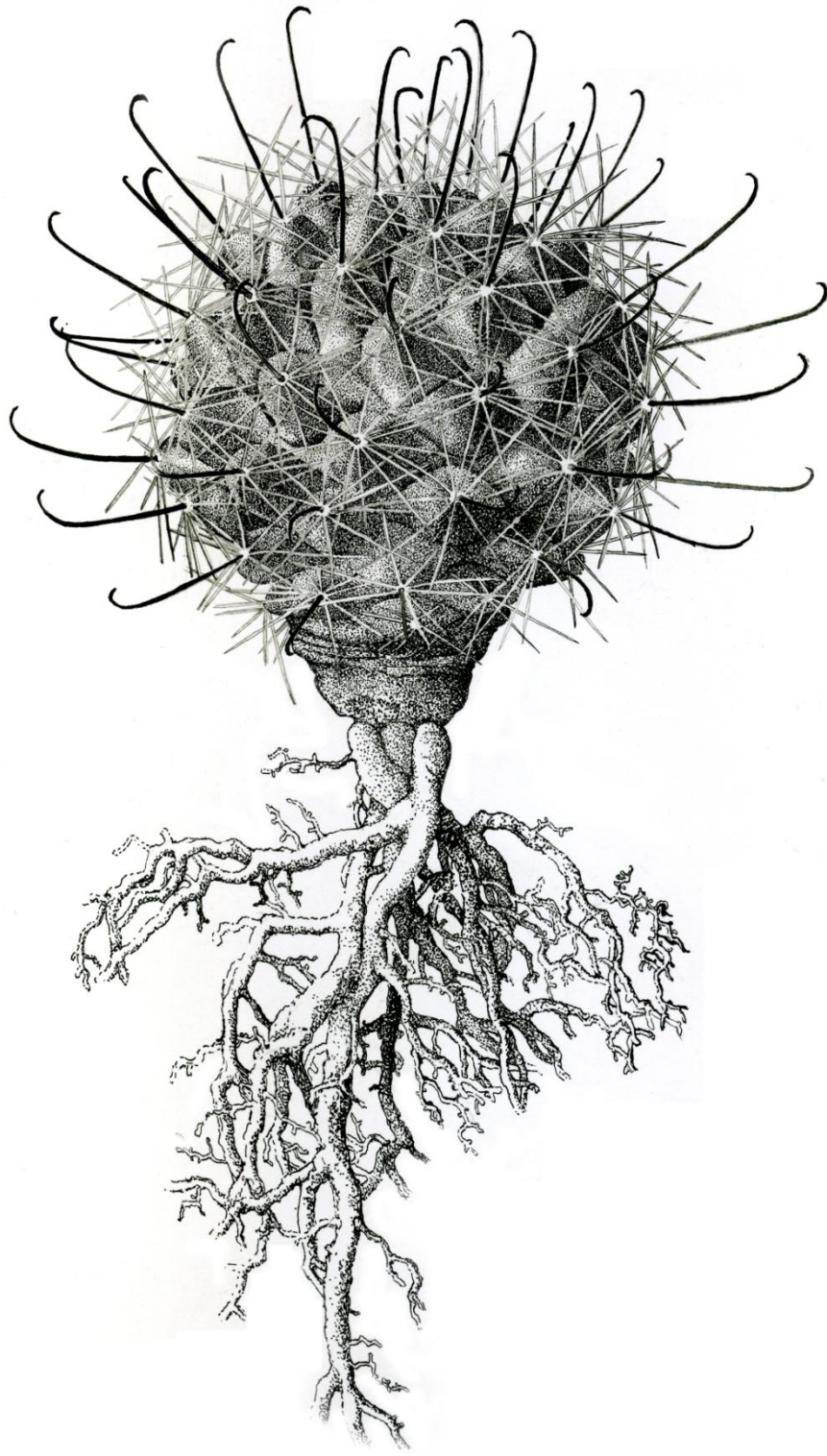
- Selosse MA, Baudoin E y Vandenkoornhuyse P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C. R. Biologies* 327:639–648
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo de 2002, Primera sección, México, D. F.
- Shepherd T y Griffiths WD (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171:469–499
- Sivinski RC y McDonald C (2007) Knowlton's cactus (*Pediocactus knowltonii*): eighteen years of monitoring and recovery actions. En: Barlow-Irick P, Anderson J, McDonald C, (eds.) Southwestern rare and endangered plants: Proceedings of the Fourth Conference; March 22-26, 2004; Las Cruces, New Mexico. Proceedings. RMRS-P-48CD. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station 98–107
- Solano E y Feria PT (2007) Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status. *Biodivers Conserv* (2007) 16:1885–1900
- Soulé ME (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. En: Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective. Soulé ME y Wilcox BA (Eds.). Sinauer, Massachusetts. U.S.A.
- Sriskandarajah S, Prensén E, Motyka V, Dobrev PI y Serek M (2006) Regenerative capacity of cacti *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones, cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities. *J Plant Growth Regul* 25:79–88

- Stiling P, Rossi A y Gordon D (2000) The difficulties of single factor thinking in restoration: replanting a rare cactus in the Florida Keys. *Biol Conserv* 94:327–333
- Stockwell DRB y Noble IR (1992) Induction of sets of rules from animal distribution data: a robust and informative method of data analysis. *Math Comput Simulat* 33:385–390
- Stockwell DRB y Peters D (1999) The GARP modeling system: problems and solutions to automated spatial prediction. *Int J Geogr Inf Sci* 13:143–158
- Sudharsan C, AboEl-Nil M y Hussain J (2003) Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *J Arid Environ* 54:133–147
- Suzán-Azpiri H y Sosa VJ (2006) Comparative performance of the giant cardon cactus (*Pachycereus pringlei*) seedlings under two leguminous nurse plant species. *J Arid Environ* 65(3):351–362.
- Sylvia D M y Hubbell D H (1986) Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1:259–267
- Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel PG y Zuberer D (2003) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey, USA. pp 640
- Taiz L y Zeiger E (2006) Plant Physiology. 4ta ed. Sunderland, MA pp 690
- Tian CY, Feng G, Li XL y Zhang FS (2004) Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Appl Soil Ecol* 26:143–148
- Trenberth KE, Dai A, Rasmussen RM y Parsons DB (2003) The changing character of precipitation. *B Am Meteorol Soc* 84:1205–1217
- Uei-Chern Ch, Chi-Ni H, Mau-Shing Y, Dinesh ChA y Hsin-Sheng T (2006) *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi* an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cell Develop Biol P* 42:128–133
- Valenzuela-Sánchez KK, Juárez-Hernández RE, Cruz-Hernández A, Olalde-Portugal V, Valverde ME y Paredes-López O (2006) Plant regeneration of

- Agave tequilana* by indirect organogenesis. In Vitro Cell Dev Biol PI 42:336–340
- van der Heijden MGA (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. Ecol Lett 7:293–303
- Venkatachalam L, Sreedhar RV y Bhagyalakshmi N (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. Electron J Biotechnol 10:106–113
- Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, Weekers F, Kevers C, Thonart P, Lemoine MC, Cordier C, Alabouvette C y Gianinazzi S (2004) Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. Appl Soil Ecol 27:243–258
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U y Piché Y (1998) Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. Appl Environ Microb 64:5004–5007
- Viswambharan S, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G y Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. In Vitro Cell Dev Biol PI 42:206–214
- Vite GF y Zavala HJA (1997) Estatus ecológico de *Mammillaria pectinifera* Weber y *Mitrocereus fulviceps* Weber en el Valle de Zapotitlán, Puebla. Informe final. Convenio No: FB217/GO22/95.
- Wakhlu AK y Bhau SB (2000) Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. In Vitro Cell Dev Biol PI 36:211–214
- Weathers PJ y Zobel RW (1992) Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. Biotechnol Adv 10:93–115
- Weber J, Ducouso M, Tham FY, Nourissier-Mountou S, Galiana A, Prin Y y Lee SK (2005) Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. in aeroponic culture. Biol Fert Soils 41:233–239
- Weiss JL y Overpeck JT (2005) Is the Sonoran Desert losing its cool? Global Change Biol 11:2065–2077

- Welles JM (1990) Some indirect methods of estimating canopy structure. *Remote Sens Rev* 5:31–43
- Xionglin L, Xiaoming Y, Ningning W, Qizhi F, Zhenying D, Lixia L, Jinglin S y Bao L (2007) Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:153–168
- Yong W, Chong K, Xu Z, Tan K y Zhu Z (2000) Gene control of flowering time in higher plants. *Chinese Sci Bull* 45(1):1–8
- Young A, Boyle T y Brown T (1996) The populations genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11(10):413-418
- Zamudio RS, Rzedowski J, Carranza GE y Calderon de Rzedowski G (1992) La vegetación del Estado de Querétaro. CONCYTEQ, Querétaro México. pp 92
- Zandavalli RB, Dillenburg LR y de Souza PV (2004) Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum* *App Soil Ecol* 25:245–255
- Zúñiga B, Malda G y Suzán H (2005) Interacciones planta-nodrizza en *Lophophora diffusa* (Cactaceae) en un desierto subtropical de México. *Biotrópica* 37:351–356

## IX. PUBLICACIONES



## **ARTÍCULO I**

### **Predicted and confirmed distributions of the endangered endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) using niche prediction and spatial analysis**

García-Rubio, Oscar (✉), Suzán-Azpiri, Humberto & Malda-Barrera, Guadalupe. Laboratorio de Ecología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Boulevard de las Ciencias S/N, Juriquilla Querétaro 76230, México. E-mail addresses: [osrigaru@gmail.com](mailto:osrigaru@gmail.com).

#### **ABSTRACT**

*Mammillaria mathildae* is a small, cryptic, endemic cactus with a distribution restricted to only two localities in central Mexico, maintaining only 200 known individuals. It is considered an endangered species due to its restricted population sizes and their vulnerability to urbanization. The goal of our research was to detect non reported *M. mathildae* populations in the vicinity of the reported ones, and to develop a conservation strategy to maintain viable metapopulations of the species. Using spatial analysis by distance indices (SADIE) and genetic algorithm for rule set production (GARP) modeling system, locations of new populations were predicted, and six of such new possible populations were confirmed in the field (two inside of El Cimatario National Park). Spatial analysis improved the process of locating new populations of *M. mathildae*, because their location was indirectly detected by screening of spatially associated species such as *Lysiloma microphylla* and *Bursera fagaroides*. All new detected populations are considered also under threat by anthropogenic activities, although only three populations exist in protected areas: in a natural protected area in Cañada de Juriquilla and two new discovered populations located at the Cimatario National Park.

**Key words:** Cacti, GARP, Model validation, SADIE

## INTRODUCTION

*Mammillaria mathildae* is a microendemic cactus from the state of Queretaro, México, confined only to two previously reported low density populations near Queretaro City. The type population, located near the town of La Cañada, has only 76 individuals and is seriously threatened by uncontrolled sandstone mining. The second population, located in Juriquilla Queretaro, was reported to have 209 individuals in 2003 (Hernández-Oria et al., 2003); but by 2007 this population was reduced to only 133 plants (García and Malda, 2010). Fortunately, the region in which this population grows has become a natural protected area purchased by an environmental agency (FIQMA, Fideicomiso Queretano para el Medio Ambiente). Because of its vulnerability and habitat loss due to the proximity of the few remaining populations to urban areas, this cactus is listed as endangered (SEMARNAT, 2002).

Urbanization has become the major driving force of land use and cover change in the world (Kalnay and Cai, 2003; Behnke, 2008). Queretaro is now one of the fastest growing cities in México, with an urban area growing rate of 12.5% (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008). The urban area of Queretaro city covered approximately 15,544.2 ha in 2008, extending from 100° 20' and 100° 30' W to 20° 30' and 20° 45' N. The human population increased from 816,481 in 2000 to 1,058,210 in 2009. Land use has changed dramatically in the last decade. A large amount of natural areas and agricultural land has been transformed into urban environments. The removal of almost one third of the original tropical deciduous forest (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008) has decreased and fragmented the natural habitat of *M. mathildae*; which is now considered a critically endangered species, and immediate actions to preserve and conserve this species are a priority.

Recognition of the accurate distribution of a species is crucial for management and conservation efforts (Costanza and Voinov, 2004). Usually, management decisions are based on crude range maps, using polygons that enclose known occurrences generated from records of flora and fauna collections, scientific documentation, and informal reports (Solano and Feria,



2007). These maps have shown an enormous inaccuracy and can rarely be extended to remote and poorly known locations, where the absence of records is common (Peterson et al., 2002a). The development of detailed, fine scale and validated maps is preponderant to improve management decision procedures. In recent years, the development of mathematical models to predict areas of occurrence has supported these decisions. Ecological niche modeling (ENM) uses a variety of mathematical models to assess the current and potential distribution of species, and has been increasingly used in conservation assessment and planning (Anderson and Martínez-Meyer, 2004; Domínguez-Domínguez et al., 2006; Irfan-Ullah et al., 2007). An ENM approach, as implemented in the genetic algorithm for rule-set prediction (GARP) (Stockwell and Noble, 1992; Stockwell and Peters, 1999) takes into account geographic features, historical effects, climatic differences, habitat types and biological sampling bias. Construction of a robust algorithm considering those distinctions, has been implemented to successfully predict the distribution of a variety of animal (Lim et al., 2002; Peterson et al., 2002b; Iloldi-Rangel et al., 2004; Domínguez-Domínguez et al., 2006) and plant species (Soberón et al., 2001; Irfan-Ullah et al., 2007; Solano and Feria, 2007).

In recent times, distribution models have greatly aid in predicting and locating the distribution of endangered species. However, once a niche prediction map is completed, it is necessary to confirm the predictive accuracy of the model. Field surveys to compile data to achieve ENM validation often require intense labor and are expensive to be conducted over a broad landscape. Additionally, inconspicuous species in a habitat with a low population density represent a challenge that could be diminished if we know the spatial association of the target species with a conspicuous species. For such assignment, the “Spatial Analysis by Distance IndicEs” or SADIE provides a means to measure overall spatial patterns for a single set of data (Perry, 1995) and spatial association for two sets of data (Perry and Dixon, 2002).

Our first research objective was to obtain a potential distribution map for *M. mathildae* in order to locate other populations around Queretaro City and emit

a recommendation to create new natural protected areas. As a second objective, we used SADIE to determine the spatial associations of *M. mathildae* with other plants, specially shrubs and trees. Since this cactus is a small, cryptic and inconspicuous plant, it is very difficult to locate in field, we hypothesize that *M. mathildae* is positively associated with specific nurse trees and, by locating patches composed of nurse trees it is possible to reduce human invested efforts in finding the populations of *M. mathildae* in field.

## **METHODS**

### **Study area**

Queretaro City is found in two physiographic provinces, 1) the Neovolcanic axis, sub-province of Queretaro and Hidalgo; and, 2) the Central Plateau, which includes the counties of Queretaro and El Marques. This province is composed of Tertiary and Quaternary volcanic rocks (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008). The topography consists of extended plateaus intercepted by smooth hills. Around Queretaro City, remnant forest persist principally xerophilous shrub and deciduous tropical forest.

*Mammillaria mathildae* grows in low stature tropical deciduous forests which are generally dominated by *Bursera fagaroides*, *Cedrela dugesii*, *Ceiba aesculifolia*, *Prosopis laevigata*, *Ipomea murucoides*, *Lysiloma microphylla* and *Senna polyantha*. These trees reach 3 to 7 m high, are leafless for periods of 6 to 7 months (dry season). The presence of other cacti, including *Mammillaria magnimamma*, *M. polythele*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Opuntia pubescens*, *Peniocereus serpentinus* and *Stenocereus dumortierii* is also important. During the rainy season, abundant shrubs considerably increase their foliage (e.g. *Anisacanthus quadrifidus*, *Calliandra eriophylla*, *Cardiospermum halicacabum*, *Ipomoea purpurea*, *Karwinskia humboldtiana* and *Jatropha dioica*). Soil is scarce with good drainage, and the area is composed of igneous rocks (Baltazar et al., 2004).

## **Plant distribution**

Records for *Mammillaria mathildae* were accomplished by surveys in two known populations during early May 2007, when the rainy season began. The population type registered in “La Cañada” with an extension of 7 ha, is located west of the city, in the county of El Marqués. The “Juriquilla” population is distributed in an area of 5 ha, located north of Querétaro City at the Cañada de Juriquilla, in the province of Juriquilla (County of Querétaro), at 1890 m altitude. It encloses the largest registered population of *M. mathildae* with 133 individuals in 2007 (García and Malda, 2010).

## **Modeling potential distribution of *M. mathildae***

To construct the potential distribution map of *M. mathildae*, we used the genetic algorithm for rule set prediction (GARP) system (public desktop version is available on: <http://nhm/ku.edu/desktopgarp/>). A full description of the process can be consulted in Stockwell and Noble (1992) and Stockwell and Peters (1999). A GARP map was built using records from the known populations. Visits to each single population were made to obtain geographical data set. In order to generate the models, we used 18 layers including topographic data that were obtained from the U.S. Geological Survey (<http://lpdaac.usgs.gov/gtopp30/hydro/>); and an elevation, slope and topographic index. Climate layers were obtained from the WorldClim data set (<http://biogeو.berkeley.edu./worldclim/worldclim.htm>); which includes isothermality, mean diurnal range, mean annual temperature, temperature seasonality, minimum and maximum temperature of the warmest month, mean temperature of the wettest quarter, mean temperature of the driest quarter, mean temperature of the warmest quarter, mean temperature of the coldest quarter, precipitation seasonality, precipitation of the wettest quarter, precipitation of the driest quarter, precipitation of the warmest quarter, precipitation of the coldest quarter. Both data sets have a grain resolution of 0.01°.

We used 100 GARP models to obtain a representative distribution of *M. mathildae* map. According to Anderson et al. (2003) recommendations, the 10 best models showing less than 20% omission errors were selected (predicting

areas where plant is absent when it actually is found there). Subsequently, maps were ranked by their commission error (prediction of species presence when actually is absent). This method gave the smallest commission and omission errors. Selected models were saved in an ASCII raster grid format and imported into GIS ArcView v. 3.2 (ESRI, 2000). The maps were overlaid together using the function “map calculator”, to produce a consensus map representing the predicted distribution of *M. mathildae*.

### **Spatial analysis**

SADIE was used to obtain the association index between *M. mathildae* and neighboring flora. Using this program an aggregation index ( $I_a$ ) and the spatial association index of two populations ( $X$ , Greek chi) were calculated, and tested for aggregates or random distribution. Data show aggregated distribution if  $I_a > 1$ , regular distribution with an  $I_a < 1$ , and random arrangement if  $I_a \approx 1$ . Species may be spatially dissociated when  $X < 0$ , associated if  $X > 0$ ; or present a random placement when  $X = 1$  (Perry et al., 1999; Perry and Dixon, 2002). SADIE works on an algorithm in which the observed data are iteratively arranged until they achieve a regular display ( $D$ ); and compares spatial arrangements of the observed samples with other arrangements derived from samples. Additionally, SADIE provides spatially explicit visual information about the nature of the species arrangement (Perry and Dixon, 2002).

Data were registered in three plots (located in the main aggregation area of *M. mathildae*) of 100 m<sup>2</sup> divided in a grid of 1m<sup>2</sup> sub-plots; where the position of each individual species was mapped in two dimensions. Spatial analysis for *M. mathildae* and associated flora (dominant species) was performed with SADIEShell 1.22 software (<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/pie/sadie/>), running 75 simulations and 26,108 permutations. Maps were constructed using Surfer 8.0 (Golden Software Inc., Colorado, USA).

### ***M. mathildae* surveys**

In order to validate GARP model, several surveys in Queretaro City and their periphery on public and private owned lands were conducted, where the niche prediction model indicated a high probability of *M. mathildae* presence. *M.*

*mathildae* location in field was performed searching for patches of trees strongly associated with the cactus (*L. microphylla* and *B. fagaroides*) which also were growing near to uplifted rocks.

### **Determination of leaf area indices (LAI) and superficial temperature**

Characterization of the study area was assessed by its microclimatic conditions. Solar radiation was determined as total photosynthetic photon flux (PPF), expressed as  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , using a quantum sensor (LICOR model LI250). Leaf area indices (LAI) were obtained by the contrast of two sensors measurements: one located beneath open sky, and the second one beneath the canopy (by triplicate measurements) of each individual, using the software LAI-2000 File Viewer 1.0 (Welles, 1990). For each associated tree species (*Lysiloma microphylla*, *Bursera fagaroides* and *Ceiba aesculifolia*), three individuals were randomly selected to obtain LAI measurements, avoiding direct solar illumination before sunrise on the LICOR sensors.

Soil superficial temperature was determined with an infrared temperature sensor (Tel-Tru 05025) for ten points beneath the shade of specimens for each positively associated tree species, with similar size and canopy structure. Six additional determinations were made in bare soil.

## **RESULTS**

### **Potential distribution**

Modeling of the potential niche of *M. mathildae* encompassed an area of approximately 207,036 ha. Consensus map obtained with GARP indicated that the areas with the highest probability to host the cactus were distributed in the small step valleys on the outskirts of urban areas of Queretaro, in relicts of tropical deciduous forest (Fig. 1). The model predicted a high probability of finding *M. mathildae* in the eastern side of the city, in a half moon shape region from Cañada de Juriquilla, in the NE, to Cañada de la Plata, in the SE (Fig. 1).

### ***M. mathildae* spatial analysis and environmental measurements**

SADIE determined the spatial distribution of *M. mathildae* and other components of local flora; as well as, established associations and dissociations

with trees, shrubs, and other cacti in the same area. *M. mathildae* presented an aggregated distribution. Likewise, the other plants had the same spatial arrangement except for *M. geometrizzans*, that showed a regular arrangement. Additionally,  $V_i$  values for *L. microphylla* and *P. laevigata* indicate their strong tendency to form patches (Table 1). Maps of local association (Fig. 2a-c) clearly show the patches formed by *M. mathildae*, *L. microphylla* and *P. laevigata* respectively in the study area.

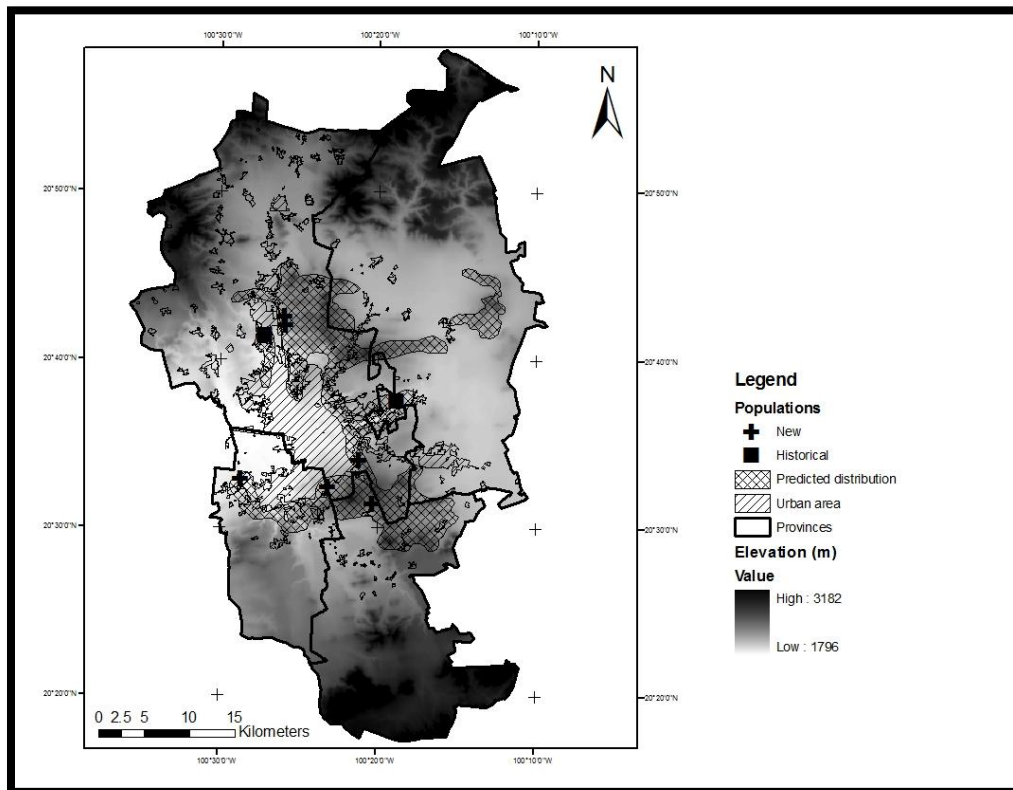


Figure 1. Map of the predicted distribution for *M. mathildae* around Queretaro City urban area. *Squares*, historical records for *M. mathildae*; *crosses*, presence of the cactus verified in the field. The provinces of Queretaro City are: 1, Queretaro; 2, El Marques; 3, Corregidora; 4, Huimilpan.

*M. mathildae* and adjacent vegetation SADIE analyses were performed in 3 plots inside the study area. The species is significantly associated with *L. microphylla*, *B. fagaroides*, and *J. dioica*. Its association with *C. aesculifolia*, *M.*

*geometrisans* and *O. pubescens* was positive, but not significantly. Trees associated with *M. mathildae* registered LAI values between 2.68 and 3.36 units (Table 1) In contrast, SADIE demonstrated that *P. laevigata*, *S. polyantha* and *I. murucoides* are not associated with this cactus; these species presented LAI values out of the range presented by the species with positive association (LAI = 4.84, 1.42 and 1.39 respectively). The shrub *A. quadrifidus* is also strongly dissociated with *M. mathildae*. Figures 3a and 3b show the areas where *M. mathildae* is associated to *L. microphylla*, and is dissociated from *P. laevigata* respectively.

The superficial temperature analysis indicates no differences under the canopy of trees associated to *M. mathildae* ( $F=0.3053$ ,  $P(F)< 0.7394$ ,  $n=30$  ). In contrast, adjacent bare areas presented an increment of 14°C higher than beneath canopy areas ( $F=1664.414$ ,  $P(F)< 0.0001$ ,  $n=36$ ).

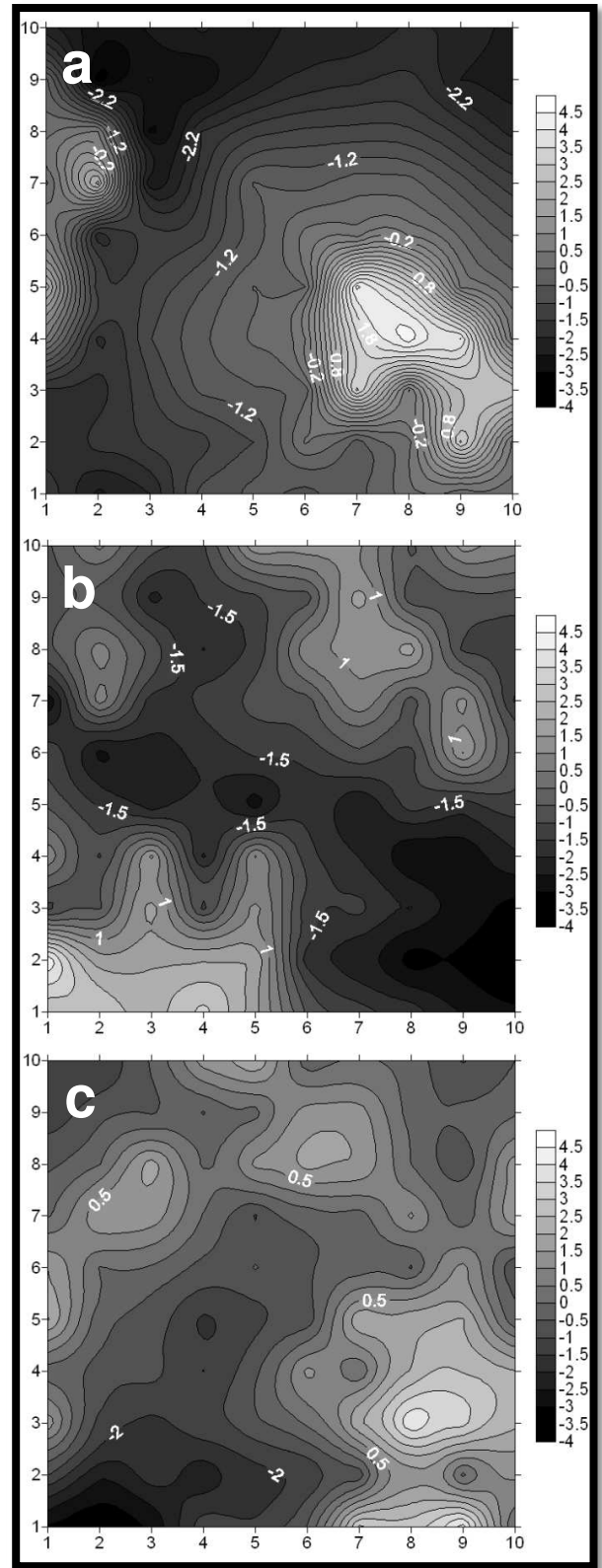


Figure 2. Contour SADIE index maps of clustering for a) *M. mathildae*, b) *P. laevigata* and c) *L. microphylla*.

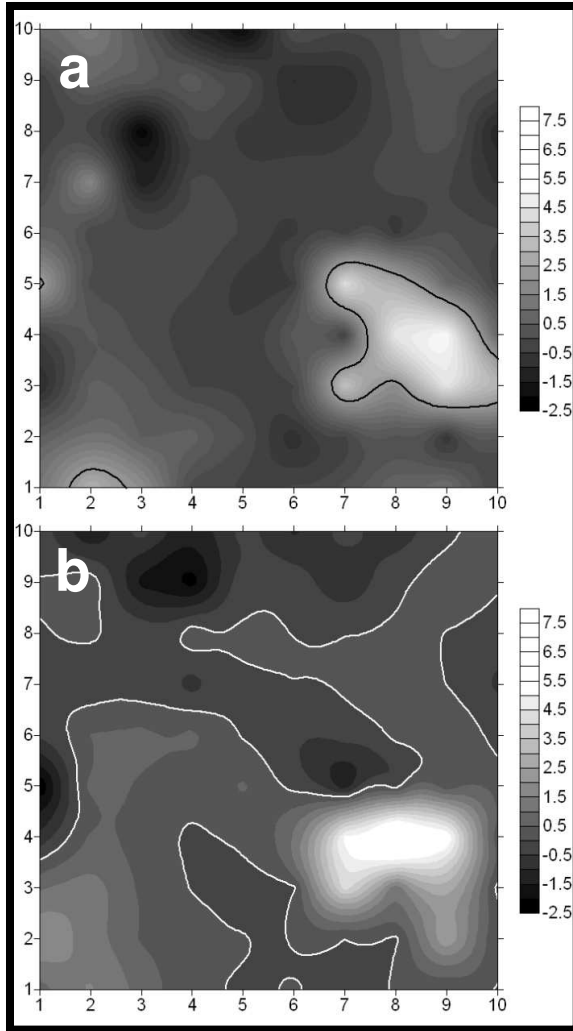


Figure 3. SADIE association index maps for *M. mathildae* with a) *L. microphylla* and b) *P. Laevigata*. White patches represent areas with positive association; black patches indicate areas with negative association. Significant positive or negative association areas are included within a solid line (black and white respectively).

### Field verification

The two previously reported populations (Kräehenbuehl and Krainz, 1973; Hernández and Sánchez, 2002) are shown in figure 1. Theoretical location of new populations, derived from GARP modeling systems and field surveying of the plant species associated to *M. mathildae* (*L. microphylla*, *B. fagaroides*, and *J. dioica*, was successfully confirmed *in situ* where six non-reported populations were detected; two in Cerro Colorado, two in Cerro del Cimatario, one in Cañada de la Plata, and one in Cerro del Tangano (Fig. 1). Exact localities are not disclosed because this cactus species is subject to illegal extraction. All populations were found in tropical deciduous forest. Only two new populations founded in Parque Nacional Cerro del Cimatario and the previously described in Cañada de Juriquilla are located in natural protected areas.



Table 1. Mean leaf area index (LAI), aggregation index ( $I_a$ ) of vegetation dominant species to *M. mathildae*, and association index (X) between *M. mathildae* and dominant flora.

Species	LAI*	$I_a$	$V_i$ , P( $V_i$ )	$V_j$ , P( $V_j$ )	X		
					Plot 1	Plot 2	Plot 3
<i>Lysiloma microphylla</i>	3.36	1.655	1.532 P =0.0000	-1.676 P =0.0000	0.2611 P =0.0100	0.5203 P = 0.0001	0.0818 P = 0.0105
<i>Bursera fagaroides</i>	2.68	1.628	1.464 P =0.0128	-1.628 P =0.0000	0.3258 P =0.0136	0.3689 P =0.0050	0.0758 P =0.0101
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	2.98	0.868	0.881 P =0.8205	0.927 P =0.7051	0.2204 P =0.0483	0.1273 P =0.0589	0.1567 P =0.0678
<i>Ceiba aesculifolia</i>	3.04	1.053	1.059 P =0.3590	-1.047 P =0.3718	0.0818 P =0.2308	0.1439 P =0.1402	0.0801 P =0.1215
<i>Prosopis laevigata</i>	4.84	1.823	1.823 P =0.0000	-1.860 P =0.0000	-0.2431 P =0.8949	-0.3187 P =0.9999	–
<i>Senna polyantha</i>	1.42	1.677	1.779 P =0.0000	-1.692 P =0.0000	-0.3127 P =0.9876	–	–
<i>Ipomea murucoides</i>	1.39	1.356	1.315 P =0.0513	-1.384 P =0.0385	–	-0.2295 P =0.9763	-0.3154 P =0.9965
<i>Mammillaria mathildae</i>	–	1.509	1.493 P =0.0000	-1.505 P =0.0000	–	–	–
<i>Anisacanthus quadrifidus</i>	–	1.547	1.597 P =0.0000	-1.571 P =0.0000	–	-0.4106 P =0.9999	-0.3836 P =0.9999
<i>Jatropha dioica</i>	–	1.328	1.270 P =0.0513	-1.321 P =0.0385	0.4146 P =0.0001	0.3666 P =0.0008	0.4218 P =0.0001
<i>Opuntia pubescens</i>	–	1.189	1.065 P =0.2564	-1.206 P =0.0897	0.2534 P =0.0238	0.2194 P =0.0304	0.0620 P =0.3132

LAI= leaf area index. \*LAI values are the mean of at least 3 tree determinations.

$I_a$ = index of aggregation;  $V_i$ = mean index of clustering for patches;  $V_j$ = mean index of clustering for gaps. Values of  $V_i > 1.5$  indicate the presence of patches, and values of  $V_j < -1.5$  indicate gaps.

X= association index. P= two-tail test, with  $\alpha=0.05$ , the probability level should be less than 0.025 for significant association, or greater than 0.975 for significant dissociation.

## DISCUSSION

### Spatial distribution patterns of *M. mathildae* and nurse species

Rapid changes in landscapes lead us to determine biotic and abiotic relationships of *M. mathildae*. SADIE has demonstrated to be a strong tool for studying inter-species spatial biotic relationships (Perry et al., 1999; Perry and Dixon, 2002; Zuñiga et al., 2005); as well as biotic – abiotic relationships (Maestre and Cortina, 2002; Maestre, 2006).

*M. mathildae* is a small cryptic cactus (diameters smaller than seven cm) that is not capable of surviving in areas with direct sunlight. Therefore, the presence of a shaded canopy and well drained soils are indispensable factors for its germination and establishment (García and Malda, 2010). It is well documented that the formation of vegetation patches in arid and semiarid areas, as a result of shaded environments provided by trees and shrubs, facilitates nurse-plant interactions for sensitive species (Carrillo-García et al., 1999; Suzán-Azpiri and Sosa, 2006). Nurse system interactions promote an aggregated spatial arrangement of species forming vegetation patches and gaps (Zuñiga et al., 2005). In contrast, tropical deciduous forest exhibited a canopy cover without clear gaps, but with a shading pattern that can drastically vary, leading to the aggregate spatial distribution of the sensitive species.

In the study area, all species with the exception of *M. geometrizzans* presented an aggregated distribution. Each species in the forest have particular canopy architectures with shading patterns of varied intensity. For example, *P. laevigata* produced the most intense shading while *I. murucoides* generates a less profuse shading (determined as LAI= 4.84 and 1.39 respectively). Both shading pattern favored the establishment of *M. mathildae*, as shown by the association indexes of the cactus with both trees (Table 1). The aggregation map for *P. laevigata* showed a clear tendency of the species to form patches, under which no *M. mathildae* was found (Fig. 3B). The canopy architecture of *P. laevigata* allows small quantities of light to pass through, that could prevent the process of germination of *M. mathildae*. Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yanes

(2000) reported that several cactus seeds are positively photoblastic and require specific light quality to germinate. However, *L. microphylla* and *B. fagaroides* generated favorable microclimate for germination and establishment of *M. mathildae*, as shown by the positive association indexes registered between these species. This phenomenon is similar to the one described by Zúñiga et al. (2005) who report that intense shade does not favor the establishment of *Lophophora diffusa* (a cactus of a similar size to *M. mathildae*) while smaller canopy cover allowed its germination and establishment. *L. microphylla* and *B. fagaroides* possess a canopy architecture that buffers the temperature around 14°C, without significantly diminishing the active photosynthetic radiation; conditions that altogether could favor germination of *M. mathildae* seeds.

### **Modeling methods and field surveys**

Biological conservation requires the knowledge of distribution and preservation status of the target population. In rare species, this information can be difficult to obtain. Yet, niche prediction models have been proved to be an efficient technique to locate areas of endemic cactus such as *M. mathildae*. Consensus map obtained by GARP located the potential niche of *M. mathildae* in areas where the species actually exists, or had once existed, in the tropical deciduous forest that has been removed. Due to the small size of the study area, climatic conditions did not significantly vary. Therefore, the variables with the greatest influence for the construction of the model were topographic data. However, the factor “urbanization” was eliminated from the model, since areas with a high probability to find *M. mathildae* populations have recently been urbanized. Changes in land uses has been intense in the east side of the city, mainly in plateaus and small step valleys where the loss of natural areas reached a rate of 190 ha/year in 2006 (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008). As a consequence, a considerable part of the habitat where *M. mathildae* probably grew has been eradicated. However, natural areas of Queretaro City comprise around 29,205 ha, and although very fragmented, they still maintain sufficient habitat for the development of the cactus.

## **Model Validation**

In order to validate the obtained consensus map in situ, a series of surveys where the probability to find *M. mathildae* was high, were conducted. Several characteristics make it particularly difficult to find this species in the wild. Tropical deciduous forest is commonly established in steep slopes, with abundant and closed vegetation canopies. Besides, *M. mathildae* small dimensions make it hard to locate inside of this forest.

As mentioned, SADIE demonstrated that there are two tree species strongly associated with *M. mathildae*: *L. microphylla* and *B. fagaroides*. These tree species tend to aggregate forming clearly differentiated patches within the vegetation. During field surveys this characteristic was useful in locating significant patches of both trees that grew in visible uplift rocks, allowing us to ignore sites with high densities of not associated flora from *M. mathildae*. Following this procedure, location of cactus populations was highly efficient. For example, during the surveys conducted to find *M. mathildae* in Cañada de Juriquilla, 86 man hours were necessary to locate the plants, even when the geographic coordinates and habitat preferences of the species were known. In contrast, when the previously described methods were used in Cerro Colorado, Cimatario and Tángano areas, much less time was invested to find *M. mathildae* populations (8, 10, and 2 man hours, respectively).

## **Conservation implications**

We present here a protocol to develop a landscape conservation strategy based on an endemic species. This protocol integrates habitat information (analyzed by geographic information technology systems), and the relationships of the residing species. It is important to emphasize that the use of such tools, significantly reduces costs, since it allows covering large areas which could be very expensive to cover with a traditional approach.

Two of the new discovered populations of *M. mathildae* are located inside a National Park (El Cimatario), and the population from Cañada de Juriquilla is within a private conservation area. The remaining five populations are distributed along the eastern side of the city; which has been highly fragmented in the past

decades (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008) due to urbanization, rapid migration, changes in the land use with little or no planning and high poverty indexes. Finding *M. mathildae* populations along fragments of wild areas is of great relevance to provide solid arguments to prioritize conservation areas in Querétaro City natural areas. By adding these areas and the already protected ones, a biological corridor could be formed; with the purpose of restoring functional connectivity and minimizing habitat fragmentation processes. Today, these corridors are being promoted as an innovative way to encourage sustainable development as well as conservation (Hilty et al., 2006). It is important to point that acquisition of land areas for conservation has determined an increase in biota protection; so much, that it is a widely used option in conservation programs (Turner et al., 2006).

Generated data and maps can be directly applied to the conservation of *M. mathildae* in the eastern side of Queretaro City. Although fragmentation of the area is extensive, analysis of GARP generated maps can facilitate the selection of conservation areas, and assess which locations have the highest habitat potential. This would be the basis to elaborate or revise management and development plans in this region. These actions would not only protect *M. mathildae*, but other threatened flora and fauna that share the same habitat; e.g. *Cedrela dugesii*, *Erythrina coralloides* and *Opuntia elizondoana* (SEMARNAT, 2002).

The results of the present study were recently used by the environmental protection agency of the Queretaro municipality (Subdelegación de Gestión para la Protección Ambiental y Recursos Naturales) and by the ecological office of the municipality (Dirección de Ecología del Municipio de Querétaro) in order to formulate a project to establish the Cañada de Juriquilla as a Natural Protected Area (NPA). Our results will also be used to obtain the NPA category for Cerrito Colorado.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are indebted to Yolanda Pantoja for her invaluable assistance to generate GARP models and plant identification, and Christian Delfín, Daniela Valera and Carlos López for their assistance in map construction. We also thank Alejandro Cabrera Luna, Gabriela Madrid, Daniel Ávila Aguilar, Joshue Baltazar Rivera and Aslam Narvaez Parra for field assistance. We thank FIQMA for providing access to Cañada Juriquilla NPA; as well as Pamela Siurob Carbajal for authorizing access to Cimatario National Park. Dr. Robert Jones from UAQ provided assistance in the English version. This research was partially funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71). The scholarship to the first author, granted by CONACYT (FOMIX QRO-2006-C1-53811) is gratefully acknowledged.

## **REFERENCES**

- Anderson, R.P., Lew, D., Peterson, A.T., 2003. Evaluating predictive models of species distributions: criteria for select optimal models. *Ecological Modelling* 162, 211–232.
- Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., 2004. Modeling species' geographic distributions for conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation* 116, 167–179.
- Baltazar, R.J., Mahinda, M., Hernández, S., 2004. Guía de Plantas Comunes del Parque Nacional “El Cimatario” y sus Alrededores. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Behnke, R.H., 2008. The drivers of fragmentation in arid and semi-arid landscapes. In: Galván, K.A., Reid, R.S., Behnke, Jr. R.H., Hoobs, N.T. (Eds.), *Fragmentation in Semi-Arid and Arid Landscapes*. Springer, The Netherlands, pp. 305–340.
- Carrillo-García, A., León de la Luz, J.L., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J., 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert. *Restoration Ecology* 7, 321–335.

- Costanza, R., Voinov, A., 2004. Introduction: spatially explicit landscape simulation models. In: Costanza, R., Voinov, A. (Eds.), Landscape Simulation Modeling. Springer-Verlag, New York, pp. 3–20.
- Domínguez-Domínguez, O., Martínez-Meyer, E., Zambrano, L., Pérez- Ponce de León, G., 2006. Using ecological-niche modeling as a conservation tool for freshwater species: live-bearing fishes in central Mexico. Conservation Biology 20, 1730–1739.
- ESRI, 2000. ArcView GIS v. 3.2. Environmental System Research Inc., USA
- García, R.O., Malda, B.G., 2010. Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climatic change. In: Dallmeier, F., Fenech, A., Maciver, D., Szaro, R. (Eds.), Climate Change, Biodiversity, and Sustainability in the Americas. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Hernández, M.M.M., Sánchez, M.E., 2002. Informe de una nueva localidad de *M. mathildae* y una propuesta para modificar su categoría legal de conservación. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 47(1), 4–10.
- Hernández-Oria, J.G., Chávez, R., Galindo, M., Hernández, G., Lagunas, M., Martínez, S., Mendoza, R., Sánchez, A., Sánchez, M., 2003. Evaluación de aspectos ecológicos de una nueva población de *Mammillaria mathildae* Kraehenbuehl & Krainz en Querétaro. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 47, 4–10.
- Hilty, J.A., Lidicker, Jr. W.Z., Merenlender, A.M., 2006. Corridor Ecology. Island Press, pp. 89–115.
- Illoldi-Rangel, P., Sánchez-Cordero, V., Peterson, A.T., 2004. Predicting distributions of Mexican mammals using ecological niche modeling. Journal of Mammalogy 85, 658–662.
- Irfan-Ullah, M., Amarnath, G., Murthy, M.S.R., Peterson, A.T., 2007. Mapping the geographic distribution of *Aglaia bourdillonii* Gamble (Meliaceae), an endemic and threatened plant, using ecological niche modeling. Biodiversity Conservation 16, 1917–1925.
- Kalnay, E., Cai, M., 2003. Impact of urbanization and landuse change on climate. Nature 423, 528–531.

Kräehenbüehl, F., Krainz, H., 1973. *Mammillaria mathildae* Kräehenbüehl et Krainz spec. Nov. Kakteen und andere Sukkulenten 24(12), 265–266.

Lim, B.K., Peterson, A.T., Ångstrom, M.D., 2002. Robustness of ecological niche modeling algorithms for mammals in Guyana. *Biodiversity Conservation* 11, 1237–1246.

Maestre, F.T., 2006. Linking the spatial patterns of organisms and abiotic factors to ecosystem function and management: Insights from semi-arid environments. *Web Ecology* 6, 75–87.

Maestre, F.T., Cortina, J., 2002. Spatial patterns of surface soil properties and vegetation in a Mediterranean semi-arid steppe. *Plant Soil* 241, 279–291.

Perry, J.N. 1995. Spatial analysis by distance indices. *Journal of Animal Ecology* 64, 303–314.

Perry, J.N., Dixon, P., 2002. A new method for measuring spatial association in ecological count data. *Ecoscience* 9, 133–141.

Perry, J.N., Winder, L., Holland, J.M., Alston, R.D., 1999. Red-blue plots for detecting clusters in count data. *Ecology Letters* 2, 106–113.

Peterson, A.T., Ball, L.G., Cohoon, K.C., 2002a. Predicting distributions of Mexican birds using ecological niche modelling methods. *Ibis* 144, e27–e32.

Peterson, A.T., Ortega-Huerta, M., Bartley, G., Sánchez-Cordero, V., Soberón, J., Buddemeier, R.H., Stockwell, D., 2002b. Future projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature* 416, 626–629.

PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008. *Perspectivas del Medio Ambiente Urbano: GEO Zona Metropolitana Querétaro*. PNUMA, SEDESU, CONCYTEQ. Querétaro, México.

Rojas-Aréchiga, M., Vázquez-Yanes, C., 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44, 85–104.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en



riesgo. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo de 2002, Primera sección, México, DF.

Soberon, J., Golubov, J., Sarukhán, J. 2001. The importance of *Opuntia* in Mexico and routes of invasion and impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: *Pyralidae*). The Florida Entomologist 84(4), 486–492.

Solano, E., Feria, T.P., 2007. Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status. Biodiversity Conservation 16, 1885–1900.

Stockwell, D.R.B., Noble, I.R., 1992. Induction of sets of rules from animal distribution data: a robust and informative method of data analysis. Mathematics and Computers in Simulation 33, 385–390.

Stockwell, D.R.B., Peters, D., 1999. The GARP modeling system: problems and solutions to automated spatial prediction. International Journal of Geographical Information Science 13, 143–158.

Suzán-Azpíri, H., Sosa, V.J., 2006. Comparative performance of the giant cardon cactus (*Pachycereus pringlei*) seedlings under two leguminous nurse plant species. Journal of Arid Environments 65(3), 351–362.

Turner, W.R., Wilcove, D.S., Swain, H.M., 2006. Assessing the effectiveness of reserve acquisition programs in protecting rare and threatened species. Conservation Biology 20(6), 1657–1669.

Welles, J.M., 1990. Some indirect methods of estimating canopy structure. Remote Sensing Reviews 5, 31–43.

Zúñiga, B., Malda, G., Suzán, H., 2005. Interacciones planta-nodrizza en *Lophophora diffusa* (Cactaceae) en un desierto subtropical de México. Biotrópica 37, 351–356.

## **ARTÍCULO II**

### **Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climatic change.**

García-Rubio, Oscar (✉) & Malda-Barrera, Guadalupe.

Laboratorio de Ecología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Boulevard de las Ciencias S/N, Juriquilla Querétaro 76230, México. E-mail addresses: [osrigaru@gmail.com](mailto:osrigaru@gmail.com).

#### **ABSTRACT**

Phenological phases of the endemic cactus *Mammillaria matlidae* were recorded as part of the long term monitoring program for natural protected areas in a deciduous tropical forest near to Querétaro City. Commonly this cactus blooms and fructify from late May to August. However the blooming period in 2005 and 2006 occurred 1.5 months earlier. Since phenophases depend on seasonal meteorological trends, we explored their association with a temperature increase. Non significant differences were found between 2003, 2005 and 2006. In contrast, rainfall patterns it was different and rainy season was atypical in 2003: it began later, was shorter and extreme. Just in the first 9 days of October precipitation registered 432 mm, accumulating more water than 2005 total precipitation (405mm). Therefore it was the higher precipitation in the last 70 years. This impacted negatively both, the number of *Mammillaria matlidae* individuals (decreasing from 209 to 111) and the cactus' annual recruitment. Meanwhile, during 2005 and 2006 rainfall patterns were homogeneously distributed throughout the year. In both years *M. mathildae* fruit yield was increased, and plant population was increased in 2006, with 31 seedlings registered. It is possible that one of the key factors for the plant population recovery was the homogeneous distribution of the rainfall. These observations contribute to a better understanding of climatic change repercussions on individual species; and further on, they could facilitate the improvement for the construction of prediction models to estimate potential distribution of species after climatic change event.

**Keywords:** climate change, recruitment, *Mammillaria mathildae*, phenology.

## INTRODUCTION

For the past decades the evidence of Global climatic change, as a consequence of the increased emission of greenhouse effect gases has been overwhelming (Joyce *et al.* 2005). One of IPCC's conclusions states that "it is at least 90 percent certain that temperatures will continue to rise, as average global surface temperature projected to increase by between 1.4 and 5.8°C above 1990 levels by 2100" (Gucinski *et al.* 2004). It is evident that anthropogenic greenhouse gas emissions will continue to affect us for a long time. Even with an ideal scenario where CO<sub>2</sub> emissions stopped today, the re-establishment of atmosphere would take many centuries!

Climatic change consequences (*e.g.* increases in extreme weather events, displacement of high-latitude species by low-latitude ones, or impacts observed on climate-sensitive resources for earlier phenology events) will affect the global ecosystems. Therefore, it is necessary to predict the possible changes and develop contingency plans for alternative scenarios. Some of the crucial challenges could be: modeling how ecosystems will respond to climatic change, how would climatic change interact with other stressors (*e.g.* invasive species, urban expansion, agriculture and livestock), or, how to maintain the sustainability of natural areas.

However regional and local scales consequences have been difficult to predict due to a synergistic effect of the stressors. Developing strategies to deal with such vulnerabilities requires the integration of information at multiple scales. In this context, monitoring sensitive populations could be configured to identify alternative conditions as they may occur, in order to contribute to development of further accurate prediction models.

Mexico emits 0.96 tons of C per year to the atmosphere (Martínez and Fernández 2004); and 30.5% of these emissions are directly related to land use changes (urbanization, agriculture, and livestock). It is estimated that temperate forests, tropical forests and high mountain mesophyllous forests will be the most

threatened ecosystems in Mexico. In contrast, perennial tropical forests, deciduous and semi-deciduous tropical forests will increase their distribution range (Arriaga and Gómez 2004).

Some relicts of deciduous tropical forest are distributed around Querétaro City in central Mexico, which according to Arriaga and Gómez (2004), prediction are very susceptible to radiate in a wider range as a consequence of climatic change. For this reason, these particular ecosystems are good models for monitoring climatic changes; and to determine, how the vegetation will modify its abiotic and biotic interactions; as well to predict how they will fit in the new environments that may result, in order to establish a sustainable management.

Querétaro City experienced the most extreme rainfalls in 70 years (one reaching 115.2 mm in one day). In 2003 the annual precipitation reached 1018 mm whereas in 2005 and 2006 it was 404 and 645 mm respectively. This phenomenon turned the red lights on and changed our vision about climatic change. Some researchers began to associate the unusual vegetation phenology with the rare climatic events. Since phenological rhythms of plant species depends on seasonal meteorological trends, we can use these phenophases in order to monitor climatic change. Therefore, in this research, our immediate goal was to assess if early flowering events observed for *Mammillaria mathildae*, an endemic cactus associated to deciduous tropical forest in central Mexico, is related to temperature increases and/or to changes in the precipitations patterns. Also we studied how this phenomenon impacts in the cactus' annual recruitment. In this way, phytophenology could provide some indirect information about how the environmental changes impact on individual species.

## **METHODS**

### **Study area**

“Cañada Juriquilla” is located at North of Querétaro City in the province of Juriquilla, at 1890 m of altitude, between 20° 41' 35.2" N and 100° 27' 16.4" W. It includes the largest population of *M. mathildae* (133 individuals in 2006). “La Cañada” is located at Southwest of Querétaro City in the province of

Corregidora, at 1870 m of altitude, between 20° 37' 31.8" N and 100° 18' 52.0" W (Cabrera and Gómez 2003).

#### Climatic data

Daily temperature and precipitation data for the study area were obtained from CONAGUA's (National Ministry of Water) in Querétaro meteorological station (20° 35' N: 100° 24' W).

#### **Flowering and fruit set evaluation**

Periodic surveys were performed in order to determine the beginning and end of blooming and fructifying events. *M. mathildae* plant size was positively correlated with flowering amplitude; therefore we only considered 1.8 to 5 cm  $\varnothing$  plants. 20 individuals carefully recognized as genets. Phenology was determined *in situ* by direct observation from early February to late October. The number of flowers per individual was counted, following fruit yield determination. Reproductive effort (RE) was calculated for each year as a flowers/fruits ratio.

#### **Seed collection**

Fruits from 20 different donor plants were collected from Cañada Juriquilla's population during August 2005 and 2006, following recommendations described by Ross (2004). Once in the laboratory, seeds were manually extracted and counted.

#### **Population census**

The census of the Cañada Juriquilla's cactus population was performed *in situ* by direct observation on late December 2005 and early January both 2005 and 2006. Each individual cactus was measured (diameter, height and number of areoles) and systematically tagged.

#### **Statistical analysis**

A single factor ANOVA was used to test flower and fruit yield differences, and to compare temperature patterns, at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed using JMP 6.0 statistical software (SAS Institute, Inc. 2005).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phenological gap

It is important to note that different *M. mathildae*'s populations seem to be moderately well-synchronized in their phenology. For the five known, described populations (García and Malda 2007) blooming periods coincided in all cases. According to Cabrera and Gómez (2003), La Cañada's population bloomed from late May to late June, and fructified from June to August in 2003; whereas Hernández-Oria *et al.* (2003) registered a similar response for Cañada Juriquilla's population in 2001 (flowering recorded in May).

However, in both 2005 and 2006, the first flowering events appeared earlier, during the first days of April, continuing until late June, and maximum blooming rate was reached from early to middle May. Meanwhile, fructification season began in early May and prolonged until late July.

This phenological delay (one and a half month earlier) could be attributed to different reasons, since many biochemical and physiological processes are highly correlated with temperature (Taiz and Zeiger 2002). Early flowering has been reported around the world on account of climatic change. For instance, in Europe the initiation of phenological phases (leaf formation and flowering) has occurred earlier in many species as consequence of the elevation of spring temperatures (Schwartz, 1999). Parmesan and Yohe (2003), indicated that phenological changes in African flora are a response to global warming. Weiss and Overpeck (2005), presented data showing widespread warming trends in winter and spring, decreased frequency of freezing temperatures, lengthening of the freeze-free season, and increased minimum temperatures per winter year, all of them impacting on phenological events over the Sonoran Desert vegetation.

In spite of this, annual temperature pattern observed for the study area during 2003, 2005 and 2006 was not significantly different:  $F=0.1903$  Prob.  $>F < 0.9024$  (figure 1). Therefore, some climatic factors other than temperature could be related to changes in blooming periods. Vegetation phenology in arid and semiarid ecosystems and seasonally dry tropical climates (as deciduous tropical forests) is primarily controlled by water availability (Justiniano and Fredericksen

2000), and global climate change can modify rainfall seasonality. As a result, extreme weather events like floods or droughts, as well as longer dry or rainy seasons could occur (Fauchereau *et al.* 2003).

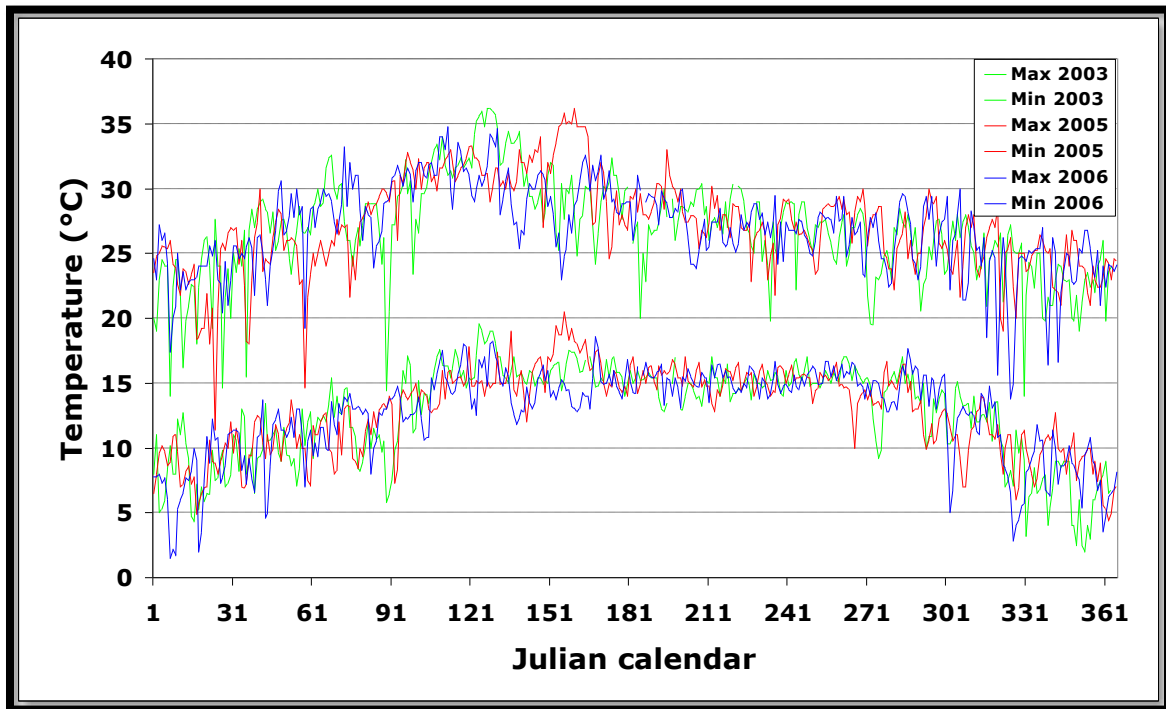


Figure 1. Annual record of temperature in Querétaro City for 2003, 2005 and 2006. CONAGUA, Querétaro meteorological station.

Comparing registered precipitations in 2003, 2005 and 2006 the first important 2003 precipitation occurred until the last week of May. In contrast, 2005 and 2006 rainfall events were recorded since March (figure 2). These early rainfalls could be associated to the early blooming and fructifying seasons observed for *M. mathildae*. Thus, water availability allowed cacti to initiate their annual growth period, and developed flowers earlier compared to 2003, when the blooming started until late May.

### ***M. mathildae* recruitment**

Precipitation occurred more uniformly in 2005 and 2006 than in 2003, when rain was less frequent but unusually intense (figure 2). In order to distinguish some possible effects of such extreme phenomena on *M. mathildae* populations, a fruit yield comparison for different years (table 1) shows evident

differences. In 2003, through the late rainfall season, fruit production was very poor in contrast to 2005 and 2006. Furthermore, the population of *M. mathildae* decreased in number of individuals; declining from 209 to 111 plants (and only 5 seedlings were registered) in 2005 (figure 3).

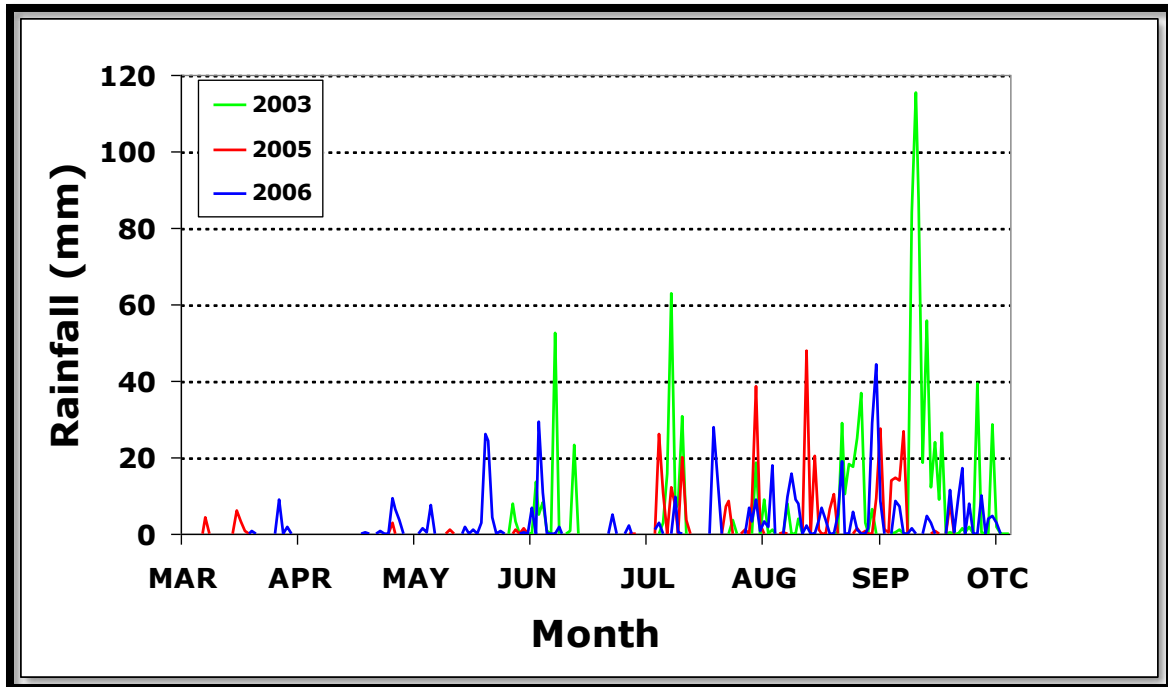


Figure 2. March – October precipitation in Querétaro City for 2003, 2005 and 2006. CONAGUA, Querétaro meteorological station.

Table 1. Quantitative phenology of *M. mathildae*'s population.

Year	Flowers # (mean±SE)	Fruits # (mean±SE)	RE
2003*	31*	2*	0.15*
2005	14.5 ± 4.34	6.5 ± 2.87	0.47 ± 0.13
2006	16.0 ± 5.22	9.0 ± 4.58	0.59 ± 0.14

\* Data from Hernández-Oria *et al.* (2003).

2005 and 2006 data are the mean ± SE for 20 individuals.

Reproductive effort = RE.



A possible explanation for this population loss could be that excessive amounts of water negatively affected young individuals. Figure 3 shows that small plants reduced their number, while larger plants persisted in the field. In addition, the heavy 2003 precipitations affected the 2005 recruitment season; probably due to excess of running water that could have damaged or removed plantlets and seeds on the soil seed bank (*M. mathildae* occurs in pronounced slopes), and therefore limiting future recruitment periods. Some other *M. mathildae* germination experiments in which seeds were germinated after emulating a running water event (15 min), showed a seed viability loss from 70% (control) to 32% in the treated seeds (García and Malda 2006). Also *in situ* recruitment for the 2003 period was very low (figure 3). So far, can not find evidence of actively growing populations since medium-sized cactus were the more abundant (Hernández-Oria *et al.* 2003).

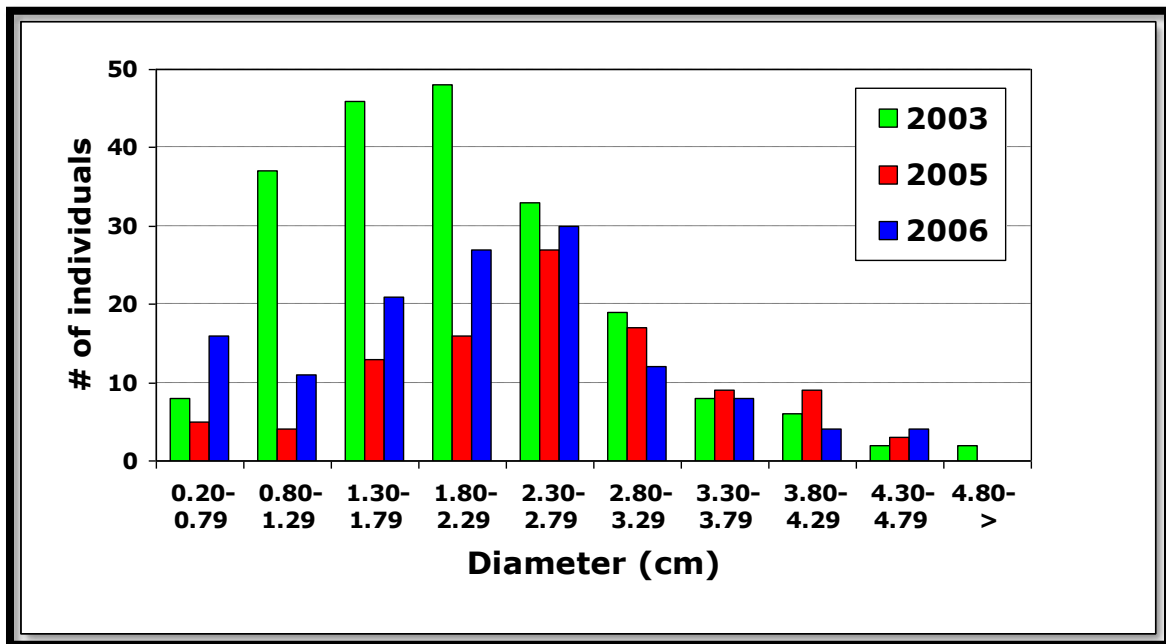


Figure 3. Histogram showing size-class distribution of *M. mathildae* individuals at Cañada Juriquilla plot. Data for 2003 were reported by Hernández-Oria *et al.* (2003). Total number of individuals: 2003 = 209, 2005 = 111 and 2006 = 133.

In contrast, the homogeneous rain distribution in 2005 and 2006 (figure 2) resulted in a population increase (figure 3); 133 individuals with 31 seedlings were recorded in 2006. In 2005 March precipitations stimulated the early floral production ( $14.5 \pm 4.34$  flowers). In 2006 the late March rainfall triggered flower emergency which reached  $16.0 \pm 5.22$  flowers, similar to 2005 period ( $F=2.1992$  Prob.  $>F < 0.1463$ ). Nevertheless fruit development performed different, because in contrast to 2005, the 2006 constant precipitation beginning in late April promoted a yield of  $9.0 \pm 4.58$  fruits, which was significantly different from  $6.5 \pm 2.87$  yield registered in 2005 ( $F=7.4602$  Prob.  $>F < 0.0095$ ). It is probable that the absence of rain for 5 weeks in 2005 had a negative impact on fruit production; compromising the population RE (see table 1) which was also significantly different ( $F=7.7186$  Prob.  $>F < 0.0084$ ). Recent 2007 precipitation presented a similar rain pattern to 2006 (data not shown). This fact combined with a higher number of fruits produced, could result in a seedling number increase regarding to 2006 recruitment period.

## CONCLUSIONS

Evidently, there are long term climatic phenomena in central Mexico that require explanation and understanding. A major future challenge is to better understand which systems or species are most or least susceptible to climate change scenarios. There are different approaches to develop prediction models. For example, some researchers like Trenberth *et al.* (2003), emphasized that major focus must be placed on precipitation amount, rather than other precipitation parameters that also may change (frequency, timing, intensity, statistical distributions, extremes, types of events, etc.). However, we illustrated that annual rain distribution influences seedling recruitment affecting population dynamics of *M. mathildae* in time. De Steven and Wright (2002), founded that recruitment in tropical trees was synchronized with seed production, and thus also appeared to be partly influenced by El Niño climatic events. As a consequence, seedling recruitment varied temporally and spatially. Since different species have distinct phenophases, it is necessary to implement long

term studies for other species, particularly “nurse trees”, which are important to understand the vegetation dynamics in deciduous tropical forests.

Such observations contribute to a better understanding of these relations and therefore, facilitate the improvement for construction of prediction models to estimate species potential distribution after any climatic change event. Obviously many other topics need to be reviewed, like precipitation abundance that could be related to the increase in vegetal biomass, which in the dry season will lead to higher fire frequencies. Fires discourage deciduous tropical forest recovery, solidifying the competitive advantage of invasive species *e.g.* rose Natal grass *Melinis repens* (Martínez and Fernández 2004).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are indebted to Ms. Teresa Rubio for her technical assistance in flower and fruit counting. We thank FIQMA for providing access to Cañada Juriquilla Natural Protected Area. We thank Idea Wild for equipment donation for this project. This work was partially funded by CONACYT (Project CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71).

## **REFERENCES**

- Arriaga, L., and L. Gómez. 2004: Posibles efectos del cambio climático en algunos componentes de la biodiversidad de México. *Cambio Climático: una visión desde México*, J. Martínez and B. Fernández, Eds., SEMARNAT - INE, 255-265.
- Cabrera, L. J. A., and S. M. Gómez, 2003: Algunos aspectos de la biología floral de *Mammillaria mathildae*, especie microendémica del estado de Querétaro y en peligro de extinción. *Memorias del Quinto Verano de la Ciencia de la Región Centro y Segundo Verano de la Ciencia de la UAQ*, Querétaro, Mex. UAQ, 50.
- De Steven, D., and J. Wright, 2000: Consequences of variable reproduction for seedling recruitment in three neotropical tree species. *Ecology*, 83, 2315-2327.

- Fauchereau, N., M. Trzaska, and Y. Richard, 2003: Rainfall variability and changes in southern Africa during the 20th century in the global warming context. *Nat. Hazards*, 29, 139–154.
- García-Rubio, O., and G. Malda-Barrera, 2006: Factores que afectan la germinación de *Mammillaria mathildae* (Krähenbühl et Krainz, 1973). *IX Congreso Latinoamericano de Botánica*, Santo Domingo, RD, Soc. Lat. Bot., 18-25.
- García-Rubio, O., and G. Malda-Barrera, 2007: A rapid methodology to select urban conservation areas. A case of study: *Mammillaria mathildae* conservation. *Conservation Biology 21<sup>st</sup> Annual Meeting*, Port Elizabeth, South Africa, Soc. Con. Biol., 123.
- Gucinski, H., R. P. Neilson, and S. McNulty, 2004: Implications of global climate change for Southern forests: Can we separate fact from fiction? *Southern forest science: past, present and future*, M. Rauscher, and K. Johnsen, Eds. Gen. Tech. Rep. GTR-SRS-75. Asheville, NC, 365-371.
- Hernández-Oria, J. G., R. Chávez, M. Galindo, G. Hernández, M. Lagunas, S. Martínez, R. Mendoza, A. Sánchez, and M. Sánchez, 2003: Evaluación de Aspectos Ecológicos de una Nueva Población de *Mammillaria mathildae* Kraehenbuehl & Krainz en Querétaro. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 47, 4-10.
- Joyce, L., R. Haynes, R. White, and J. Barbour, 2005: *Bringing Climate Change into Natural Resource Management. Proceedings of a Workshop*. USDA, 150 pp.
- Justiniano, M. J., and T. S. Fredericksen, 2000: Phenology of tree species in Bolivian dry season. *Biotropica*, 32, 276–281.
- Krähenbühl, F., and H. Krainz, 1973: *Mammillaria mathildae*. *Kakteen Sukk.*, 24, 265.
- Martínez, J., and Fernández B., 2004: *Cambio Climático: una visión desde México*. SEMARNAT - INE, 363 pp.
- Parmesan, C., and G. Yohe, 2003: A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421, 37– 42.

- Ross, C., 2004: Native seed collection and use in arid land reclamation: A low-tech approach. *Environ. Monit. Assess.*, 99, 1-3.
- Schwartz, M. D., 1999: Advancing to full bloom: planning phenological research for the 21st century. *Int. J. Biometeorol.*, 42, 113–118.
- Taiz, L., and I. Zeiger, 2002: *Plant Physiology*. Sunderland, MA., 690 pp.
- Trenberth, K. E., A. Dai, R. M. Rasmussen, and D. B. Parsons, 2003: The changing character of precipitation. *B. Am. Meteorol. Soc.*, 84, 1205–1217.
- Weiss, J.L., and J.T. Overpeck, 2005: Is the Sonoran Desert Losing Its Cool? *Global Change Biol.*, 11: 2065-2077.

### **ARTÍCULO III**

#### **Reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat**

Oscar García-Rubio (✉) & Guadalupe Malda-Barrera

Laboratory of Plant Ecology, Faculty of Natural Sciences, Universidad Autónoma de Querétaro, Boulevard de las Ciencias S/N, Juriquilla Querétaro 76230, México. E-mail addresses: [osrigaru@gmail.com](mailto:osrigaru@gmail.com).

#### **ABSTRACT**

A rapid shoot multiplication protocol was established for the endangered cactus *Mammillaria mathildae* in order to reintroduce it to its natural habitat. In vitro germinated seedlings were used as source of explants. Three explant sources (apical, lateral, and basal, excised from in vitro germinated seedlings) were tested. Shoot multiplication was induced in MS medium supplemented with different BA/IAA combinations (0, 22.19, 44.39 and 0, 1.43, 2.85, 5.71 respectively). Explants developed abundant callus in the presence of any BA/IAA concentration; whereas hormone-free media produced  $0.59 \pm 0.11$  new shoots (with a 41% callus development) from basal explants. Apical and lateral explants produced  $1.14 \pm 0.07$  and  $4.09 \pm 0.13$  new shoots respectively without callus generation. Plantlets originating from lateral explants developed a vigorous rooting system after two months growing on MS medium supplemented with  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose. 98% of micropropagated *M. mathildae* survived under greenhouse conditions. Plantlets were reintroduced in an experimental plot near to Juriquilla's wild population of *M. mathildae*; over 52% of the out-planted *M. mathildae* lot declined after five months. Water availability was associated with the decline of out-planted populations during the first month (43%).

**Key words:** Direct organogenesis, Endogenous hormones, Endemic cactus, Water availability

## INTRODUCTION

México has an exceptional diversity in the Cactaceae family, from which 80% are endemic species (Arias, 1993). Most cacti are endangered due to low growth and reproduction rates and anthropogenic threats such as habitat destruction, over-collection, livestock and agriculture, and others. Many of these plants are protected by the Mexican Federal Government (NOM-059-ECOL-2001). *Mammillaria* species in particular are collected from the wild, generating a strong pressure on natural populations. *M. mathildae* is an endemic cactus to Querétaro State, in central México. Its populations are confined to five localities (García and Malda, 2010), and only two reside in natural protected areas. The largest population of *M. mathildae* is found at Cañada Juriquilla, with 209 plants registered in 2003, but declining to 133 by 2007 (García and Malda, 2010).

In the last decades tissue culture has been implemented to propagate many threatened and endangered cacti e.g. *Obregonia denegrii* (Malda et al., 1999); *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu and Bahu, 2000); *Mammillaria elongata* (Papafotiou et al., 2001); *Pelecypora* spp. (Pérez-Molphe-Balch and Dávila-Figueroa, 2002); *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer et al., 2003); *Turbincarpus* spp. (Dávila-Figueroa et al., 2005); *Notocactus magnificus* (de Medeiros et al., 2006); 10 different *Mammillaria* spp. (Ramirez-Malagon et al., 2007); etc. Even though a general goal is that in vitro propagation may reduce over-collecting by commercialization of plants, no reports have shown a reduction of collection of wild specimens. Micropropagation techniques can also be used to re-establish wild populations that have been decimated or extirpated (Viswambharan et al., 2006).

Micropropagation protocols commonly use exogenous hormones to induce morphogenetic responses, particularly for *Mammillaria* family (Papafotiou et al., 2001; Poljuha et al., 2003; Ramirez-Malagon et al., 2007). Growth regulator morphogenetic response commonly varies, so auxin-cytokinin ratio must be empirically determined for each species. It is known that the addition of exogenous growth regulators, the prolonged in vitro cultivation and indirect

organogenesis are factors that induce somaclonal or epigenetic variations in micropropagated plants (Podwyszyńska, 2005). In contrast, micropropagation systems based on areole activation (direct organogenesis) are considered to obtain more genetically stable plants (Machado and Prioli, 1996) and therefore are a better plant material to achieve a successful reintroduction. This study was aimed to develop a protocol for in vitro propagation of *M. mathildae*, followed by greenhouse acclimatization and reintroduction to Cañada Juriquilla's natural population in order to assess cactus short-term survival rate.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant material**

*M. mathildae* seeds were collected from 62 plants (57.4% of the population) in the Cañada Juriquilla locality, Querétaro México; and in vitro culture was initiated from a seed mix, in order to maximize the representation of the gene pool. Seeds were vigorously washed in a vortex (2500 rpm) with 1% of a commercial liquid surfactant (containing alkyl ether sulfate ethoxylate) and rinsed three times with distilled water; then disinfected under aseptic conditions for three min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by three washes in sterile distilled water, two min in 1% AgNO<sub>3</sub>, and finally three washes in sterile distilled water. Seeds were aseptically germinated in 120 mL jars capped with polypropylene caps (Magenta Corp., Chicago, IL) containing 30 mL of half-strength MS salts (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 15 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 0.05 g·L<sup>-1</sup> *myo*-inositol, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> thiamine hydrochloride, 0.25 mg·L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.25 mg·L<sup>-1</sup> pyridoxine hydrochloride and 8 g·L<sup>-1</sup> agar (Sigma-Aldrich, Química S. A.). Culture media was adjusted to pH 5.7 with NaOH. The culture jars, were sterilized in an autoclave at 121°C/103 KPa for 15 minutes. After one month, seedlings were transferred into a full-strength MS salts, supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 0.1 g·L<sup>-1</sup> *myo*-inositol, 1 mg·L<sup>-1</sup> thiamine hydrochloride, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> pyridoxine hydrochloride and 8 g·L<sup>-1</sup> agar. Seedlings were maintained at 26±1° C under a total photosynthetic photon flux of 120-130 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,



provided by cool fluorescent lamps, in a 16 h photoperiod. Seedlings were transferred every 4 weeks to fresh medium.

### **Shoot induction**

Three month old *M. mathildae* seedlings (15 mm) germinated in vitro were used as source of explants for shoot induction experiments. Three explant types were tested: apical (five mm), lateral (longitudinally cut seven mm shoots without apex), and basal segments (approximately three mm wide). The cut-exposed areas of explants were placed in MS medium supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 0.1 g·L<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg·L<sup>-1</sup> thiamine hydrochloride, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> pyridoxine hydrochloride and 8 g·L<sup>-1</sup> agar, and with different cytokinin-auxin concentrations: 0, 22.19 and 44.39 μM BA, combined with 0, 1.43, 2.85 and 5.71 μM IAA in a 3X4 factorial design, in order to select the most efficient combination for shoot production. Eleven apical and basal, as well as 22 lateral replicates per treatment were tested. New shoot proliferation per explant and callus generation were recorded after 60 days of induction.

### **Rooting of shoots**

Rooting was induced in 10-15 mm long new shoots cultured, using previously described half- or full-strength MS medium supplemented with various concentrations of IBA (0, 4.9, 9.8, 19.7 and 29.5 μM) in a 2X5 factorial design. Fifteen shoots originating from lateral explants per treatment were used. Root production was assessed every two weeks after initiation of experiment. Shoots developing at least three roots 15 mm long were scored positively.

### **Greenhouse acclimatization and field reintroduction**

Rooted plants were transplanted to plastic containers with a mixture of commercial potting soil (1:1 Pro-Moss Premier<sup>®</sup> and Hortiperl Termalita<sup>®</sup>), in 2.5 cm diameter pots, covered for the first week with a plastic canopy and watered every third day to prevent desiccation and allow acclimatization. Plants were maintained at 26±1<sup>o</sup> C under a total photosynthetic photon flux of 120-130 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, in a 16 h photoperiod and were transferred to a greenhouse by the end of the second week. For acclimatization, plantlets were watered every week during two months prior to transfer into the field. Reintroduction was performed in

October at the end of the rainy season, 100 plantlets were transferred to Cañada Juriquilla, in a 75 X 10 m experimental plot. Plants were measured (diameter, height and areole number) and systematically tagged. Survival percentages were determined every other day on the first week, followed by weekly observations for a month; and finally monthly observations along a six months period.

### **Reintroduction area**

From the five known populations of *M. mathildae*, only two are under federal protection (García and Malda, 2010). Cañada Juriquilla locality, a natural protected area, was selected due to favorable conditions to achieve reintroduction (since deciduous tropical forest present a good conservation status). This site is located at North of Querétaro City, in the province of Juriquilla, at 1890 m altitude, between 20° 41' 35.2" N and 100° 27' 16.4" W. It encloses the largest registered population of *M. mathildae* (133 individuals in 2007). To study the effect of daily precipitation on survival rate we compared *M. mathildae*'s decay in situ against rain data. Precipitation patterns were obtained from CONAGUA's (National Ministry of Water) in meteorological station "Querétaro" (20° 41' N, 100° 27' W).

### **Statistical analysis**

New shoot production and rooting percentage were analyzed with ANOVA  $P < 0.05$ , and means were compared by a Tukey-Kramer multiple range test at  $P < 0.05$ . Micropropagation experiments were performed twice. Statistical analyses were carried out using JMP 6.0 statistical software (SAS Institute, Inc. 2005).

## **RESULTS**

### **Shoot induction**

In vitro germination was 91%, in contrast to 40% germination rate registered in its natural habitat. Highest germination rates for *M. mathildae* were observed during the second and third week. Morphogenetic responses of the three explant types (basal, lateral and apical portions of three month old seedlings) are presented in Table 1. All explant types developed a profuse,

compact, greenish callus with light pink portions in the surface, as a response to growth regulators combination (Fig. 1a). Meanwhile 18, 11 and 9% of apical, lateral and basal explants respectively, yielded new shoots under low BA concentrations (Table 1). In contrast, without any exogenous growth regulators, the three types of explants spontaneously produced new shoots, although explant type resulted in different shoot yields ( $F= 237.7$  Prob.  $>F < 0.0001$ ). Basal explants formed fewer shoots ( $0.59 \pm 0.11$ ), even though they also developed callus (41%). Apical and lateral explants produced  $1.14 \pm 0.07$  and  $4.09 \pm 0.13$  new shoots respectively (Fig. 1b), without callus generation after two months in culture (Table 1).

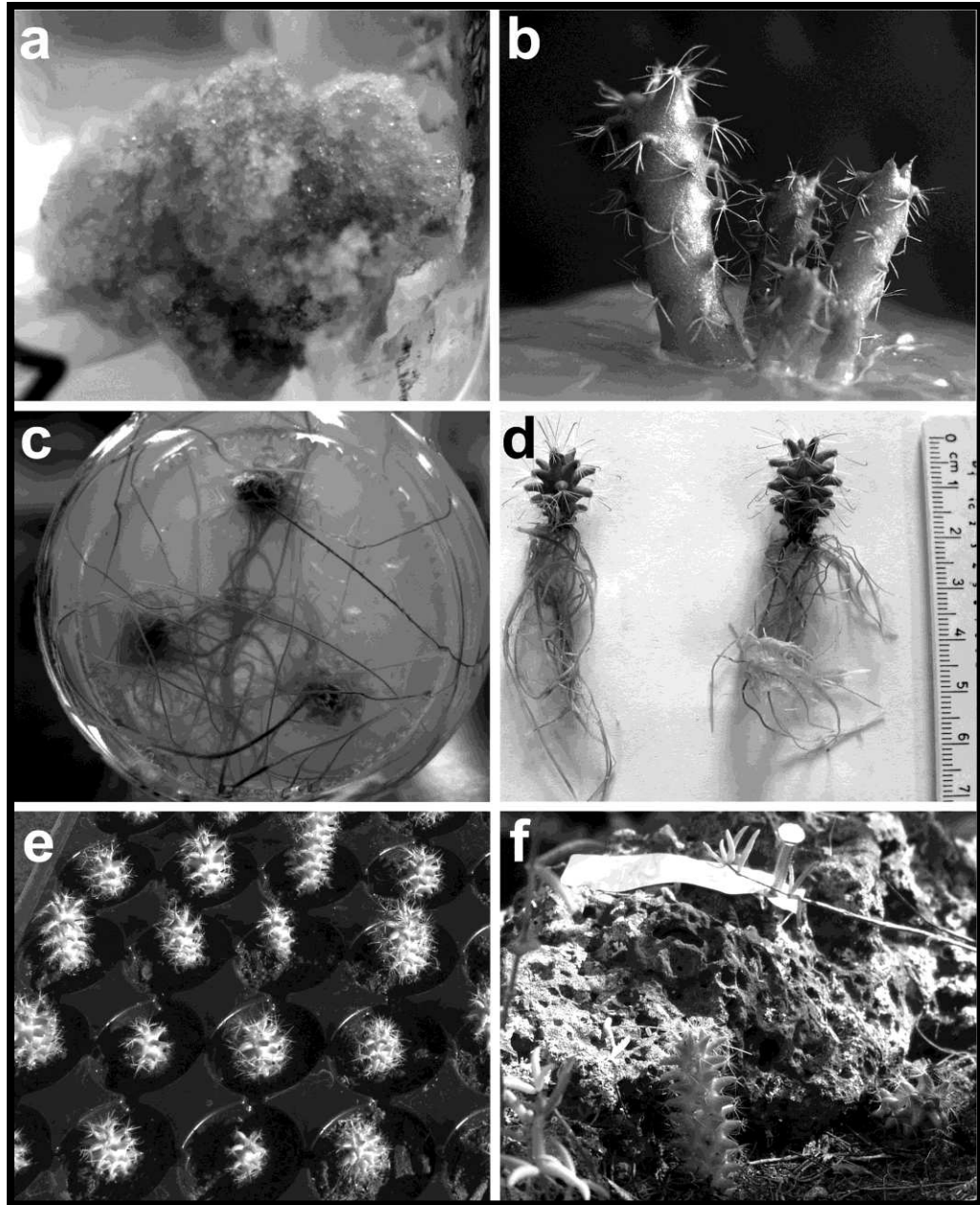
### **Rooting induction**

Full-strength MS and half-strength MS medium with and without IBA tested for rooting new shoots, is shown in Table 2. Explants cultured in full-strength MS medium showed a significant difference in rooting percentage compared to half-strength MS ( $F= 12.2$  Prob.  $>F < 0.0009$ ) even though they did not show significant differences in root length ( $F= 0.6817$  Prob.  $>F < 0.5106$ ). A vigorous rooting system was observed in seven to eight weeks (Fig. 1c and 1d).

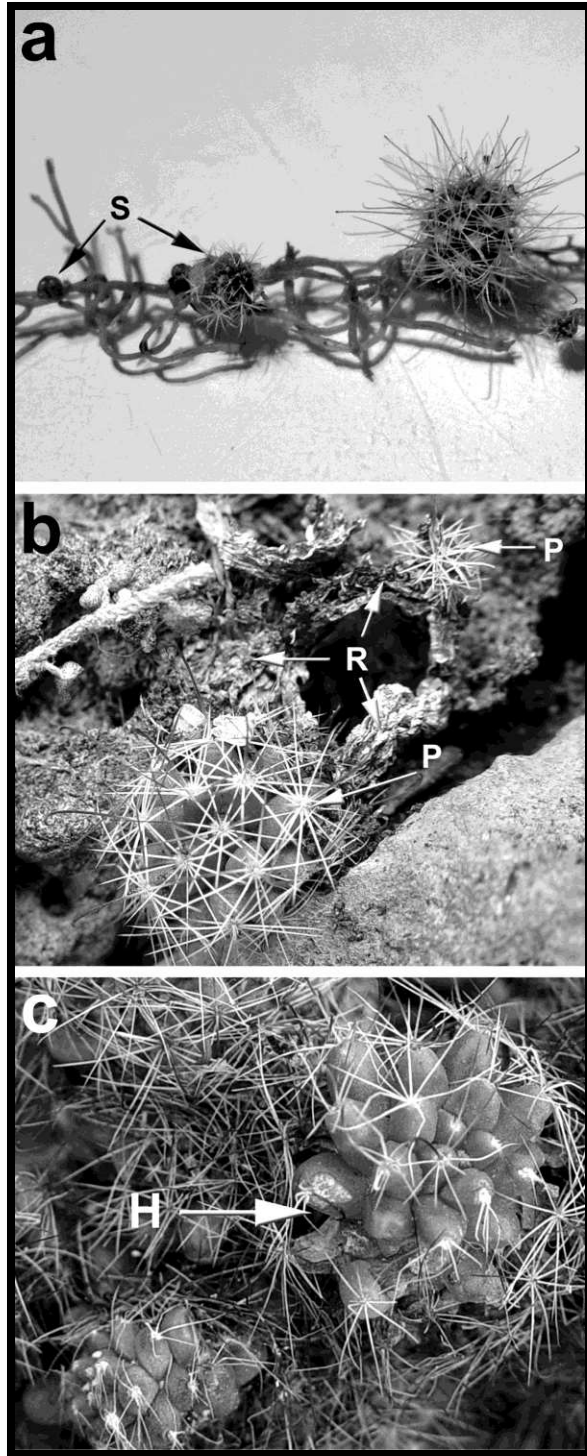
### **Reintroduction**

Establishment of plantlets to ex vitro conditions presented no significant problems, and 98% of in vitro derived plants survived at greenhouse conditions (Fig. 1e), during eight weeks, prior their transplant to the wild.

*M. mathildae* grows in pronounced slopes; hence, medium intensity precipitations could dislodge reintroduced plants. In addition, when rainfalls reached maximum intensity, herbivory resulted in deterioration of young plants. Our observations show that 34.2 % of Cañada Juriquilla's population experienced terrestrial isopods herbivory (Fig. 2c). For these reasons, *M. mathildae* reintroduction was performed in early October 2007, at the end of the rainy season, when also insect populations decrease. Reintroduced plants diminished 43% through the first month (Fig. 1F), and subsequently the lot decreased only 9% in the next three months. After five months, 52% of reintroduced plants died (Fig. 3).



**Fig. 1.** Micropropagation and reintroduction of *M. mathildae*. a) Callus proliferation in the presence of growth regulators, b) spontaneous shoot proliferation from lateral explants on MS media after two months in culture, c) rooting of plantlets after eight weeks in culture on MS media plus 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, d) seven months old micropropagated plantlets, e) plantlets acclimatization in commercial potting soil, and, f) reintroduced plants after five months in the wild



**Fig. 2.** a) *M. mathildae* plantlet showing the appearance of shoots (S) from roots three months after root emergency, b) plant (P) regenerated from root (R) in wild, and c) plant damaged by herbivorous (H) terrestrial isopods (sow bugs)

Table 1. Effect of BA and IAA on shoot and callus formation on explants of *M. mathildae*. Results are the average of two separate experiments.

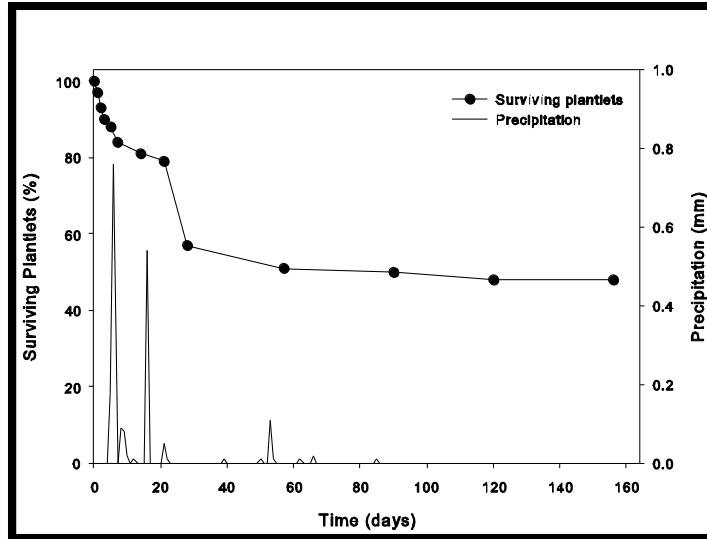
Concentration ( $\mu\text{M}$ )		Shoot No. per explant (mean $\pm$ SE)			Callogenesis (%)		
BA	IAA	Apical	Lateral	Basal	Apical	Lateral	Basal
0	0	1.14 $\pm$ 0.07 <sup>a1</sup>	4.09 $\pm$ 0.13 <sup>a2</sup>	0.59 $\pm$ 0.11 <sup>a1</sup>	0 <sup>a1</sup>	0 <sup>a1</sup>	40.9 <sup>a2</sup>
0	1.43	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
0	2.85	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
0	5.71	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
22.19	0	0.18 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	0.11 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	0.09 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	77.3 <sup>c</sup>	88.6 <sup>c</sup>	90.9 <sup>c</sup>
22.19	1.43	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
22.19	2.85	0.05 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	95.5 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
22.19	5.71	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
44.39	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
44.39	1.43	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
44.39	2.85	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
44.39	5.71	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>

Means followed by the same letters within columns are not significantly different according to the ANOVA  $P < 0.05$ . Means followed by the same number between columns are not significantly different according to the ANOVA  $P < 0.05$ .

Table 2. Effect of MS medium and IBA on root formation from lateral explants. Results are the average of two separate experiments.

MS strength	IBA ( $\mu\text{M}$ )	Root formation (mean $\pm$ SE)	Root length (mean $\pm$ SE)	Callogenesis (%)
Full-strength	0.0	0.97 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	6.99 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Full-strength	4.9	0.10 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	6.83 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>
Full-strength	9.8	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Full-strength	19.7	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Full-strength	29.5	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Half-strength	0.0	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	6.77 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Half-strength	4.9	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Half-strength	9.8	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Half-strength	19.7	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>
Half-strength	29.5	0 <sup>d</sup>	-	100 <sup>b</sup>

Means followed by the same letters within columns are not significantly different according to the ANOVA  $P < 0.05$ .



**Fig. 3.** Survival of *M. mathildae* plantlets after 5 months of reintroduction to their natural habitat. Solid line represents precipitation patterns at Cañada Juriquilla

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

### *Mammillaria mathildae* micropropagation

MS basal medium was enough for in vitro new shoot production, contrary to several results reported for other *Mammillaria* species (Papafotiou et al., 2001; Poljuha et al., 2003; Ramirez-Malagon et al., 2007), where hormone complementation, especially cytokinins, are crucial for shoot generation. In addition, it is known that cacti have the capacity to synthesize auxin autonomously in vitro (Clayton et al., 1990); therefore the addition of exogenous auxins often stimulates callus production. This could be a disadvantage for micropropagation systems since hormone supplementation could promote genetic changes in plants (Venkatachalam et al., 2007). Even though, such variation is of particular concern for conservation (Viswambharan et al., 2006), since it is possible that genetic variability induced by tissue culture might be beneficial, favoring the survival of the species upon restoration in their natural environment (Giusti et al., 2002). Palomino et al. (1999) demonstrated karyological stability of tissue cultured *M. san-angelensis* despite their long-term in vitro sub-culturing and auxin supplementation as well. However, karyological analysis cannot reveal alterations in specific genes or small chromosomal

rearrangements (Rout et al., 1998; Venkatachalam et al., 2007). Nevertheless, long term effects of possible genetic variations are indeterminate and their repercussions over ecosystems are largely unknown. In addition, *M. mathildae* mean shoot production by direct organogenesis was low, contrasting to other species like *M. san-angelensis* which reached yields of 21 to 35 shoots per callus explants (Martinez-Vazquez and Rubluo, 1989). Therefore, shoot proliferation derived from direct organogenesis in the absence of external growth regulators must be a better strategy to obtain plant material to restore *M. mathildae* or every other plant into its natural environment. On this basis, using low yields of genetically stable plants versus high yields of possibly genetically altered plants for reintroduction represents an affordable long term cost-benefit strategy.

Although growth regulators have been used for root induction of cacti (Fay and Gratton, 1992), *M. mathildae* rooted spontaneously in hormone free MS basal medium. This is a frequent result reported for many other cacti rooting in vitro on auxin-free media, e.g. *Coryphantha elephantidens* (Wakhlu and Bahu, 2000); *Turbincarpus* spp. (Dávila-Figueroa et al., 2005); *Notocactus magnificus* (de Medeiros et al., 2006); and, in particular those species that root freely in vivo such as *Opuntia amyclaea* (Escobar et al., 1986); *Agave parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba et al., 1999); *Hylocereus undatus* (Mohamed-Yasseen, 2002); and *Agave tequilana* (Valenzuela-Sánchez et al., 2006). Conversely, any hormone addition induced profuse callus formation in *M. mathildae*.

*M. mathildae* exhibits a profuse shoot and root regeneration capability in the wild. An interesting phenomenon observed during in vitro rooting was the spontaneous shoot development from roots (figure 2a). This phenomenon is not extraordinary, since *M. mathildae* is capable of regenerating a whole plant from its roots after complete shoot removal (figure 2b). After some mechanical damage, *M. mathildae* produces many ramets from both, roots and shoots (personal observation). Sriskandarajah et al. (2006) studied the regenerative capacity in 2 cacti, *Rhipsalidopsis* and *Schlumbergera*. They found that during in vitro subcultures an enhanced auxin metabolism in combination with the increased cytokinin oxidase-dehydrogenase activity shifts the auxin and cytokinin



pool, favoring adventitious shoot formation in *Rhipsalidopsis*. Meanwhile low level of peroxidase activity and auxin autotrophy-conjugation, makes *Schlumbergera* more recalcitrant. *M. mathildae* regeneration capacity enables this plant to persist in the wild, since they augment their biomass and eventually increase their seed yield. It is possible that root formation could be associated to high endogenous hormone levels in *M. mathildae*. However further studies will be necessary to confirm this suggestion.

### **Reintroduction**

Successful reintroductions such as those of *M. san-angelensis* reporting 91 % survival (Rubluo et al., 1993) or those of *Mammillaria pectinifera* and *Pelecyphora aselliformis* (Giusti et al., 2002) were achieved in botanical gardens where specimens are constantly cared for. In contrast, when cacti reintroduction into natural habitat takes place, significant losses (sometimes the whole lot) occur (Leirana-Alcocer and Parra-Tabla, 1999; Contreras and Valverde, 2002). Decruse et al. (2003) reported a successful reintroduction of the orchid *Vanda spathulata* in wild, with a survival rate between 50-70%; and population decline was caused by abiotic factors (direct sunlight and high wind velocity). In a different study, Stiling et al. (2000) established that *Opuntia corallicola* restoration reached 65% of surviving individuals, and the principal cause of decline was stem browning (bacterial origin).

An abrupt reintroduced plants decrease was registered 15 days after the last rain event (figure 3). It is probable that the absence of rain registered after reintroduction, had a negative impact on cactus survival in our results. Under water stress, stomatal and cuticular leaf components play a significant role in plant water balance. Suppression of wax yield in tissue culture plants is associated to high humidity and low light intensity conditions (Shepherd and Griffiths, 2006). Malda et al. (1999) showed that in vitro derived cacti registered low amounts of epicuticular waxes; and only after 3 months of acclimatization these plantlets reached similar wax levels to those of mature plants in greenhouse. Furthermore, no correlation was found between survival percentages and epicuticular wax content. However, acclimatization was

performed under greenhouse conditions with regular watering (every 5 days). Early observation of *M. mathildae* persistence in the wild suggests that micropropagated plantlets' reintroduction failed because the cactus can't support water scarcity. In addition, plants associate with a wide diversity of bacteria and fungi symbionts under wild conditions (Brundrett, 2002). Mycorrhizal fungi play a fundamental role increasing plant absorption of phosphates and water uptake in semi-arid and arid environments (Sylvia et al., 2003). Carrillo-Garcia et al. (1999) reported presence of VAM in a wide variety of cacti from the Sonoran Desert, which increases plant water uptake. Goicoechea et al. (2004) found that mycorrhizal fungi conferred a greater responsiveness of *Anthyllis cytisoides* to drought by inducing both, epicuticular wax deposition and leaf abscission. They state that this phenomenon can constitute an ecological adaptation to cope with severe drought. It is probable that lack of beneficial symbionts in micropropagated plantlets of *M. mathildae* resulted in an unfavorable condition when they are reintroduced to their natural habitat, since water availability diminishes in the re-planting time and because plant water uptake capacity per se is low compared to wild mycorrhizal fungi infested plants. If plantlets were to be used to reduce over collection of wild population individuals (commercial trade) watering would not be a key factor, while if plantlets are to be reintroduced to their natural environment water availability becomes a limiting factor. Therefore, further research is needed to explore the role of benefic microorganisms on *M. mathildae* establishment as a factor to increase outplanted percentage of surviving.

Finally, in vitro morphogenesis observed for *M. mathildae* in our protocol allow plantlet production with a minor risk of possible genetic alterations because the hormone-free culture. Proliferation rates and in vitro plant growth assure an average of five plantlets/seed ( $1.79 \pm 0.04$  cm tall,  $1.37 \pm 0.02$  cm wide and  $25.47 \pm 0.82$  areoles) after seven months in culture; the equivalent to a three year old wild plant. Therefore, it is expected that this biotechnological approach becomes a useful method to obtain massive sets of plants for reintroduction practices.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to Fideicomiso Queretano para la Conservación del Medio Ambiente for providing access to Cañada Juriquilla Natural Protected Area. We thank Idea Wild for equipment donation for this project. This work was partially founded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71). The scholarship to the first author, granted by CONACYT (FOMIX QRO-2006-C1-53811) is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Arias, S., 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México, in: Gío, R., López-Ochoterena, E. (Eds.), *Diversidad biológica en México*, Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, vol 64 (special number).
- Brundrett, M.C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154, 275–304.
- Carrillo-Garcia, A., León de la Luz, J.L., Bashan, Y., Bethlenfalvay, G.J., 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert. *Restoration Ecology* 7, 321–335.
- Clayton, P.W., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C., Butler-Nance, S.A., 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribu Cactinae. *Journal of American Society of Horticulture Science* 115, 337–343.
- Contreras, C., Valverde, T., 2002. Evaluation of the conservation status of a rare cactus (*Mammillaria crucigera*) through the analysis of its population dynamics. *Journal of Arid Environments* 51, 89–102.
- Dávila-Figueroa, C.A., De La Rosa-Carrillo, Ma.L., Pérez-Molphe-Balch, E., 2005. In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 41, 540–545.
- de Medeiros, L.A., de Ribeiro, R.C.S., Gallo, L.A., de Oliveira, E.T., Dematte, M.E.S.P., 2006. In vitro propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84, 165–169.

- Decruse, W.S., Gangaprasad, A., Seeni, S., Saroniji-Menon, V., 2003. Micropropagation and eco restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72, 199–202.
- Escobar, H.A., Villalobos, V.M., Villegas, A., 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7, 269–277.
- Fay, M.F., Gratton, J., 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10, 33–48.
- García, R.O., Malda, B.G., 2010. Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climatic change, in: Dallmeier, F., Fenech, A., Maciver, D., Szaro, R. (Eds.), *Climate Change, Biodiversity, and Sustainability in the Americas*. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., Tucci, M., 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95, 319–332.
- Goicoechea, N., Merino, S., Sánchez-Díaz, M., 2004. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the deciduous shrub *Anthyllis cytisoides* under water deficit. *Physiologia Plantarum* 122, 453–464.
- Leirana-Alcocer, J., Parra-Tabla, V., 1999. Factors affecting the distribution, abundance and seedling survival of *Mammillaria gaumeri*, an endemic cactus of coastal Yucatán, México. *Journal of Arid Environments* 41, 421–428.
- Machado, M.F.P.S., Prioli, A.J., 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 32, 199–203.
- Malda, G., Suzan, H., Backhaus, R., 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81, 71–87.
- Martinez-Vazquez, O., Rubluo, A., 1989. In vitro mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64, 99–105.
- Moebius-Goldammer, K.G., Mata-Rosas, M., Chávez-Avila, V.M., 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus*

(Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. In *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 39, 388–393.

Mohamed-Yasseen, Y., 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton *et* Rose). In *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 38, 427–429.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–479.

Palomino, G., Dolezel, J., Cid, R., Brunner, I., Méndez, I., Rubluo, A., 1999. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term in vitro culture. *Plant Science* 141, 191–200.

Papafotiou, M., Balostis, G.N., Louka, P.T., Chronopoulos, J., 2001. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65, 163–167.

Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila-Figueroa, C.A., 2002. In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). In *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 38, 73–78.

Podwyszyńska, M., 2005. Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13, 109–122.

Poljuha, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubešić, N., Krsnik-Rasol, M., 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75, 117–123.

Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J.L., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N., 2007. In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). In *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 43, 660–665.

Rout, G.R., Das, P., Goel, S., Raina, S.N., 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39, 23–27.

- Rubluo, A., Chavez, V., Martínez, A.P., Martínez-Vazquez, O., 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological Conservation* 63, 163–169.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., 1999. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56, 163–167.
- Shepherd, T., Griffiths, W.D., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* 171, 469–499.
- Sriskandarajah, S., Prensens, E., Motyka, V., Dobrev, P.I., Serek, M., 2006. Regenerative capacity of cacti *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones, cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities. *Journal of Plant Growth Regulators* 25, 79–88.
- Stiling, P., Rossi, A., Gordon, D., 2000. The difficulties of single factor thinking in restoration: replanting a rare cactus in the Florida Keys. *Biological Conservation* 94, 327–333.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P.G., Zuberer, D., 2003. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, New Jersey.
- Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E., Paredes-López, O., 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 42, 336–340.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V., Bhagyarakshmi, N., 2007. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 10, 106–113.
- Viswambharan, S., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., Rowntree, J.K., 2006. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 42, 206–214.
- Wakhlu, A.K., Bahu, S.B., 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 36, 211–214.

## ARTÍCULO IV

### Floraison rapide de *Mammillaria mathildae* inoculé avec AM en culture aéroponique

García-Rubio, Oscar (✉) et Malda-Barrera, Guadalupe

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Boulevard de las Ciencias S/N, Juriquilla Querétaro 76230, Mexico. Tel.: +52 442 192 1200 Ext. 5327; fax: + 52 442 234 2951. E-mail address: [osrigaru@gmail.com](mailto:osrigaru@gmail.com).

### RÉSUMÉ

L'étude a été faite pour expérimenter un système aéroponique dans le but d'inoculer un consortium indigène d'AM en plantules micropropagée de *Mammillaria mathildae* et incrémenter la taille de la plante comme lors de la production des fleurs. Deux intervalles d'administration du spray (10 et 30 min) ont été testés pour la culture aéroponique. Une haute humidité relative (80-85%) générée par le court intervalle du spray a tué 18% des plantes. Par contre, 97,6% des plantules ont réchappé à une humidité relative (45-50%). AM inoculée est arrivée à 100% de la colonisation en 60 jours. Après 74 jours *M. mathildae* infestée a montré des différences significatives en taille, diamètre, et Phosphore contenu (2,0 ; 1,4 ; et  $0,552 \pm 0,01$  mg P<sup>-1</sup> par gramme de poids sec versus 2,9 ; 2,4 et  $0,334 \pm 0,01$  respectivement). 98% des plantules sont comparables en taille à des plantes de 4 ans d'âge qui ont survécu en serre. *M. mathildae* mycorhizée à 16 mois d'âge a présenté 66% de floraison en serre, pendant que les plantules non mycorhizées n'ont pas fleuri. Un an plus tard 21% des plantes non inoculées ont fleuri et ont produit  $1,6 \pm 0,3$  fleurs. Pendant ce temps, les plantes mycorhizés ont augmenté leur floraison à hauteur de 94%, et la production moyenne des fleurs à  $9,7 \pm 0,5$ . Ce projet décrit, pour la première fois, la culture aéroponique d'un cactus et la floraison incrémentée par l'inoculation d'AM qui peut améliorer la production commerciale de ce cactus en danger.

**Mots clés:** Micropropagation, inoculum indigène, cactus, aéroponique

## ABSTRACT

### **Early blooming of *Mammillaria mathildae* inoculated with AMF in aeroponic culture.**

This study was conducted to implement an aeroponic system to inoculate a native consortium of AMF in micropropagated plantlets of *Mammillaria mathildae* in order to increase plant size and flower production. Two spray intervals (10 and 30 min) were tested for the aeroponic culture. High relative humidity (80-85%) generated by the short spray interval deceased 18% of plants. In contrast, 97.6% of plantlets survived with a low relative humidity (45-50%). AMF inoculated reached 100% of colonization in 60 days. After 74 days *M. mathildae* infested showed significant differences in height, diameter and Phosphorus content (2.0, 1.4 cm and  $0.552 \pm 0.01$  mg P<sup>-1</sup> dry weight *versus* 2.9, 2.4 and  $0.344 \pm 0.01$  respectively). 98% of plantlets, comparable in size to 4 year wild plants, survived in greenhouse. Mycorrhized *M. mathildae*, 16 months old, exhibited 66% of blooming in greenhouse, while non mycorrhized plantlets did not bloom. One year later, 21% of non AMF inoculated plants flowered and produced  $1.6 \pm 0.3$  flowers. Meanwhile mycorrhized plants increased their blooming to 94%, and flower average production to  $9.7 \pm 0.5$ . This study describes, for the first time, the aeroponic culture of a Cactaceae and their improved flowering by AMF inoculum, which may enhance commercial production of this endangered cactus.

**Key words:** Micropropagation, native inoculum, cactus, aeroponic

## INTRODUCTION

Les Cactacées constituent une belle famille de plantes bien appréciées par les collectionneurs, qui les placent comme les plantes d'ornementation les plus populaires dans plusieurs pays. Malheureusement, leur distribution commerciale est limitée car leur rapport de graines et leur taux de germination sont bas de même que leur vitesse d'accroissement (Bravo-Hollis et Sánchez 1991 ; Pilbeam 1999). Cette caractéristique en addition à la destruction de son habitat et de sa sur-collecte ont promu leur inclusion (dans la norme) CITES et



dans la NOM 054 au Mexique (SEMARNAT 2002). Dans la famille Cactacée, le genre *Mammillaria* est un des plus populaires grâce à leur tige et leurs belles fleurs ; en effet, plus de 300 espèces sont cultivées comme ornementales (Anderson 2001). Les limites géographiques de distribution du genre *Mammillaria* vont de l'Amérique du Sud jusqu'aux Etats-Unis, avec un maximum de diversité et de richesse des espèces au Mexique (Butterworth et Wallace 2004).

*Mammillaria mathildae* est un cactus microendémique qui grandit peu par terre. Sa faible densité de population la rend hautement vulnérable. Sa culture en serre est une alternative qui réduit la pression sur les populations naturelles. Mais, la période pour obtenir des plantes de taille commerciale est longue, et en plus ce cactus a besoin de 5 ans pour produire des fleurs (observation personnelle) ; ce sont les conditions qui augmentent leur potentiel de vente. Il y a plusieurs rapports de micropropagation en genre *Mammillaria* sur culture tissue (Rubluo et al. 1993 ; Papafotiou et al. 2001 ; Giusti et al. 2002 ; Poljuha et al. 2003 ; Ramirez-Malagon et al. 2007) ; tous les auteurs ont rapporté avec succès un haut taux de production des plantules, et un développement vigoureux grâce à l'accommodation sous serre. Néanmoins, il n'y a pas de publication sur l'amélioration de la floraison après micropropagation pour ce genre-là.

Il a été depuis longtemps étudié que la moisissure mycorhize arbusculaire (AM) joue un rôle dans l'établissement de la plante, de l'eau et des nutriments, et une protection contre les composés biotiques de la rhizosphère (van der Heijden 2004 ; Augé 2001 ; Koide et Mosse 2004 ; Vestberg et al. 2004). Padilla et al. (2006) ont rapporté que l'inoculation avec AM augmente le pourcentage de survie de 24% à 70% de plantes micropropagées avec *Lucumo* pendant la période d'acclimatation en serre. Le Mycorhize peut influencer la pousse des plantes qui seraient affectées plus tard de plusieurs manières. Un effet documenté des plantes colonisées avec AM est l'augmentation de la production des fleurs (Mullen et Schmidt 1993). En addition le protocole d'AM inoculation avec succès a été développé dans l'application de culture aéroponique (Sylvia et Hubbell 1986). Martin-Laurent et al. (1999) ont produit *Acacia mangium* associé

avec AM ; la culture aéroponique a été faite avec succès en pousse dépêché de même que le développement du mycorhize.

Les producteurs sont en train de chercher des méthodes alternatives de culture qui réduisent le temps de production et améliorent la qualité et la matière végétale. Pourtant, l'objectif de ce projet a été d'établir un protocole pour produire des plantules de *Mammillaria mathildae* cultivé en aéroponie et inoculé avec un consortium AM afin de produire des plantes vigoureuses qui montrent un rendement significatif de floraison sous conditions de serre.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### ***M. mathildae* micropropagation**

Des explants latéraux du *Mamillaria mathildae* utilisés pour la micropropagation ont été obtenus à partir de graines germeés in vitro, comme la description faite par García et Malda (2010b). Brièvement, la régénération et l'enracinage de la plante a été consommé avec l'utilisation de régulateurs de croissance libre Murashige et Skoog (1962) moyen (MS), supplémenté avec 30 g L<sup>-1</sup> de sucre du marché, 0,1 g L<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> thiamine hydrochlorure, 0,5 mg L<sup>-1</sup> acide nicotinique, 0,5 mg L<sup>-1</sup> pyridoxine hydrochlorure et 8 g L<sup>-1</sup> d'agar.

### **Isolement de l'AM du domaine d'action**

A peu près, 500 g de terre avec des fragments des racines ont été collectés à 10 cm de profondeur, posés dans des sacs Ziploc® et transférés dans une serre pour commencer les cultures trappes. L'échantillon de terre qui a les racines mutilées a été mixé avec Hortiperl, Termalita® (1:1) et utilisé pour remplir les pots (15 cm ø et 20 hautes). *Sorghum vulgare* (ABC, 2005) a été utilisé comme plante hôte pour AM fungi. 60 à 65 graines de sorghum a été germé en pots qui contiennent le creuset de terre et gardé en conditions de serre, les plantes ont été arrosées tous les deux jours pendant 10 à 12 semaines, suite á une période de dessiccation graduelle (une ou deux semaines), afin de promouvoir la sporulation d'AM. Des cycles de propagation subséquents du sorghum ont été effectués comme la description antérieure,

avec le même mélange de terre: perlite avec les racines mutilées du sorghum et tout mélangé. Aucune fertilisation n'a été appliquée quels que soient les cycles des cultures.

### **Culture Aéroponique**

Avec la proposition d'établir les conditions de culture adéquates, les plantules de *M. mathildae* sans AM inocula ont été mis dans la chambre de puissance aéroponique (Unité d'Haute Capacité par AgriHouse, Inc. Div. Aeroponics International). Deux intervalles différents qui s'embrument (10 et 30 min) avec un spray de 5 sec ont été testés dans un design factoriel de 1 x 2. Des cultures aéroponiques ont été gardées sous une température similaire et des conditions d'illumination de culture de tissu. La solution des nutriments ont été supplémenté en MS aussi le moyen de culture de tissu (sans agar) a été remplacé chaque semaine.

### **Isolement de spore**

L'isolement des AM consortium spores a été fait par des cultures trappes. Les plantes Sorghum ont été lavées soigneusement avec de l'eau du robinet pour éliminer la terre. Les racines ont été excisées et passées au mixeur avec de l'eau distillée à grande vitesse pendant approximativement 5 secondes pour libérer des spores. Le matériel obtenu à partir du mixeur a été immédiatement passé à travers trois tamis (1 mm, 177, 45 et 38 µm). Le matériel au fond du tamis été collecté dans un gobelet. Homogénat a été additionné au 20-60% gradient de saccharose dans un tube de 25-mL et centrifugé a 1500 g pendant 3 minutes. Pellet (terre et détrit) a été jeté et le liquide surnageant a été rapidement décanté dans un tamis de 38 µm et lavé pendant 2 minutes sous l'eau du robinet et transféré dans une boîte de Pétri plate. Des spores qui apparaissent sains ont été prudemment révisés sous un microscope stéréo pour éliminer des hyphes ou détrit présents et manuellement transférés dans un tube Eppendorf de 1.5 mL pour son encaissement à 4°C pendant 48 heures. Les spores additionnels atypiques ont été éliminés et jetés à ce moment-là (International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi –INVAM–).

## **Inoculation des Plantules**

*M. mathildae* plantules ( $1,79 \pm 0,04$  cm haute et  $1,37 \pm 0,02$  cm diamètre en moyen) ont été inoculées pour verser sur les racines 200  $\mu\text{L}$  de  $15 \text{ g L}^{-1}$  d'alginate sodium solution qui contient  $1025 \text{ spores mL}^{-1}$ . Les racines ont été trempées immédiatement dans une solution  $0,05 \text{ M CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pour la solidification d'alginate comme Weber et al. (2005) l'ont décrit. Les plantules ont été arrangées dans la chambre de puissance aéroponique et a été placé comme déjà décrit.

## **Estimation d'AM colonisation**

Des racines *M. mathildae* ont été nettoyées et coupées en section de 1 cm; ils étaient dissipés en 10% KOH (pd/vol) et rincés en eau distillée. Les racines étaient tachées comme Vierheilig et al. (1998) l'ont décrit. Egalement décrit par Giovannetti et Mosse (1980), 30 portions de racines ont été examinées pour la colonisation des mycorhizes avec l'utilisation d'une méthode d'intersection de grilles dans une magnification de 40X en employant un microscope à lumière. La fréquence d'infection du mycorhize (F%) a été calculée par  $\text{IR} \times 100/\text{TR}$ , où IR correspond aux racines infectées et TR évoque les segments totaux des racines.

## **Durcissement sous Serre**

Les plantules *M. mathildae* ont été transplantés dans des pots de 2.5 cm  $\varnothing$  avec un mélange de terre commerciale pour remise (1:1 Pro-Moss, Premier® et Hortiperl, Termalita®), couvert pendant la première semaine avec un dais en plastique et arrosés chaque jour pour se climatiser. Des plantes ont été gardées à la même température et pendant la photopériode du procédé de la micropropagation, avec 40% d'HR. Dans la deuxième semaine elles ont été transférés sous serre et sous un net d'ombre qui réduit de 50% l'incidence solaire ( $451,7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en moyenne). Les plantules ont été arrosées deux fois par semaine. Après 5 mois, 98% des plantules ont survécu dans ces conditions. L'intensité de la lumière a été enregistrée avec un détecteur quantique (LI-COR model LI-190). L'enregistrement de la température et de l'HR était fait avec un capteur HOBO H8 par séries (Onset Computer Corporation 2000).

## **Détermination de Phosphore**

P contenu a été testé par micro digestion Kjeldahl des plantules seches de *M. mathildae*, inoculé avec ou sans AM deux mois avant. Les Plantules ont été séchées dans un four 48 h à l'avance à 70°C et pesées. Les plantules ont été écrasées pour obtenir une fine poudre ; 0,2 g ont été digérés par de l'acide sulfurique concentré en employant la méthode de réaction du chlorure d'étain (Allen 1989). Chaque traitement comportait 4 répliques.

## **Analyses Statistiques**

Toutes les experiences ont été réalisées à l'aide d'un design complètement aléatoire avec deux répliques et analysés avec ANOVA  $P < 0,05$ , et des moyennes comparées avec le test de Tukey-Kramer en  $P < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été faites en employant le logiciel statistique JMP 6.0 (SAS Institute, Inc. 2005).

## **RÉSULTATS**

### **Micropropagation et culture aéronique**

En suivant la méthode décrite par Garcia et Malda (2009b), les plantules vigoureuses de *M. mathildae* ont été micropropagées en sept mois avec  $1,79 \pm 0,04$  cm de haut et  $1,37 \pm 0,02$  cm de large en moyenne. Les plantules ont été transférées dans une chambre aéronique et deux intervalles de spray ont été testés (table 1). Pour un intervalle de 10 min, un taux de 80-85% HR a été enregistré. 18% des plantules ont présenté un caractère de putréfaction dans les systèmes de racines, avec une flétrissure postérieure de la plante. Au contraire, 30 min d'intervalle dans un régime du spray, ont généré une HR entre 45-50%, et les plantules ont augmenté leur taux de survie à 97.6% ( $F=632025$  Prob.  $>F < 0,0001$ ). Ce taux de survie a été jugé acceptable ; par conséquent ce régime d'eau a été utilisé pour les expériences suivantes.

### **Effet de la colonisation par l' AM sur la croissance de *M. mathildae***

La taille initiale des deux expériences n'a pas montré de différence significative en hauteur ou en diamètre ( $F=0,1879$  Prob.  $>F < 0,6651$  et  $F=0,432$  Prob.  $>F < 0,5116$  respectivement). Suite à l'inoculation d'AM, le taux de

colonisation a été plus rapide. En 30 jours plus de 60% de plantules ont été infestées. A ce moment-là, la différence en hauteur entre les deux traitements était évidente. Après 60 jours les plantules du *M. mathildae* étaient arrivées à 100% de colonisation (fig. 1). Après 74 jours, des différences significatives en hauteur et en diamètre (2,0 et 1,4 cm versus 2,9 et 2,4 cm) ont été enregistrées entre les plantules témoins et les plantules inoculés par l'AM (F=116,5583 Prob. >F<0,0001 et F=142,8389 Prob. >F< 0,0001 respectivement). Le dépôt de phosphore a été plus fort pour les plantules colonisées par rapport aux plantules témoins (0,552±0,01 versus 0,344±0,01 mg P-1 poids secs). Ces plantules ont été transférées sous serre. Après 6 mois, 98% des plantules ont survécu sous ces conditions.

Table 1. Pourcentage de survie de *M. mathildae* après quatre semaines dans une culture aéroponique avec deux intervalles de spray différentes.

	Intervalle du spray	
	10 min	30 min
<i>M. mathildae</i>		
survie (%)	81,7	97,6

n = 120

### Production de Fleurs

Après une période de 3,5 à 4 mois sous serre, les plantules de *M. mathildae* qui avaient été colonisées avec AM ont produit des boutons. En ce stade, environ 66% d'entre eux ont formé des fleurs pendant le mois suivant (table 2). Ces plantes ont produit 5 fleurs en moyenne pendant la saison de floraison (d'avril à fin juin) alors que les plantes non colonisées n'ont pas produit de bouton. La saison suivante de floraison a été enregistrée de fin février à début mai 2009 (Figure 2). Pendant cette saison les deux types de plantes : inoculées et non inoculées avec AM ont fleuri. Néanmoins, seulement 21% des plantes non inoculées ont fleuri et produit une moyenne de 1,6 fleurs. En attendant, les

cactus mycorhizèe ont augmenté leur pourcentage de floraison à 94%, et doublé leur production moyenne de fleurs.

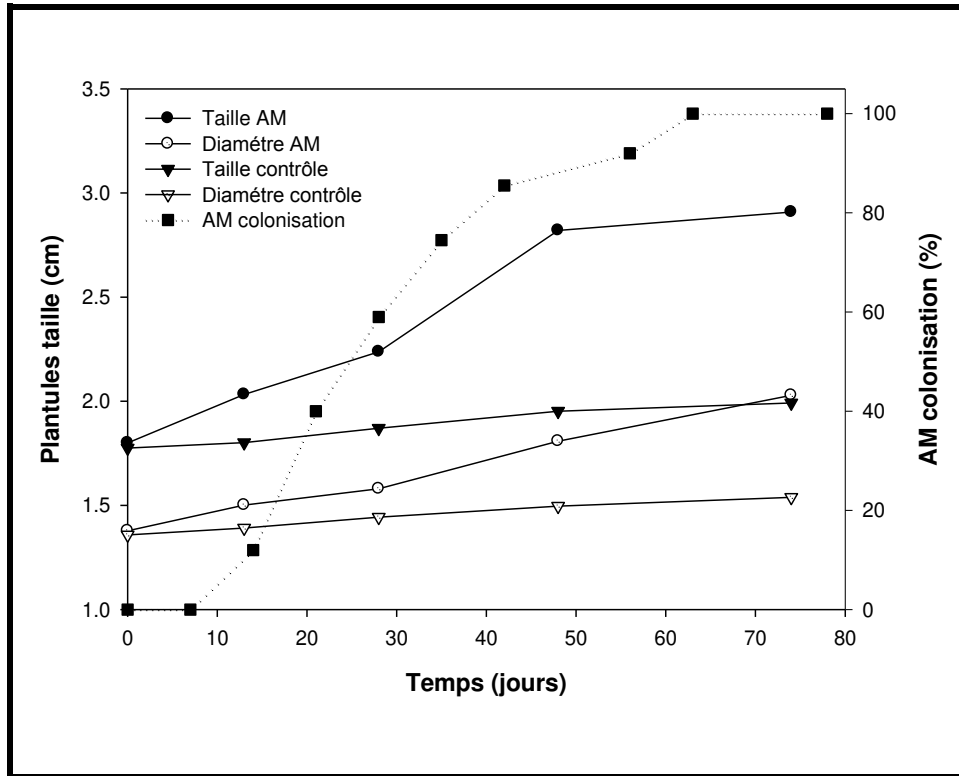


Figure 1. Grandissement de plantules *M. mathildae* dans une chambre aéroponique.

Table 2. Production de fleurs *M. mathildae* inoculées et non inoculées avec AM, après 6 mois de croissance sous serre.

	Floraison (%) <sup>a</sup>		# de Fleurs/plante <sup>a</sup>	
	16 m	26 m	16 m	26 m
<i>M. mathildae</i>				
control	0	21	-	1,6±0,3
<i>M. mathildae</i>				
AM inoculée	66	94	5±0,5	9,7±0,5

<sup>a</sup> Moyennes ± S.E., *n* = 100.

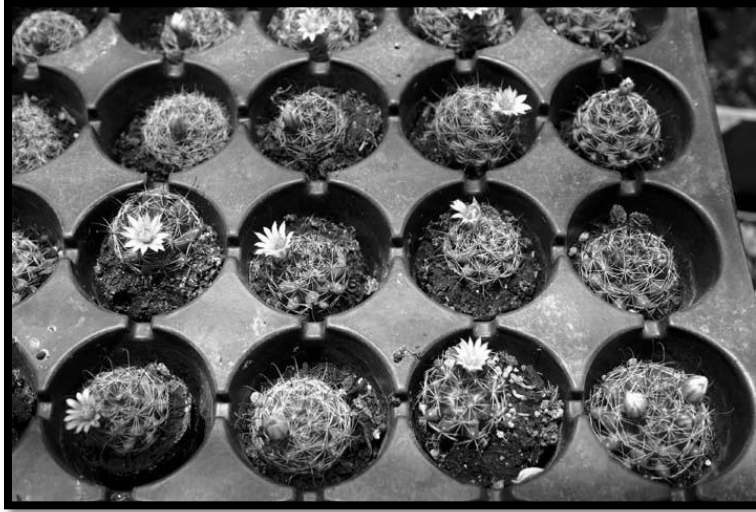


Figure 2. Plantules de *M. mathildae* qui ont fleuri sous serre.

## DISCUSSION

### Développement de plantes en système aéroponique

La technique aéroponique a été implémentée avec succès pour la culture des espèces ligneuses (Martin-Laurent et al. 1999 ; Weber et al. 2005) ; elle a même été utilisée en pépinières commerciales de légumes frais (Kay et Lee 1995 ; Cho et al. 1996 ; Park et al. 1997 ; He et Lee 1998 ; Biddinger et al. 1998), de tubercules (Ritter et al. 2001 ; Chang et al. 2008), et de plantes ornementales (Scoggins et Mills 1998 ; Molitor et al. 1999). Néanmoins, il n'y a pas d'essais dans la famille des Cactacées. L'intervalle entre les sprays et la durée du spray devrait être testée pour chaque espèce particulière, car chaque espèce de plante a besoin de différents niveaux d'humidité. Weber et al. (2005) ont ajusté les intervalles de spray à 40 sec de durée avec des intervalles de 30 sec pour la culture aéroponique d'*Acacia mangium* (un arbre tropical) pour obtenir une HR de 80-85%. Pour des légumes verts, le fabricant de la chambre aéroponique fait la recommandation d'utiliser le spray pendant 3 sec avec des intervalles de 5 ou 10 min, ce qui donne une HR similaire. Puisque *M. mathildae* est sensible au excès d'eau dans son habitat naturel, deux intervalles de spray ont été testés : 10 min ont montré un effet délétère sur le taux de survie de *M. mathildae* ; et 30 min a permis de réduire le HR dans la chambre d'aspersion. Cette application



pulsée de solutions nutritives, a maintenu une atmosphère entre 45-50% HR, qui contient un environnement riche en oxygène, qui permet un grandissement plus rapide en contraste de terre germée et plantes développées (donnée non démontré). Par contre, cette atmosphère hautement aérée a promu une haute colonisation d'AM inoculum. Notre résultat conforte Bagyaraj (1991), qui signale la haute aération améliorée par la mycorhize des racines. Récemment, Kratsch et al. (2006) ont démontré qu'une atmosphère riche en O<sub>2</sub> provoque une nodulation profuse en 4 semaines. Dans notre système les plantules de *M. mathildae* été colonisées avec succès par AM en 8 semaines.

Les inoculum d'AM efficaces sont ceux qui produisent l'augmentation de croissance de la plante. La concentration de P était proche de 40% de plus que le témoin, cela veut dire qu'en absence d'association avec les mycorhizes *M. mathildae* n'était pas capable de récolter suffisamment de P pour maintenir des niveaux adéquats dans ses tissus, malgré la plus grande réduction de croissance de la plante. En 3 mois, les plantules inoculées avec AM sont arrivées à une taille équivalente à un cactus sauvage de 4 ans d'âge. Ces conditions là ont facilité le transfert de cactus en serre, où le plantes ont montré un taux élevé de survie (98%). AM peut être associé à une tolérance plus grande pour le transplant et le durcissement de cette espèce.

### **Induction de floraison par AM**

Les mycorhizés ont promu la prolifération végétative extensive ; qui par conséquent, peut être rapide pour produire des marchandises pour les commerçants, comme les légumes ou les tubercules (Biddinger et al. 1998 ; Chang et al. 2008), le bois (Martin-Laurent et al. 1999), et les fleurs (Molitor et al. 1999). Toutes ces investigations ont rapporté une augmentation significative en composés végétaux.

Dans son habitat naturel la floraison de *M. mathildae* se déroule approximativement en 5 ans. Pour cette espèce, plus que la température ou la photopériode, la précipitation provoque la floraison (García et Malda 2010a). *M. mathildae* montres une moyenne de 16±5,22 fleurs en plantes sauvages avec une taille entre 2,30-2,79 cm de diamètre. Le taux maximum de floraison de *M.*

*mathildae* sauvage est arrivé au début et à mi-avril ; cependant, cette période dépend du début de la saison de pluie (García et Malda 2010a). Les plantules inoculées avec AM qui avait été transféré sous serre ont fleuri dans la même période en 2008 et 2009 que celles qui ont grandi dans des conditions naturelles ; pourtant AM n'as pas d'influence dans la saison de floraison. La floraison est contrôlée par des facteurs qui causent l'environnement et des signaux endogènes. La photopériode et la température sont les facteurs abiotiques les plus importants qui peuvent influencer l'initiation de la floraison et du développement (Yong et al. 2000). Quelques agents biotiques peuvent être inclus indirectement dans l'induction florale. Parmi ces agents possibles se trouvent les partenaires symbiotiques du mycorhizes, puisque les moisissures font facilement l'allocation de P et la consommation d'eau (Koide et Mosse 2004) des composés indispensables à la formation des boutons des fleurs. Dans cette expérience, AM a augmenté significativement le contenu de P en *M. mathildae*. Les plantes de *Zantedeschia* ont augmenté leur production des fleurs quand elles étaient inoculées avec *Glomus intraradices* (Scagel et Schreiner 2006). Ces auteurs ont rapporté que *G. intraradices* peut augmenter la productivité et la qualité des plantes qui possèdent des fleurs au travers de la déposition de P qui se trouve associé au poids des bulbes ainsi que la composition, le nombre de fleurs et la longévité, et l'initiation d'anthèse ; également, l'allocation du carbone et des nutriments entre feuilles et structures des fleurs. Gange et Smith (2005) ont rapporté que les mycorhizes augmentent d'environ 70% le nombre total de fleurs en *Centaurea cyanus* une plante annuelle à fleurs.

A notre connaissance, il n'y a pas de rapport en inoculation d'AM qui améliore la production de fleurs en cactus et leur qualité. Les traits de taille et la floraison de la plante ont été augmentés aux lots du *M. mathildae* ; les deux caractéristiques augmentent les caractéristiques commerciales de cette plante. Particulièrement, le nombre et la taille des fleurs lui confèrent un côté esthétique qui augmente la qualité commerciale de la plante. Ces caractéristiques peuvent améliorer l'aspect de la plante et la satisfaction du consommateur, en stimulant des achats successifs.

## Coûts de production

Beaucoup de projets ont reconnu que la micropropagation de cactus est un instrument utile pour la production d'un grand nombre de plantes en peu de temps (Mata Rosas et al. 2001 ; Moebius-Goldammer et al. 2003 ; Santos-Díaz et al. 2003). Malheureusement, les forts coûts de production peuvent faire que l'utilisation de cette technique ne soit pas soutenable pour la production de plantes ornementales. Néanmoins, quelques circonstances peuvent justifier l'application de la culture de tissu pour la micropropagation des plantes : quand les autres méthodes sont trop lentes ou trop chères, pour augmenter de nouvelles cultures rapidement, pour maintenir et distribuer des plantes d'élite en vue de leur propagation (Ibaraki et Gupta 2006).

Dans ce projet, un cactus en danger a été micropropagée avec succès. En 10 mois nous avons obtenu des plantes similaires à des plantes sauvages de 4 ans d'âge, qui ont été capables de produire des fleurs 6 mois plus tard ; le temps pour obtenir ces conditions a été réduit significativement. De plus, afin de réduire les coûts de production, notre protocole a substitué de l'eau doublement distillée par de l'eau distillée ; le glucose par du sucre raffiné, et supprimé l'utilisation de régulateurs de croissance. Puisque le glucose est le composé principal du medium et contribue ensemble avec les hormones à un plus grand coût de produit finale, ce medium nutritif était moins chère. Namdeo et al. (2006) ont estimé une réduction de coût d'environ 25 quand ils ont omis l'utilisation de glucose.

Par contre, les racines colonisées avec AM ont été bien effectives dans la chambre aéronique. L'utilisation des AM lignées pour améliorer la croissance des plantes a été rapporté (Vestberg et al. 2004; Zandavalli et al. 2004; Aliasghar zad et al. 2006). Cependant, l'isolation d'une lignée native d'AM a s'est révélée comme un bio-amplificateur qui peut améliorer le temps et le coût de production. Une autre approche, inclut l'utilisation d'un mélange commercial d'AM et d'autres microorganismes, comme généralement les bactéries (Rincón et al. 1993 ; Kiers et al. 2000 ; Jaychandran et Shetty 2003 ; van der Heijden 2004). Actuellement, beaucoup de produits commerciaux sont constitués de ces

mélanges (Gianinazzi et Vosátka 2004). Dans notre expérience, le consortium indigène d'AM a amélioré avec succès la croissance et l'aspect (nombre de fleurs) de *M. mathildae*. Des mélanges commerciaux de « moisissures qui encouragent la croissance » sont disponibles ; toutefois, nous ne recommandons pas leur utilisation, puisque chaque inoculum particulière d'AM peut promouvoir des différences dans la création de la plante qui est différente selon les espèces (Munkvold et al. 2004 ; Koch et al. 2006).

En résumé, les deux technologies peuvent être implémentées pour optimiser les systèmes de production. Elles présentent un coût intéressant pour la production de *M. mathildae*. Nous espérons que le succès de la propagation de ce mammillaria en danger et sa production à un niveau commercial pourra satisfaire les demandes de marché et représenter une moyenne efficace pour sauvegarder des populations sauvages. De même, il est possible d'utiliser ces plantes pour retrouver des populations en danger.

## **REMERCIEMENTS**

Nous remercions en particulier Alba Caiceros et Céline Allouche pour la préparation et la révision du manuscrit. Nous remercions Idea Wild pour la donation de l'équipement utilisé pour ce projet. Ce travail a été partialement fondé par le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Projet CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71). La bourse d'études pour le premier auteur a été financée par CONACYT (FOMIX QRO-2006-C1-53811) pour qui nous sommes très reconnaissants.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aliasghar zad, N., Neyshabouri, M. R. et Salimi, G. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* on drought stress of soybean. *Biologia*, Bratislava 19: S324–S328.
- Allen, M. F. 1989. Mycorrhizae and rehabilitation of disturbed arid soils: processes and practices. *Arid Soil Res.* 3: 229–241.
- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press, Portland OR. 776 pp.

- Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3–42.
- Bagyaraj, D. J. 1991. Ecology of vesicular arbuscular mycorrhizae. In Arora, D. K., Raj, B., Mukerji, K. G., Knudsen, G. R. (eds.) *Handbook of applied mycology*. Vol. 1: soil and plants. Marcell Dekker Inc, New York, NY. 464 pp.
- Biddinger, E. J., Liu, C. M., Joly, C. M. et Raghothama, K. G. 1998. Physiological and molecular responses of aeroponically grown tomato plants to phosphorus deficiency. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 330–333.
- Bravo-Hollis, H. et Sánchez, M. H. 1991. *Las Cactáceas de México*. Vol. 3. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 643 pp.
- Butterworth, C. A. et Wallace, R. S. 2004. Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae) insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *Am. J. Bot.* 91-7: 1086–1098.
- Chang, D. C., Park, C. S., Kim, S. Y., Kim S. J. et Lee, Y. B. 2008. Physiological growth responses by nutrient interruption in aeroponically grown potatoes. *Am. J. Pot. Res.* 85: 315–323.
- Cho, Y. D., Kang, S. G., Kim, Y. D., Shin, G. H. et Kim, K. T. 1996. Effects of culture systems on growth and yield of cherry tomatoes in hydroponics. *J. Agr. Sci.* 38: 563–567.
- Gange, A. C. et Smith, A. K. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi influence visitation rates of pollinating insects. *Ecol. Entomol.* 30: 600–606.
- García, R. O. et Malda, B. G. 2010a. Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climatic change. In: Dallmeier, F., Fenech, A., Maciver, D., Szaro, R. (Eds.), *Climate Change, Biodiversity, and Sustainability in the Americas*. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- García, R. O. et Malda, B. G. 2010b. Micropropagation and reintroduction of *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to their natural habitat. *HortScience* (In press).
- Gianinazzi, S. et Vosátka, M. 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Can. J. Bot.* 82: 1264–1271.

- Giovannetti, M. et Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489–500.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F. et Tucci, M. 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Sci. Hortic.* 95: 319–332.
- He, J. et Lee, S. K. 1998. Growth and photosynthetic responses of three aeroponically grown lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.) to different root zone temperatures and growth irradiances under tropical aerial conditions. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 73: 173-180.
- Ibaraki, Y. et Gupta, S. D., 2006. *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer. Netherlands. 480 pp.
- Jayachandran, K. et Shetty, K. G. 2003. Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquat. Bot.* 76: 281–290.
- Kay, C. C. et Lee, S. K., 1995. Nutrient content in vegetables grown in soil and soilless systems. *ASEAN Food J.* 10: 1–5.
- Kiers, E. T., Lovelock, C. E., Krueger, E. L. et Herre, E. A. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecol. Lett.* 3: 106–113.
- Koch, A. M., Croll, D. et Sanders, I. R. 2006. Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecol. Lett.* 9: 103–110.
- Koide, R. T. et Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145–163.
- Kratsch, H. A., Graves, W. R. et Gladon, R. J. 2006. Aeroponic system for control of root-zone atmosphere. *Environ. Exp. Bot.* 55: 70–76.
- Martin-Laurent, F., Lee, S. K., Tham, F. Y., He, J. et Diem, H. G. 1999. Aeroponic production of *Acacia mangium* saplings inoculated with AM fungi for reforestation in the tropics. *Forest Ecol. Manag.* 122: 199–207.

- Mata-Rosas, M., Monroy de la Rosa, M. A., Moebius-Goldammer, K. et Chávez-Avila, V. M. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. P.* 37: 400–404.
- Molitor, H. D., Fischer, M. et Popadopoulos, A. P. 1999. Effect of several parameters on the growth of chrysanthemum stock plants in aeroponics. Volume I. *Acta Horticulturae* 481: 179–186.
- Moebius-Goldammer, K., Mata-Rosas, M. et Chávez-Avila, V. M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. P.* 39: 388–393.
- Mullen, R. B. et Schmidt, S. K. 1993. Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adoneus*: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia* 94: 229–234.
- Munkvold, L., Kjøller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S. et Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164: 357–364.
- Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–479.
- Namdeo, A. G., Mahadik, R. R., et Kadam, S. S. 2006. Cost effective medium for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. *Pharmacognosy Magazine* 2-8: 227–231.
- Padilla, I. M. G., Carmona, E., Westendorp, N. et Encina, C. L. 2006. Micropropagation and effects of mycorrhiza and soil bacteria on acclimatization and development of lucumo (*Pouteria lucuma* R. and Pav.) Var. La molina. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Pl.* 42: 193–196.
- Papafotiou, M., Balostis, G. N., Louka, P.T. et Chronopoulos, J. 2001. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65: 163–167.
- Park, H. S., Chiang, M. H. et Park, H. S. 1997. Effects of form and concentration of nitrogen in aeroponic solution on growth, chlorophyll, nitrogen contents and

enzyme activities in *Cucumis sativum* L. plant. J. Korean Soc. Hortic. Sci. 38: 642–646.

Pilbeam, J. 1999. *Mammillaria*. The cactus file. Handbook 6. Nuffield Press, Oxford UK. 376 pp.

Poljuha, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubešić, N. et Krsnik-Rasol, M. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in in vitro culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75: 117–123.

Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., Nuñez-Palenius, H. G. et Ochoa-Alejo, N. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). In Vitro Cell Develop. Biol. Pl. 43: 660–665.

Rincón, E., Huante, P. et Ramírez, Y. 1993. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*. Mycorrhiza 3: 79–81.

Ritter, E., Angulo, B., Riga, P. Herran, C., Relloso, J. et San José, M. 2001. Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. Potato Res. 44: 127–135.

Rubluo, A., Chavez, V., Martínez, A. P. et Martínez-Vazquez, O. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. Biol. Conserv. 63: 163–169.

Santos-Díaz, M., Méndez-Ontiveros, R., Arredondo-Gómez, A. et Santos-Díaz, M. 2003. In vitro organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. P. 39: 480–484.

Scagel, C. F. et Schreiner, R. P. 2006. Phosphorus supply alters tuber composition, flower production, and mycorrhizal responsiveness of container-grown hybrid *Zantedeschia*. Plant Soil 283: 323–337.

Scoggins, H. L. et Mills, H. A. 1998. Poinsettia growth, tissue nutrient concentration, and nutrient up take as influenced by nitrogen form and stage of growth. J. Plant Nutr. 21: 191–198.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas



- de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo de 2002, Primera sección, México, D. F.
- Sylvia, D. M. et Hubbell, D. H. 1986. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259–267.
- van der Heijden, M. G. A. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecol. Lett.* 7: 293–303.
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., Devos, N., Weekers, F., Kevers, C., Thonart, P., Lemoine, M. C., Cordier, C., Alabouvette, C. et Gianinazzi, S. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Appl. Soil Ecol.* 27: 243–258.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. et Piché, Y. 1998. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64-12: 5004–5007.
- Weathers, P. J. et Zobel, R. W. 1992. Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. *Biotechnol. Adv.* 10: 93–115.
- Weber, J., Ducouso, M., Tham, F. Y., Nourissier-Mountou, S., Galiana, A., Prin, Y. et Lee, S. K. 2005. Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. in aeroponic culture. *Biol. Fert. Soils.* 41: 233–239.
- Yong, W., Chong, K., Xu, Z., Tan, K. et Zhu, Z. 2000. Gene control of flowering time in higher plants. *Chinese Sci. Bull.* 45-1: 1–8.
- Zandavalli, R. B., Dillenburg, L. R. et de Souza, P. V. 2004. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum* App. *Soil Ecol.* 25: 245–255.

## **Artículo V**

### **Reintroduction survival improvement of *Mammillaria mathildae* plantlets inoculated with native AMF consortium**

Oscar García-Rubio(✉) & Guadalupe Malda-Barrera.

Laboratorio de Ecología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Boulevard de las Ciencias S/N, Juriquilla Querétaro 76230, México. E-mail address: [osrigaru@gmail.com](mailto:osrigaru@gmail.com).

#### **ABSTRACT**

Low survival of reintroduced plantlets originated by micropropagation is frequent due to herbivory and water stress, or to special plant association (nursery) requirements. It is known that mycorrhizal fungi confer advantages to plants to cope with some of these problems. Using a dual technology of micropropagation in addition to native mycorrhizal inoculation by means of aeroponic growth chamber, *Mammillaria mathildae* plantlets with an average size similar to four year wild specimens ( $2.91 \pm 0.05$  cm tall and  $2.03 \pm 0.03$  wide) were obtained in 10 months. These plants were reintroduced to their natural habitat at the end of the rain season in 2007, and 6 months later, during the dry season, they exhibited 89% survival. In contrast, survival rate of non mycorrhized plantlets was 51%. Mycorrhizal inoculum promoted superior growth rate and P accumulation in this cactus. Both, larger size and high water uptake capacity conferred by mycorrhizal fungi consortium, increased the resistance of *M. mathildae* to hydric stress in wild conditions and therefore a superior fitness. Finally, 14% of mycorrhized plantlets produced flowers during the blooming season.

**Keywords:** Aeroponic; Cactus; Micropropagation; Native AMF consortium; Water stress

#### **INTRODUCTION**

Anthropogenic actions like habitat destruction, poaching, livestock, agriculture, and other factors threaten biodiversity. In Mexico many species have become extinct or are endangered due to such threats, especially endemic

species. Although species conservation could be successfully achieved and given an advantage through the management of wild populations (*in situ* conservation), *ex situ* strategies are necessary to preserve many organisms (Viswambharan 2006). Eventually a synergy of both strategies will establish an effective conservation strategy.

Production of plants with representative genetic diversity of a population in order to use them for reintroduction protocols could take some years; particularly, if plants present low growing rates (Pérez-Molphe-Balch and Dávila-Figueroa 2002). *In vitro* micropropagation is useful for a large number of plants that present this characteristic (Viswambharan et al. 2006). For the past years, *in vitro* micropropagation (*ex situ* technique) has been used to increase numbers of threatened plants of commercial interest, particularly with conservation aims (Sudharsan et al. 2003; Bunn et al. 2005), by reducing commercial collection (Ramirez-Malagon et al. 2007), but also to obtain pharmacologically active compounds (Uei-Chern et al. 2006). Furthermore, an interesting approach must be its application for reintroduction programs. Some authors reported successful reintroductions of micropropagated plantlets in botanical gardens, such as *Mammillaria san-angelensis* that achieved 91% survival (Rubluo et al. 1993), or Giusti et al. (2002) who reported a successful reintroduction and even a blooming event. In contrast, when reintroduction is performed in wild conditions the survival rate is low. Survival rate in field, for some orchids, varies from 15 to 70%, although flowering was not registered (Rubluo et al. 1993). Decruse et al. (2003) reported reintroduction of the orchid *Vanda spathulata*, with a survival rate between 50-70%; whereas Stiling et al. (2000) reported that cactus *Opuntia corallicola* planting out reached 65% survival. Some causes for low *in situ* survival rates include low growth rates presented when plants are returned to their habitat (Bashan et al. 2000), high temperatures and difficulty to uptake water and nutrients (Bethlenfalvay et al. 1984; Carrillo-Garcia et al. 1999), herbivory (Leirana-Alcocer and Parra-Tabla 1999) and stem browning due to pathogens infection (Stiling et al. 2000). Reintroduction of micropropagated or greenhouse/nursery derived plants must consider that wild plants are associated

with a wide diversity of bacteria and fungi (Brundrett 2002). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play fundamental role increasing plant absorption of phosphates and water uptake (Sylvia et al. 2003; Koide and Mosse 2004); therefore, these symbionts could diminish some of the harsh conditions affecting plants for reintroductions.

Many evidences support the fact that AMF play a critical role in plant establishment (van der Heijden 2004), water and nutrient uptake (Augé 2001; Koide and Mosse 2004), soil aggregation (Rillig and Steinberg 2002) and protection against biotic components of the rhizosphere (Vestberg et al. 2004). In agro systems, selection of efficient inoculants is critical for the plantation success. Recently, commercial mixes of “growth enhancers microorganisms” are available; however, some researchers sustain that the use of native inoculum could be more effective (Calvente et al. 2004). This must be certainly true if the reintroduction target is a wild system. Also, it is preferable not to introduce alien microorganisms into the target system, because we do not know how this biotic component can alter local plant ensembles (Rudgers et al. 2004). This can lead to undesired results, like native species displacement or over dominance of a particular species. Schwartz et al. (2006) mentioned that introductions of mycorrhizal fungi may lead to unintended negative, and potentially costly, consequences for natural protected areas management. Besides, even if a commercial inoculum containing varieties of local species is applied, these can present genetic variability that could cause differences in plant performance (Munkvold et al. 2004; Koch et al. 2006).

*Mammillaria mathildae* is an endemic cactus confined to central Mexico; their populations are diminished as a result of urban development of Queretaro City. Nowadays, two low density localities remain. In 2007 Cañada Juriquilla's population registered 133 plants (García and Malda 2010a). The low number of individuals makes it necessary to take immediate actions to recover this cactus. Recently García and Malda (2010b) developed a micropropagation protocol for *M. mathildae* excluding any exogenous hormones addition, to obtain in 7 months, the equivalent to a three year old wild plant with a greenhouse survival of 98%;

however, a 48% survival was observed after its reintroduction in an experimental plot; assuming that water availability was associated with population decay in the first month.

In this context, the aim of the present study was to isolate an effective growth enhancer by means of a native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) consortium and inoculate it through an aeroponic culture in micropropagated plantlets, in order to enhance cactus establishment under wild conditions. After reintroduction, water scarcity and low nutrients availability was constant, so symbiotic partners were expected to express their full benefits under these conditions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reintroduction area**

Around Querétaro City, Mexico *M. mathildae* grows in two populations. Cañada Juriquilla encloses the largest protected population of *M. mathildae* registered (133 individuals in 2007). This area is located North of Querétaro City in the province of Juriquilla, at 1890 m of altitude, between 20° 41' 35.2" N and 100° 27' 16.4" W. Vegetation is dominated by deciduous tropical forest in a satisfactory conservation status. It is dominated by trees (e.g. *Lysiloma microphylla*, *Bursera fagaroides*, and *Ceiba aesculifolia*), 3 to 7 m high, which loose their canopy for 6 to 7 months periods (dry season). During rainy season, shrubs (e.g. *Jatropha dioica*, *Anisacanthus quadrifidus*, *Ipomea purpurea*, *Caliandra eriophylla*, *Cardiospermum halicacabum*, and *Karwinskia humboldtiana*) considerably increase their foliage. Vegetal community is associated with desert crasicale scrub elements (*Myrtillocactus geometrizans*, *Nicotecereus serpentinus*, *Stenocereus dumortierii*, *Mammillaria magnimamma*, *M. polythele*, *Opuntia pubescens* and *O tomentosa*). In the area an invasive grass species was found (*Melinis repens*). Soil is scarce, with good drainage, and the area is dominated by abundant igneous rocks.

Characterization of study area was assessed by its microclimatic conditions. Solar radiation was determined as total photosynthetic photon flux

(PPF), expressed as  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , using a quantum sensor (LICOR model LI250) and interpolating reference readings from a second sensor to calculate leaf area indices (Welles 1990). In a transect survey within *M. mathildae* population (70 m long) PPF readings were recorded below canopy (by triplicate) every 10 m, avoiding direct solar illumination in the sensors. Superficial temperature was determined with an infrared temperature sensor (Tel-Tru 05025). Daily precipitation data were obtained from CONAGUA's (National Ministry of Water) meteorological station "Querétaro" (20° 35' N: 100° 24' W).

### **Plant material**

Plantlets of *Mammillaria mathildae* were obtained as described by García and Malda (2010b). Lateral explants obtained from *in vitro* germinated seeds were used for micropropagation. *In vitro* areole activation and rooting were achieved implementing an hormone free Murashige and Skoog (1962) medium (MS), supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, 0.1 g l<sup>-1</sup> *myo*-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> thiamine hydrochloride, 0.5 mg l<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg l<sup>-1</sup> pyridoxine hydrochloride and 8 g l<sup>-1</sup> agar. Plantlets were maintained *in vitro* at 26±1° C under a total photosynthetic photon flux of 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provided by cool fluorescent lamps, in a 16 h photoperiod for a seven months period, prior their AMF inoculation and *ex vitro* acclimatization.

### **AMF inoculum**

Soils collected from *M. mathildae* rhizosphere, and from several plants associated to it (*J. dioica*, *O. pubescens*, *M. repens*, and *L. microphylla*) as well as bare soil from the study area, were used to initiate trap cultures. Approximately, 500 g of soil with roots fragments were collected at a 10 cm depth, placed in Ziploc<sup>®</sup> bags and transferred to greenhouse to initiate the trap cultures. Soil sample containing chopped roots was mixed with Hortiperl, Termalita<sup>®</sup> (1:1) and used to fill pots (15 cm ø and 20 tall). *Sorghum vulgare* (ABC, 2005) was used as host plant for AMF fungi, 60 to 65 seeds were germinated on pots containing the soil mixture and maintained under greenhouse conditions, watering plants every two days for a total period of 10 to 12 weeks, following by a gradual desiccation period (one or two weeks), in order to promote

AMF sporulation. Subsequent *S. vulgare* propagation cycles were performed as previously described, using the same soil: perlite mixture with *S. vulgare* roots chopped and mixed with it. No fertilization was applied in all trap culture cycles.

### **Spores assessment**

Isolation of spores was made from trap cultures. *S. vulgare* plants were gently washed with tap water to remove soil. Roots were excised and then blended with distilled water at high speed for approximately five seconds to release spores. Blended material was immediately poured through three sieves (1 mm, 177, 45 and 38  $\mu\text{m}$ ). Material on the bottom sieve was collected in a beaker. Homogenate was added to a 20-60 % sucrose gradient in 25-ml tube and centrifuged at 1500 g for 3 minutes. Pellet (soil and detritus) was discarded and supernatant was quickly decanted into 38  $\mu\text{m}$  sieve and washed for 2 minutes under tap water and transferred to a Petri dish. Healthy appearing spores were carefully checked under a stereomicroscope to remove any hypha or detritus present and manually transferred to a 1.5 ml eppendorf tube for their storage at 4° C for 48 hours. Any additional atypical spores were removed and discarded at this time (International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi -INVAM-). For soil spores assessment, 50 g of soil were dissolved in tap water, homogenized for 3 min, rest for 1 min, and immediately poured through sieves following the method previously described.

### **Plantlet inoculation and aeroponic culture**

Seven month old *M. mathildae* plantlets (1.79 $\pm$ 0.04 cm tall, 1.37 $\pm$ 0.02 cm wide and 20.82 $\pm$ 0.21 areoles in average) were inoculated by pouring over their roots 200  $\mu\text{l}$  of 15 g l<sup>-1</sup> sodium alginate solution containing 1,025 spores ml<sup>-1</sup>. Roots were immediately soaked in a 0.05 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O solution for alginate solidification following Weber et al. (2005). Plantlets were arranged on an aeroponic growth chamber (High capacity unit by AgriHouse, Inc. Div. Aeroponics International). Nutrient MS medium previously described was used as a nutrient solution. Roots were misted during five seconds every 30 minutes. Culture was maintained at 26 $\pm$ 1° C and illuminated under the same conditions as in vitro micropropagation. Fresh nutrient solution was replaced weekly (García and Malda, 2010c).

### **Estimation of AMF colonization**

Roots from soil/rizosphere samples of each species collected were cleaned and chopped into 1 cm portions; they were cleared in 10% KOH (wt/vol) and then rinsed with distilled water. Cleared roots were stained with a 5% black ink (Shaeffer) solution dissolved in a solution of 5% acetic acid (vol/vol) as was described by Vierheilig et al. (1998). 30 root portions were examined for mycorrhizal colonization using grid intersection method at 40X magnification using a light microscope, as described by Giovannetti and Mosse (1980). The frequency of mycorrhizal infection (F%) was calculated by  $IR \times 100/TR$ , where IR corresponds to infected roots and TR refers to total root segments.

### **Determination of Phosphorus concentration**

Total phosphorus content was assayed by micro Kjeldahl digestion of dry *M. mathildae* plantlets, inoculated with AMF or not two months before. Plantlets were washed with distilled water and oven dried for 48 h at 70° C and weighed. Dried plantlets were grounded to obtain a fine powder; 0.2 g was digested in concentrated sulfuric acid using the stannous chloride reaction method (Allen 1989). There were four replicas for each treatment.

### **Acclimatization and field re-introduction**

*M. mathildae in vitro* derived plantlets and colonized AMF plantlets were transplanted to 2.5 cm ø pots with a mixture of commercial potting soil (1:1 Pro-Moss Premier<sup>®</sup> and Hortiperl Termalita<sup>®</sup>), covered during first week with a plastic canopy and watered every other day to allow acclimatization; on the second week, they were transferred to a greenhouse. Plantlets were watered twice weekly until their transference to field. After 8 weeks, 98% of plantlets survived under these conditions.

One hundred AMF colonized plantlets and 100 non-colonized plantlets (control) were planted out to Cañada Juriquilla in a 75 X 10 m experimental plot. Plants were measured (diameter and height) and systematically tagged. Survival percentages were determined every other day on the first week; followed by weekly observations for a month; and eventually survival was registered every month.



### **Survey of *M. mathildae* blooming**

Flower yield of 100 non mycorrhized and 100 mycorrhized *M. mathildae* plantlets grown in greenhouse was monitored from middle April to late June. Flowers were counted every four days. In this same period, flower production of reintroduced plantlets was assessed twice a week.

### **Data analysis**

A single factor ANOVA at  $P < 0.05$ , was used to test for significant differences in all experiments. Statistical analyses were performed using JMP 6.0 statistical software (SAS Institute, Inc. 2005). Percentage data of root colonization was previously transformed to their arccosine value.

## **RESULTS**

### **Isolation of AMF inoculums source**

AMF root colonization was determined for different plants associated with *M. mathildae* and the spore soil density nearby their rhizosphere in order to initiate AMF trap cultures (table 1). All examined plants were colonized with AMF, *Melinis repens* (exotic grass species) presented higher colonization. Bare soil presented the lowest number of spores ( $1.4 \text{ spores g soil}^{-1}$ ). The number of spores  $\text{g soil}^{-1}$  was not significantly different for all soil sources, with exception of *Melinis repens* trap culture ( $F=20.73$  Prob.  $>F < 0.0001$ ). The presence of spores of some morpho-species of *Glomus* and *Gigaspora* and other Glomalean like fungi in AMF composition were remarkable. Trap cultures were initiated from these soils. By the third sporulation cycle, spores' number was increased significantly in all cultures (figure 1). Again, *M. repens* reached the highest values ( $92.33 \pm 2.37 \text{ spores g soil}^{-1}$ ), whereas *M. mathildae* reached  $76.37 \pm 1.88 \text{ spores g soil}^{-1}$ , as the other assayed plants.

### **Inoculation in aeroponic chamber**

The effectiveness of native AMF as inoculants for *M. mathildae* was assessed by their culture in an aeroponic chamber. Cactus' plantlets ( $1.78 \pm 0.04$  cm tall,  $1.36 \pm 0.02$  cm wide in average) were obtained as previously described. Total colonization was achieved around 60 days. After 74 days, micorrhizal

inoculated plantlets exhibited a significantly larger size in both, height ( $F= 116.56$  Prob.  $>F< 0.0001$ ) and diameter ( $F= 142.84$  Prob.  $>F< 0.0001$ ), as well as in total dry biomass ( $F= 60.24$  Prob.  $>F< 0.0001$ ) compared to the control. However root biomass was higher in non mycorrhized plantlets (table 2). In relation to phosphorus content, control plantlets did not show significant differences compared to initial P content ( $F= 2.81$  Prob.  $>F< 0.1322$ ), in contrast, AMF colonized plantlets significantly increased their P concentration compared to the control ( $F= 237.37$  Prob.  $>F< 0.0001$ ).

Table 1. Percentage of root colonization with AMF and soil spores density in different plants on experimental plot. Means  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ .

Plant species	AMF root colonized (F%)	No. of spores g soil <sup>-1</sup>
<i>J. dioica</i>	47.73 $\pm$ 0.98	15.03
<i>O. pubescens</i>	44.71 $\pm$ 1.72	15.77
<i>M. mathildae</i>	34.13 $\pm$ 1.29	17.47
<i>M. repens</i>	45.43 $\pm$ 1.65	31.07
<i>L. microphylla</i>	43.71 $\pm$ 0.86	18.17
Bare soil	–	1.23

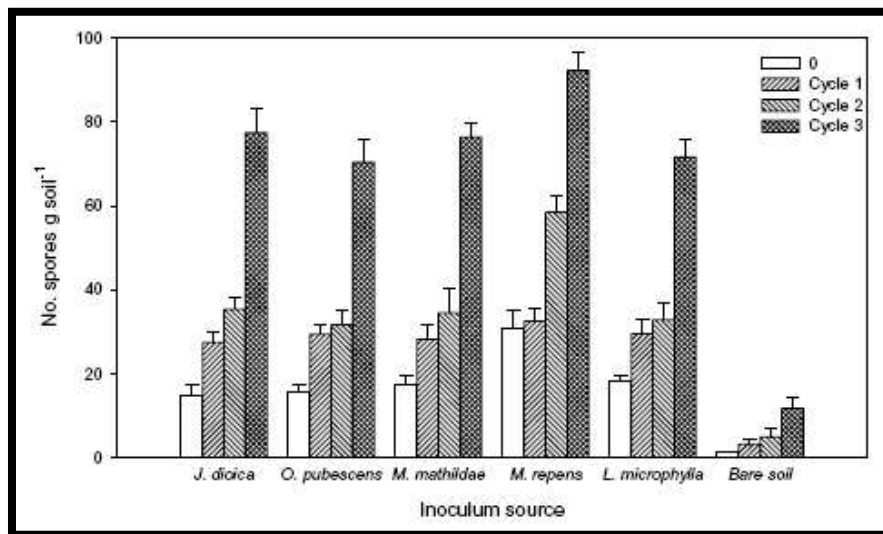


Figure 1. Sporulation cycles of trap cultures from different species associated to *M. mathildae*.

Table 2 Growth responses of *M. mathildae* inoculated with and without AMF in an aeroponic device.

	AMF root colonized (F%) <sup>b</sup>	Plants size (cm) <sup>a</sup>		Dry matter (mg plant <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>			P content (mg P <sup>-1</sup> dry weight) <sup>c</sup>
		Height	Diameter	Root	Shoot	Total	
Initial size	-	1.79±0.04	1.37±0.02	6.80±0.20	40.33±0.88	47.13±1.07	0.321±0.01
Control	0	1.99±0.07	1.54±0.03	11.79±0.21	45.00±0.70	56.79±0.90	0.344±0.01
Colonized	100	2.91±0.05	2.03±0.03	10.36±0.23	58.86±1.28	69.21±1.32	0.552±0.01

<sup>a</sup> Means ± S.E., *n* = 120. <sup>b</sup> Means ± S.E., *n* = 14, <sup>c</sup> Means ± S.E., *n* = 4.

### Selection of the re-introduction area

In order to select the best reintroduction area, experimental plot microclimatic conditions were compared with those in the area that contains *M. mathildae* population. Solar radiation and superficial temperature were recorded in October 2007. Non significant differences were found in solar radiation ( $F=0.0234$  Prob.  $>F<0.8815$ ) and superficial temperature ( $F=0.0075$  Prob.  $>F<0.9327$ ). Vegetation structure was similar in both areas.

### Acclimatization and survival of *M. mathildae* in the wild

Transition from *in vitro* to *ex vitro* environment was not difficult. After 60 days *M. mathildae* plantlets exhibited 98% of survival in greenhouse conditions. Reintroduction was performed in October 2007. Total numbers of non mycorrhized plantlets diminished 39% through the first month after reintroduction, and the population subsequently decreased 10% in the next three months. After five months, 49% of reintroduced plantlets died (figure 2). It was until the end of the rain season when *M. mathildae* out planting population suffered an abrupt decrease (figure 2). In contrast, plantlets inoculated with AMF died 9% in the first week; thereafter, reintroduced population remained stable for more than 160 days at 89 % survival (figure 2). Meanwhile, germination of *M. mathildae* in field was 40% and survival rate was 0.6%.

In greenhouse, mycorrhized *M. mathildae*, 16 months old, exhibited a 64% of blooming (figure 3), while non mycorrhized plantlets did not bloom. Compared

to greenhouse plantlets, 14% of reintroduced mycorrhizal cactus bloomed after the first rains, which were occurred in the last week of April (six months after reintroduction).

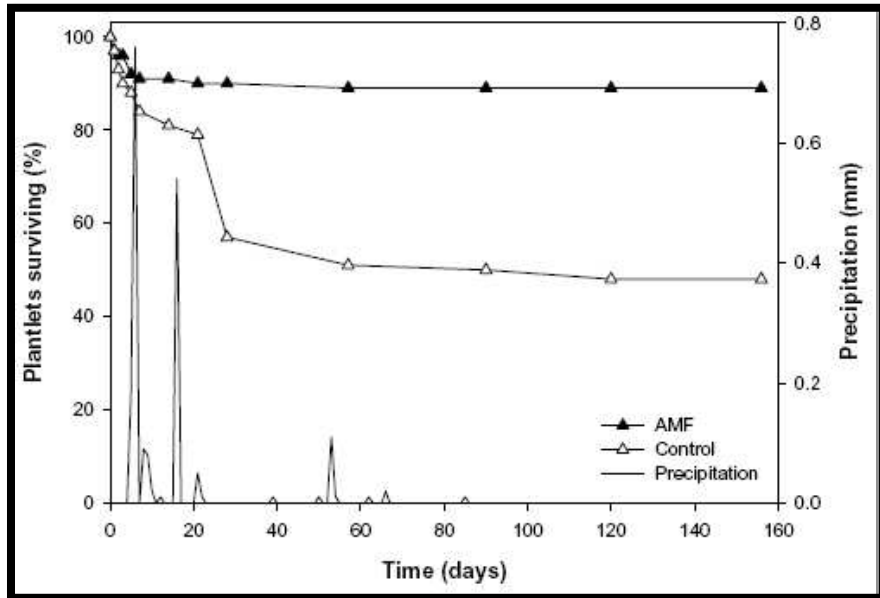


Figure 2. Survival of *M. mathildae* out planting in the wild, colonized with AMF (—▲—) and non colonized (—△—). Straight line represents the precipitation registered during re-introduction experiment.

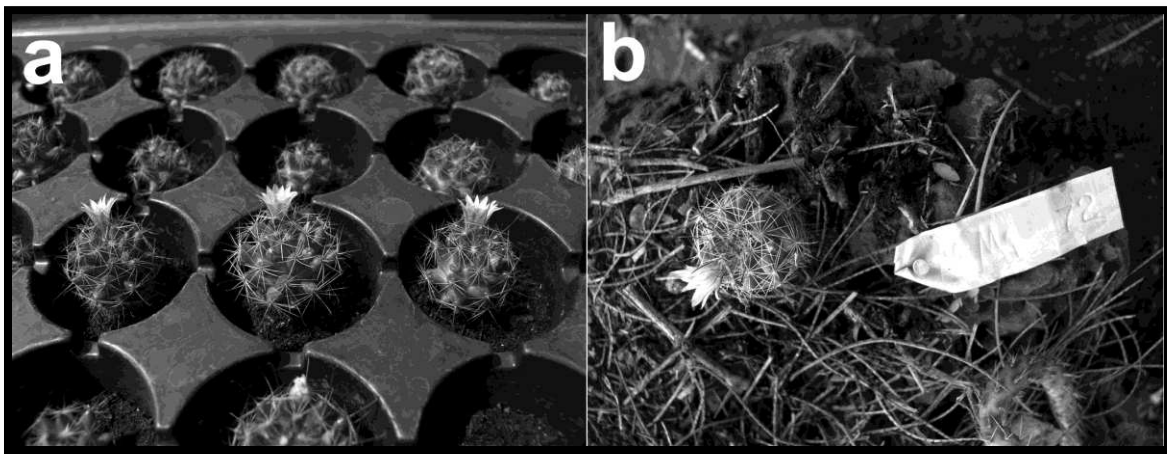


Figure 3. *M. mathildae* flowering in a) greenhouse; and b) field.

## **DISCUSSION**

### **Inoculum origin**

Spores of Gigasporaceae, and Glomaceae families were isolated from sieving of rhizosphere soils samples. Those species are commonly found in arid and semi arid ecosystems (Diallo et al. 1999; Bashan et al. 2000). Additionally, they have been reported as plant growth promoting microorganisms (Fortín et al. 2002). Since soil spores are dormant, it was necessary to initiate trap cultures in order to increase the functional AMF consortium. Three culture cycles were necessary to stimulate a high sporulation index. *M. repens* presented the highest sporulation index ( $92.33 \pm 2.37$  spores g soil<sup>-1</sup>); meanwhile, other trap cultures reached an average of 74 spores g soil<sup>-1</sup>. All species that sporulated on the third cycle belong to genus *Glomus*, with the exception of one morphotype of *Gigaspora* in *M. repens*' trap culture. Displacement of Gigasporaceae could be attributed to a vegetative incompatibility to sorghum as host plant. Liu and Wang (2003) found that the number of species of AMF detected in trap cultures was influenced by host plant type. As a consequence, native AMF does not necessarily exhibit high effectiveness as inoculants in agro systems (Enkhtuya et al. 2000); perhaps because local microbiota has evolved to establish a particular symbiosis with local vegetation and their effect over exotic species is largely unknown. In this work an AMF consortium obtained from *M. mathildae* rhizosphere was successfully used as growth enhancer for this cactus, since a particular fungus can colonize a particular plant (Liu and Wang 2003; Rudgers et al. 2004) and because AMF differ remarkably on individual plant enhancement (Munkvold et al. 2004).

### **Inoculation effects on cactus growth**

Growth of *M. mathildae* in aeroponic chamber was successfully achieved in both mycorrhized and non mycorrhized plantlets (97.6 % of survival). Aeroponic technology is superior to soil based pot culture to infest plants with AMF (Weathers and Zobel 1992) since this approach makes it possible to achieve high indices (100%) of AMF colonization (Martin-Laurent et al. 1999). With traditional inoculation methods Rincon et al. (1993) reported that vesicular

AM colonized *Pachycereus pecten-aboriginum* had significantly higher dry matter production, root/shoot ratios and specific root length than non vesicular AM colonized seedlings. Similar results were reported by van der Heijden (2004) which found that grass seedlings grew larger and obtained more P when AMF were present. In our experiments, full colonization of roots by AMF was reached around 60 days. Two weeks later, plantlets showed a significant difference in height (32 %) and diameter (24 %) respect to the control plantlets. Likewise, dry matter showed an increase of 20 %. Additionally, AMF inoculum increased P content about 60% in *M. mathildae* plantlets, in contrast with non mycorrhized ones.

Field survival rate of naturally germinated cacti seedlings is commonly low. Due to this intrinsic factor, population recovery by natural instances is not very probable. Implementing aeroponic culture, in only three months *M. mathildae* gained the biomass that takes one year in natural conditions (personal observation). Martin-Laurent et al. (1999) reported that after four months *Acacia mangium* colonized with *Glomus sp.* and cultivated aeroponically reached twice the size of those grown in soil. *M. mathildae* growth was dramatically increased (0.66 cm ø in 3 months), contrasting with its growth rate in the wild, which is very low (less than 0.5 cm ø by year), due to deciduous tropical forest experiences a drought period from 6 to 7 months, and consequently cactus reduces its metabolism during this season. The most important mycorrhizal response is an increased uptake of water and nutrients (particularly P). The high degree of aeration in aeroponic culture enhances the plant-fungi symbiosis effects (Weathers and Zobel 1992), promoting the effects recorded during this experiment. Aeroponic technology increases production costs for the lot of plants to be reintroduced. Nevertheless, increasing natural low growth rates of a number of species by aeroponic culture certainly represents a valuable investment for reintroduction practices.

### **Microhabitat conditions**

Germination and establishment of plants in their wild environment is a multifactorial event; therefore, selection of an adequate site for reintroduction is

essential to achieve a successful establishment. Differential architecture of forest's canopy provides different microclimatic conditions to small plants that establish under their canopy. Leirana-Alcocer and Parra-Tabla (1999) found that *Mammillaria gaumeri* plantlets survive only in shadow microhabitats. Furthermore, size and density of the canopy is an important factor, because cacti need to obtain an adequate sunlight for their satisfactory development. At this respect, Zúñiga et al. (2005) found *Lophophora diffusa* associated to *Larrea tridentata* and *Acacia sororia*, and dissociated from *Celtis pallida*, which generate a more intense shadow than the other shrubs. *M. mathildae* exclusively grows in volcanic uplifted rocks under several nurse plants especially below *L. microphylla* and *B. fagaroides*; both are important nurse plants that help to cactus establishment, since it decreases moisture loss and direct sunlight. Actually, their canopy architecture provides a buffering for temperature around 14° C. As well as temperature, determination of solar incidence did not show differences between the cactus home range and the selected reintroduction area.

#### **Survival of *M. mathildae* in field**

The poor surviving rate suggested that soil microbiota could play a significant role in the establishment of *M. mathildae*, since biotic interactions with other plants were carefully accomplished and insect herbivory was not detected. AMF inoculation by aeroponics has been used successfully to rapidly obtain forest products (Martin-Laurent et al. 1999); however, the authors established the need to carry out field experiments to verify the benefic effects of mycorrhizal colonization when young trees are to be planted out in field. In this experiment, reintroduced plantlets without AMF followed a similar fate, in spite of these plants having a bigger average size ( $1.99 \pm 0.07$  cm tall,  $1.54 \pm 0.03$  cm wide) than those reintroduced by García and Malda (2010b) ( $1.79 \pm 0.04$  cm tall,  $1.37 \pm 0.02$  cm wide). Only 51% of the out planted cactus survived after 6 months in field (figure 2). In contrast, mycorrhized plantlets showed a survival rate of 89%. These results are in accordance to Matsubara et al. (1998), who showed that arbuscular mycorrhizal fungus inoculation on young asparagus plantlets (*Asparagus officinalis* L.) derived from tissue culture might be feasible for increasing survival

rate during the acclimation process. Goicoechea et al. (2004) also reported that mycorrhizal fungi induced both, epicuticular wax deposition and leaf abscission in *Anthyllis cytisoides*. They sustain that these events could constitute an adaptation in order to cope with severe drought. Survival rate extension was attributed to the increase of the plant-fungi symbiosis capacity to access water soil reserves, where radicular plant system is not capable to take water.

On the other hand, during aeroponic culture, P uptake was superior in AMF inoculated plantlets; this fact conferred an advantage when *M. mathildae* was planted out, given that nutrient availability in wild is commonly a restrictive factor. Using AMF consortium as growth enhancer presents some advantages to using only one species, since functional diversity among AMF suggests that a combination of several species of fungi could increase the effectiveness of P extraction from soil (Koide and Mosse 2004). Soil in the study area is superficial and has an appreciable quantity of organic matter; as a result organic P is found in it. Koide and Kabir (2000) reported that extraradical hyphae of *Glomus intraradices* hydrolyze organic P into its inorganic form, permitting its absorption. Both factors could confer an advantage to reintroduced *M. mathildae*, therefore increasing their fitness.

In ten months *M. mathildae* plantlets reached not only dimensions similar to those of a four year wild specimen ( $2.91 \pm 0.05$  cm tall and  $2.03 \pm 0.03$  wide), but also a similar development stage, since four year old plants generally are initiating their reproductive life cycle (personal observation). Reintroduction of plants in reproductive stage is recommendable because seed production increases seed banks *in situ*; and, its contribution to recruitment is significant in a short time. However, reintroduction of plants with low growth rates in reproductive stage is rare, because a long time is required to reach this condition in traditional culture. On the other hand, in middle April *M. mathildae* inoculated with AMF growing in greenhouse (figure 3a) exhibited a blooming event (64% flowered). In contrast, non mycorrhized plantlets never bloomed. This phenomenon was similar in the experimental plot; although only 14% of the AMF inoculated plantlets produced flowers (figure 3b). This variation could be



attributed to water supply, which was permanent for the lot grown in greenhouse. Large mycorrhized plantlets, with superior P reserves than non colonized plants, could induce blooming after the first rainfalls. Fruit production is expected to be similar to the one recorded by García and Malda (2010a) in 2006 ( $16.0 \pm 5.22$  flowers), since 2008's precipitation pattern was similar to the one registered that year.

### **Conclusions and conservation management applications**

Under some circumstances, use of high technology to obtain plants would be excessively costly to be practical. Also, tissue culture is an expensive technique that requires special facilities and expensive reagents. Excluding growth regulators on micropropagation, as it was achieved for *M. mathildae* in present protocol, provides an advantage for plant reintroduction in terms of obtaining hormone-free plants with more genetic stability and reducing costs as well. Furthermore, when a species is endangered and there are a few plants to reproduce, this technique is affordable (Viswambharan et al. 2006).

Selection of a native AMF consortium has advantages over implementing plant growth enhancement with a single species. Rai (2001) pointed out that, an integrated inoculum approach by using mixed cultures of microorganisms would be more effective than a single fungus. This approach is less expensive and saves time since it avoids the large cost of individual AMF inoculum production relative to the isolation cost of an AMF consortium, additionally allowing the target plant to establish a symbiotic relationship with a variety of fungi. In addition to the direct costs, implementing local fungi consortium has some implicit saving. Native flora and microorganisms have evolved together and establish a benefic symbiosis (Sylvia et al. 2003). Plant protective microbial symbionts can determine the ecological success of plants since they drastically modify plant communities and related trophic webs (Selosse et al. 2004). The use of alien microorganisms can alter vegetation structure (O'connor et al. 2002) favoring alien species (e.g. invasive grasses), and the cost to revert this phenomenon can be greatly significant (Schwartz et al. 2006).

Micropropagation was useful to obtain large quantities of plant material for reintroduction. However, reintroduced non mycorrhized plantlets showed that absence of AMF positioned them in disadvantage in front of the AMF colonized native flora which is adapted to local water availability and nutrients scarcity.

Aeroponic culture has been implemented to increase the yield of a variety of commercial crops, trees, flowers and vegetable cultivations in short time (Weathers and Zobel 1992); to our knowledge, this is the first report of aeroponic cultivation and AMF inoculation of a cactus. Plantlets equivalent to a 4 years wild specimen in size and development were aeroponically obtained. In addition to a favorable nurse host selection, AMF consortium favored *M. mathildae* plantlets establishment in wild (89%). They persisted for more than 6 months (from dry season until the first rainfalls) and a fraction of the population flowered (14%).

In this context, both, micropropagation by tissue culture and inoculation with AMF by aeroponic culture, have proved to be a very cost effective practice and technology to produce *M. mathildae* plantlets for reintroduction. This dual technology could be useful to restoration practices and commercial purposes of other cacti species.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Idea Wild for equipment donation for this project. We thank to Fideicomiso Queretano para la Conservación del Medio Ambiente for providing access to Cañada Juriquilla Natural Protected Area. This work was partially founded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project CONACYT-CONAFOR-2004-C01-71). The scholarship awarded to the first author by CONACYT (FOMIX QRO-2006-C1-53811) is gratefully acknowledged.

## **REFERENCES**

- Allen MF (1989) Mycorrhizae and rehabilitation of disturbed arid soils: processes and practices. *Arid Soil Res* 3:229–241
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42

- Bashan Y, Anne DE, Carrillo-Garcia A, Linderman RG (2000) Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. *Appl Soil Ecol* 14:165–175
- Bethlenfalvay GJ, Dakessian S, Pacovsky RS (1984) Mycorrhizae in a southern California desert: ecological implications. *Can J Bot* 62:519–524
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154:275–304
- Bunn E, Senaratna T, Sivasithamparam K, Dixon KW (2005) *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. *In Vitro Cell Dev Biol P* 41:812–815
- Calvente R, Cano C, Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Barea JM (2004) Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Appl Soil Ecol* 26:11–19
- Carrillo-Garcia A, León de la Luz JL, Bashan Y, Bethlenfalvay GJ (1999) Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert. *Restor Ecol* 7:321–335
- Decruse WS, Gangaprasad A, Seeni S, Saroniji-Menon V (2003) Micropropagation and eco-restoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell Tiss Org* 72:199–200
- Diallo AT, Sambb PI, Ducouss V (1999) Arbuscular mycorrhizal fungi in the semi-arid areas of Senegal. *Eur J Soil Biol* 35:65–75
- Enkhtuya B, Rydlová J, Vosátka M (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Appl Soil Ecol* 14:201–211
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpé Y, St-Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y (2002) Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot* 80:1–20
- García RO, Malda BG (2010a) Phenological changes of *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climatic change. In: Dallmeier, F.,

- Fenech, A., Maciver, D., Szaro, R. (Eds.), Climate Change, Biodiversity, and Sustainability in the Americas. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- García RO, Malda BG (2010b) Micropropagation and reintroduction of *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to their natural habitat. HortScience (In press)
- García RO, Malda BG (2010c) Floraison rapide de *Mammillaria mathildae* inoculé avec AM en culture aéroponique. Canadian Journal of Plant Science (In rev.)
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84:489–500
- Giusti P, Vitti D, Fiocchetti F, Colla G, Saccardo F, Tucci M (2002) *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Sci Hortic* 95:319–332
- Goicoechea N, Merino S, Sánchez–Díaz M (2004) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the deciduous shrub *Anthyllis cytisoides* under water deficit. *Physiol Plantarum* 122:453–464  
<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/nomenclature.htm>. INVAM, the International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi
- Koch AM, Croll D, Sanders IR (2006) Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecol Lett* 9:103–110
- Koide RT, Kabir Z (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol* 148:511–517
- Koide RT, Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145–163
- Leirana-Alcocer J, Parra-Tabla V (1999) Factors affecting the distribution, abundance and seedling survival of *Mammillaria gaumeri*, an endemic cactus of coastal Yucatán, México. *J Arid Environ* 41:421–428
- Liu R, Wang F (2003) Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 13:123–127

- Martin-Laurent F, Lee SK, Tham FY, He J, Diem HG (1999) Aeroponic production of *Acacia mangium* saplings inoculated with AM fungi for reforestation in the tropics. *Forest Ecol Manag* 122:199–207
- Matsubara Y, Ogura Y, Watanabe T, Harada T (1998) Arbuscular mycorrhizal fungus infection enhances acclimation of *Asparagus* plantlets derived from tissue culture. *Acta Horticult (ISHS)* 513:221–228
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I (2004) High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 164:357–364
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plantarum* 15:473–479
- O'Connor PJ, Smith EH, Smith AF (2002) Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community in a semiarid herbland. *New Phytol* 154:209–218
- Pérez-Molphe-Balch E, Dávila-Figueroa CA (2002) *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Develop Biol P* 38:73–78
- Rai MK (2001) Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cell Develop Biol P* 37:158–167
- Ramirez-Malagon R, Aguilar-Ramirez I, Borodanenko A, Perez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Develop Biol P* 43:660–665
- Rillig MC, Steinberg PD (2002) Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry* 34:1371–1374
- Rincón E, Huante P, Ramírez Y (1993) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on biomass production by the cactus *Pachycereus pecten-aboriginum*. *Mycorrhiza* 3:79–81
- Rubluo A, Chavez V, Martínez AP, Martínez-Vazquez O (1993) Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol Conserv* 63:163–169

Rudgers JA, Koslow JM, Clay K (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecol Lett* 7:42–51

Schwartz MW, Hoeksema JD, Gehring CA, Johnson NC, Klironomos JN, Abbott LK, Pringle A (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecol Lett* 9:501–515

Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuyse P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C. R. Biologies* 327:639–648

Stiling P, Rossi A, Gordon D (2000) The difficulties of single factor thinking in restoration: replanting a rare cactus in the Florida Keys. *Biol Conserv* 94:327–333

Sudharsan C, AboEl-Nil M, Hussain J (2003) Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *J Arid Environ* 54:133–147

Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel PG, Zuberer D (2003) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey

Uei-Chern Ch, Chi-Ni H, Mau-Shing Y, Dinesh ChA, Hsin-Sheng T (2006) In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kaoi* an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cell Develop Biol P* 42:128–133

van der Heijden MGA (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecol Lett* 7:293–303

Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, Weekers F, Kevers C, Thonart P, Lemoine MC, Cordier C, Alabouvette C, Gianinazzi S (2004) Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Appl Soil Ecol* 27:243–258

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y (1998) Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Appl Environ Microb* 64:5004–5007

Viswambharan S, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cell Develop Biol P* 42:206–214.

Weathers PJ, Zobel RW (1992) Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. *Biotechnol Adv* 10:93–115

Weber J, Ducouso M, Tham FY, Nourissier-Mountou S, Galiana A, Prin Y, Lee SK (2005) Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. in aeroponic culture. *Biol Fert Soils* 41:233–239

Welles JM (1990) Some indirect methods of estimating canopy structure. *Remote Sens Rev* 5:31–43

Zúñiga B, Malda G, Suzán H (2005) Interacciones planta-nodrizo en *Lophophora diffusa* (Cactaceae) en un desierto subtropical de México. *Biotrópica* 37:351–356

## ABREVIATURAS

ANP	Área natural protegida
BTC	Bosque tropical caducifolio
EM	Escarificación mecánica
ER	Esfuerzo reproductivo
EQ	Escarificación química
GARP	Siglas en inglés de “Algoritmo Genético para la Producción de Reglas”
HR	Humedad relativa
IAF	Índice de área foliar
IPCC	Siglas en inglés de “Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático”
MNE	Modelado de nicho ecológico
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MVA	Micorrizas vesículo arbusculares
PVA	Análisis de viabilidad de la población
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
SADIE	Siglas en inglés de “Análisis Espacial por Índices de Distancias”
SE	Suelo estéril
SI-MAB	Siglas en inglés de “Instituto Smithsonian Monitoreo y Tasamiento de la Biodiversidad
SM	Suelo micorrizado





PROCEDURA FEDERAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE  
 DELEGACIÓN EN EL ESTADO DE QUERÉTARO  
 DEPARTAMENTO DE DENUNCIAS AMBIENTALES,  
 QUEJAS Y PARTICIPACIÓN SOCIAL

"La Ley al Servicio de La Naturaleza"

PRIMERO:

Fecha de Emisión: 23 MAR 09  
 Última Modificación: Sin Cambios  
 Firmado: L1  
 Nombre del Emisor: Jefe  
 Puntos de Contacto: 01 2222 2544118  
 Correo Electrónico: denuncias@semarnat.gob.mx  
 Dirección:  
 Puntos de Contacto:  
 Referencia: Título de la Ley  
 Fecha de Actualización:  
 Estado y Tipo de Documento:  
 año de Emisión: 2009

**ACUERDO RESOLUTIVO**

**Expediente:** PFFA/GR/DG/79088-08  
**Denunciante:** C. América Vizcaino Sahagun  
**Denunciado:** Quién resulta responsable

En Santiago de Querétaro, Qro., a los 23 días del mes de marzo del año 2009. Visto para resolver el Expediente Administrativo registrado con el número al rubro indicado, a nombre de la C. América Vizcaino Sahagun, instaurado dentro del procedimiento de Denuncia Popular previsto en el Capítulo VII del Título Sexto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.

**RESULTANDO**

**PRIMERO.** Que con fecha del 25 de noviembre del año 2008, se recibió en esta Delegación vía correo electrónico, denuncia en contra de quien resulte responsable, por el presunto cambio de uso de suelo de terrenos forestales, en la zona El Cajón, municipio de Querétaro, Qro.

Téngase como señalado para sí y recibir todo tipo de notificaciones la dirección de correo electrónico [procuradofederal@semarnat.gob.mx](mailto:procuradofederal@semarnat.gob.mx).

**SEGUNDO.** Que con fundamento en los artículos 191 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y 135 fracción IV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, esta autoridad emitió Acuerdo de Calificación y Admisión de fecha 5 de diciembre del año 2008, debidamente fundado y motivado, designándose al mismo que los hechos constitutivos de la denuncia presentada son competencia de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.

**TERCERO.** Que como resultado de la anterior se giró oficio número PFFA/GR/DG/79088-08 de fecha 5 de diciembre del año 2008, a la **SUBDELEGACIÓN DE RECURSOS NATURALES**, a efecto de que se sirva dar inicio al procedimiento de Inspección y Vigilancia, observando lo dispuesto por el Artículo 192 y las disposiciones del Título Sexto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y demás ordenamientos jurídicos aplicables, solicitándole que informe respecto de su adscripción al Departamento de Denuncias Ambientales, Quejas y Participación Social de esta Delegación, y —

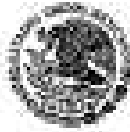
**CONSIDERANDO**

I.- Que esta Delegación de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente tiene como atribuciones, entre otras, el de recibir, atender, investigar y resolver las quejas y denuncias de la ciudadanía y de los representantes de los sectores público, social y privado, en materia ecológica y de protección al ambiente, relacionadas con facultades del orden federal, con fundamento en los artículos 180, 191 y demás relativos y aplicables de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y 135 fracción IV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

II.- Que mediante oficio número PFFA/GR/DG/79088-08 de fecha 9 de diciembre del año 2008, esta Procuraduría informó a la C. América Vizcaino Sahagun, que personal de la Subdelegación de Recursos Naturales, realizó visita de inspección al lugar de los hechos denunciados, en donde se observó entre otros realizando cambio de uso de suelo de terrenos forestales afectando vegetación propia de zona baja caducifolia por lo que esta subunidad procedió a levantar el acta de inspección respectiva.

III.- Que la Subdelegación Jurídica de esta Delegación, mediante oficio número PFFA/GR/DG/28.5.10107-08, de fecha 20 de marzo del año 2009, informó que derivado del procedimiento de inspección y vigilancia, con fecha del 25 de febrero del año 2008, se emitió resolución administrativa, en la que se resolvió imponer a la Comisión Estatal de Caminos una sanción económica, asimismo y como medida de compensación se ordenó realizar un programa de reforestación, por lo que es de resolverse y así:

**RESUELVE**



PROCURADURÍA FEDERAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE  
DELEGACIÓN QUERÉTARO

PROCEFA

Fecha de Clasificación: 24 Mayo 2011  
Unidad Administrativa: Deleg. Querétaro  
Resolución: 1-1  
Proceso de Recurso: 0, 1, 2, 3, 4, 5  
Procedimiento Legal: (CAMP) II Base: XI  
Organización del proceso: (Iniciativa)  
Carácter: 1  
Formación:  
Subsistema: (Tercer) 1000 Unidad:  
Fecha de publicación:  
Número y fecha del Director general:  
Inte: (C) Clasificación:

PROCURADURÍA FEDERAL DE PROTECCIÓN AL AMBIENTE  
DEL ESTADO EN EL ESTADO DE QUERÉTARO  
DEPARTAMENTO DE DENUNCIAS AMBIENTALES,  
QUEJAS Y PARTICIPACIÓN SOCIAL

**"La Ley al Servicio de La Naturaleza"**

**PRIMERO.-** Que el presente Procedimiento de Denuncia Popular se declara concluido, archívense los autos correspondientes, con fundamento en el artículo 159 fracc. VII de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, por emitir la resolución administrativa derivado del procedimiento de inspección y vigilancia.

**SEGUNDO.-** Notifíquese el presente proveído personalmente o mediante correo certificado con acuse de recibo a la C. América Micolina Bohaguan.

Así lo proveí y firmo el Delegado de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente en el Estado de Querétaro, el C. ING. ARTURO EULOGIO ORTIZ MONTE, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 32 bis fracción V de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, en relación con los artículos PRIMERO y QUINTO TRANSITORIOS del Decreto por el cual se reforman, adicionan y derogan diversas disposiciones de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de noviembre del año 2000, 191 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y 1º, 2º inciso C), 3º, 118 fracciones I y II, 119 fracción XI y 120 fracciones IV, VII, IX y XIII del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, artículos primero y segundo del Acuerdo por el que se señala el nombre, sede y jurisdicción inicial de las delegaciones de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente en las Entidades Federativas, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 27 de marzo de 2003.

PROCURADURÍA FEDERAL DE  
PROTECCIÓN AL AMBIENTE  
DELEGACIÓN QUERÉTARO