



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

**Propagación Vegetativa y Caracterización del Microbioma de
Mammillaria albiflora (Werderm.) Backeb.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:
BIOL. EMILIO VARGAS COLMENERO

DIRECTOR:
DRA. SURIA GISELA VÁSQUEZ MORALES
CO-DIRECTOR:
DR. ISRAEL ENRIQUE PADILLA GUERRERO

Guanajuato, Guanajuato, Abril de 2025

DEDICATORIA.

A Julia Murillo Jiménez, quien me ha acompañado en todo momento y me ha mostrado siempre el camino para ser un mejor ser humano, una mejor pareja. Por su gran apoyo, paciencia, así como sus atenciones y cariño incondicionales que me permitieron llegar hasta aquí y seguir adelante por esta senda. Muchas gracias, con todo mi amor, este logro es de los dos.

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Suria Gisela Vásquez Morales y al Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero, cuya experiencia, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Su confianza en mí me impulsó a seguir adelante y superar los desafíos, brindándome claridad y motivación en todo momento.

A mis padres y hermanas, que les agradezco su apoyo constante, sus consejos y palabras de aliento. Por siempre creer en mí y en los logros que puedo alcanzar.

A la Secretaría de Ciencia, Tecnología, Humanidades e Innovación (SECIHTI) por la Beca otorgada para realizar el programa de posgrado.

Finalmente, agradezco a todos los compañeros, colegas y colaboradores que participaron en el desarrollo de esta investigación, Ramón, Fátima, Víctor, Dennis, Georgina, Esteban, por mencionar algunos; su ayuda fue muy valiosa y esta tesis es el resultado de ese esfuerzo colectivo y de colaboración.

Índice.	
Índice de figuras.	4
Índice de tablas.	6
Resumen.	7
Abstract.	8
Introducción.	9
Parámetros demográficos de poblaciones.	12
Microbioma.	13
Propagación por injerto.	15
Cultivo de tejidos vegetales.	18
Antecedentes.	20
Justificación.	24
Hipótesis.	24
Objetivos.	25
Objetivo general.	25
Objetivos específicos.	25
Materiales y métodos.	25
Área de estudio.	25
Descripción de la especie.	27
Análisis de los parámetros demográficos de la población.	28
Diseño experimental y colecta de muestra de la rizósfera.	31
Extracción de DNA genómico.	32
Amplificación y secuenciación.	34

Condiciones de crecimiento en invernadero.....	36
Material biológico para injerto.	36
Injerto.....	37
Revisión de literatura de propagación <i>in vitro</i>	39
Análisis de datos.....	45
Resultados.....	46
Parámetros demográficos de la población.....	46
Composición taxonómica de la comunidad microbiana.....	57
Propagación por injerto.	62
Tratamientos propuestos de propagación <i>in vitro</i>	66
Discusión.	68
Conclusiones.....	73
Perspectivas.	74
Literatura revisada.	75

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Composición taxonómica por géneros y número de especies de la Familia Cactaceae en Guanajuato. Modificado de Bárcenas y Hernández, 2012.	9
Figura 2. Patrón general de riqueza de especies del género <i>Mammillaria</i> . Tomado de: Hernández y Gómez-Hinostrosa (2015).	10
Figura 3. Número de individuos de <i>Mammillaria albiflora</i> encontrados para cada una de las categorías de tamaño. Tomada de Cruz Santos A. (2015).	13
Figura 4. El papel de los organismos promotores del crecimiento de las plantas en la mejora de la salud del suelo y la mitigación del estrés abiótico y los efectos negativos del cambio climático. Figura obtenida de Segun Ayangbenro, A., & Oluranti Babalola O., 2021. 14	
Figura 5. Corte transversal de una Cactácea. Figura obtenida de McMillan A. J. S. (1966).	16
Figura 6. Visión general de las diferentes técnicas de micropropagación <i>in vitro</i> aplicadas en especies de cactus. Figura obtenida de Bouzroud, S., <i>et al.</i> , 2022.	19
Figura 7. Distribución geográfica conocida de <i>M. albiflora</i> . Tomada de Arias S. y Aquino D. (2019).	26
Figura 8. Vista del hábitat donde se distribuye <i>M. albiflora</i>	26
Figura 9. Individuos de <i>M. albiflora</i>	28
Figura 10. Polígono de la población con disturbio de <i>M. albiflora</i> , con una superficie de 3.45 hectáreas.	29
Figura 11. Polígono de la población semi-conservada de <i>M. albiflora</i>	30
Figura 12. Ubicación de las poblaciones con disturbio y semi-conservada de <i>M. albiflora</i> en su área de distribución conocida.	30
Figura 13. Proceso de toma de muestra de rizósfera de <i>M. albiflora</i>	32
Figura 14. Proceso de sembrado de porta injerto.	37
Figura 15. Cuadrantes y medición de ejemplares de <i>M. albiflora</i>	47
Figura 16. Distribución de la altura del total de individuos medidos por población de <i>M. albiflora</i>	48
Figura 17. Distribución de diámetro basal del total de individuos medidos por población de <i>M. albiflora</i>	48

Figura 18. Distribución de individuos registrados para cada categoría diamétrica de poblaciones contrastantes de <i>M. albiflora</i> .	49
Figura 19. Variables y número de individuos de <i>M. albiflora</i> registrados para determinar la supervivencia por cada población a los seis meses del T0.	51
Figura 20. Desarrollo clonal de un individuo en la población con disturbio de <i>M. albiflora</i> .	52
Figura 21. Distribución de individuos registrados en la población con disturbio para el tiempo T0 y T1 por categoría diamétrica de <i>M. albiflora</i> .	53
Figura 22. Registros de individuos en una nueva población de <i>M. albiflora</i> cercana a la población semi-conservada.	54
Figura 23. Análisis de componentes principales de las variables determinadas en el análisis de fertilidad, salinidad del suelo y variables ambientales de ambas poblaciones de <i>M. albiflora</i> .	57
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de las muestras de rizoma de <i>M. albiflora</i> .	58
Figura 25. Amplificación de oligonucleótidos para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de <i>M. albiflora</i> .	59
Figura 26. Amplificación para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de <i>M. albiflora</i> con las cuatro polimerasas utilizadas.	60
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico extraído con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) de las muestras de rizoma de <i>M. albiflora</i> para la población con disturbio.	61
Figura 28. Amplificación para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de <i>M. albiflora</i> con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) para la población con disturbio.	62
Figura 29. Aplicación de fungicida sistémico en plantas infectadas por hongo patógeno.	63
Figura 30. Proceso de reinjertación en plantas infectadas por hongo patógeno.	64
Figura 31. Crecimiento de los vástagos en los dos tratamientos de portainjerto utilizados.	65
Figura 32. Desarrollo de clones o hijuelos en <i>M. albiflora</i> a los 180 días del daño por corte.	66

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Oligonucleótidos implementados para la amplificación del gen DNAr 16S y la región espaciadora de transcripción interna (ITS, siglas en inglés) en las muestras de DNA de la rizosfera de <i>Mammillaria albiflora</i>	35
Tabla 2. Descripción general de la información seleccionada sobre ocho estudios previos como base de la propuesta de protocolo de propagación <i>in vitro</i> de <i>M. albiflora</i>	40
Tabla 3. Resultados de los análisis de fertilidad y salinidad del suelo de las poblaciones con disturbio y semi-conservada de <i>M. albiflora</i>	55
Tabla 4. Propuesta para propagación <i>in vitro</i> específica de <i>M. albiflora</i>	66

RESUMEN.

La Familia Cactaceae Juss. comprende entre 120 a 130 géneros, agrupando entre 1450 y 1870 especies; es endémica del Continente Americano y México ocupa el primer lugar en diversidad con 63 géneros y 677 especies. Para el Estado de Guanajuato, los esfuerzos en determinar la diversidad de especies de esta familia han tomado décadas y se ha logrado reconocer de 20 a 24 géneros y entre 92 a 109 especies de cactáceas. *Mammillaria albiflora* (Werderm.) Backeb., conocida comúnmente como biznaga bola de hilo de flor blanca, es una especie microendémica a Guanajuato, particularmente al matorral xerófilo en San Luis de la Paz. Su distribución está restringida entre 5 y 10 km² y en los últimos 20 años su población a disminuido un 50%, estimandose en aproximadamente 5,000 individuos totales. Es una especie poco estudiada, con bajo flujo genético entre poblaciones y reclutamiento, sometida a impactos negativos por fragmentación y pérdida de su hábitat, saqueo de individuos adultos de las poblaciones naturales para su comercialización y nula protección nacional bajo normas oficiales. Es por lo anterior que, el desarrollar nuevos protocolos de propagación *in vitro* y por injerto, estudiar la dinámica demográfica de sus poblaciones (ciclo de vida, estadíos, depredación, etc.), así como, conocer la diversidad de microorganismos asociados a la rizósfera de *Mammillaria albiflora* y sus interacciones ecológicas implementando técnicas de biología molecular, nos aproximará a comprender los factores de adaptación y supervivencia de la especie, además de aportar información actualizada de esta especie tan relevante para Guanajuato que pueda implementarse en la generación de estrategias y acciones para su protección y conservación.

ABSTRACT.

The Cactaceae Juss. family comprises between 120 to 130 genera and between 1450 and 1870 species, it is endemic to the American continent and Mexico is the first country in diversity with 63 genera and 677 species. For the State of Guanajuato, efforts to determine the species diversity of this family have taken decades and it has been possible to recognize 20 to 24 genera and between 92 to 109 species of cacti. *Mammillaria albiflora* (Werderm.) Backeb., commonly known as white-flowered threadball biznaga, is a microendemic species to Guanajuato, particularly to the xerophilous scrubland in San Luis de la Paz. Its distribution is restricted to between 5 and 10 km² and in the last 20 years its population has decreased by 50%, estimated at approximately 5,000 total individuals. It is a little-studied species, with low gene flow between populations and low recruitment, subject to negative impacts due to fragmentation and loss of its habitat, looting of adult individuals from natural populations for commercialization and no national protection under official regulations. For this reason, developing new in vitro and graft propagation protocols, studying the demographic dynamics of its populations (life cycle, stages, predation, etc.), as well as knowing the diversity of microorganisms associated with the rhizosphere of *Mammillaria albiflora* and its ecological interactions by implementing molecular biology techniques, will bring us closer to understanding the adaptation and survival factors of the species, in addition to providing updated information on this species so relevant to Guanajuato that can be implemented in the generation of strategies and actions for its protection and conservation.

INTRODUCCIÓN.

La Familia Cactaceae Juss. es una familia de plantas nativa del Continente Americano [1], comprende entre 120 a 130 géneros y entre 1450 y 1870 especies [2]. En México se encuentra la mayor diversidad y endemismos de esta familia, con 63 géneros y aproximadamente 677 especies, de las cuales 518 especies son endémicas al país y el género *Mammillaria* es el quinto lugar en diversidad de especies de plantas vasculares con 169 especies [3–5].

El Estado de Guanajuato posee una diversidad importante de especies de cactáceas, se han registrado entre 20 y 24 géneros con 92 a 109 especies [6–10]. Presenta una riqueza heterogénea donde 13 géneros cuentan con una sola especie y de estos 4 son monotípicos: *Isolatocereus*, *Hamatocactus*, *Neolloydia* y *Strombocactus* [6, 11] (Figura 1).

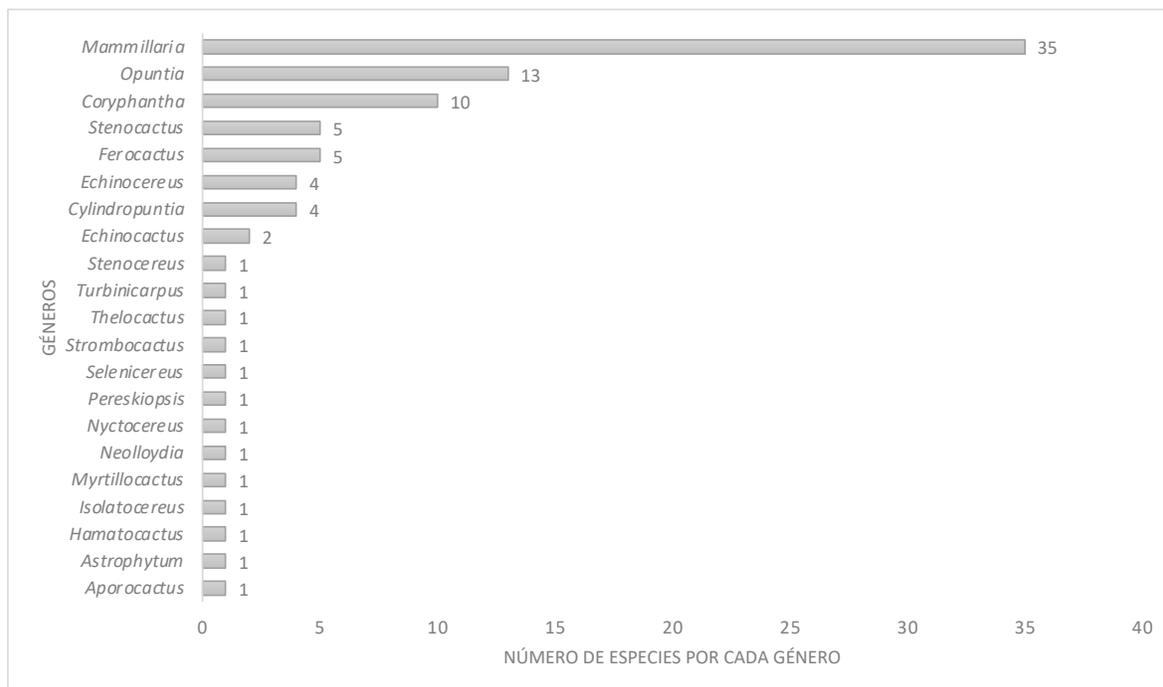


Figura 1. Composición taxonómica por géneros y número de especies de la Familia Cactaceae en Guanajuato. Modificado de Bárcenas y Hernández, 2012.

El estado de conservación de las cactáceas en Guanajuato refleja que 24 especies se encuentran bajo alguna categoría de la NOM-059-SEMARNAT-2010 [12], puntualmente, 12 especies están en protección especial (Pr), 10 amenazadas (A) y 2 en peligro de extinción (P) [13]. Es por lo anterior que, Hernández y Gómez-Hinostrosa [14], en su libro “Mapping the

Cacti of Mexico, Part II: *Mammillaria*”, reconocen al género *Mammillaria* como uno de los más importantes en riqueza de especies, tanto a nivel nacional, como para la zona central del país, en específico el noreste del estado de Guanajuato, como un área de mayor diversidad para este género (Figura 2).

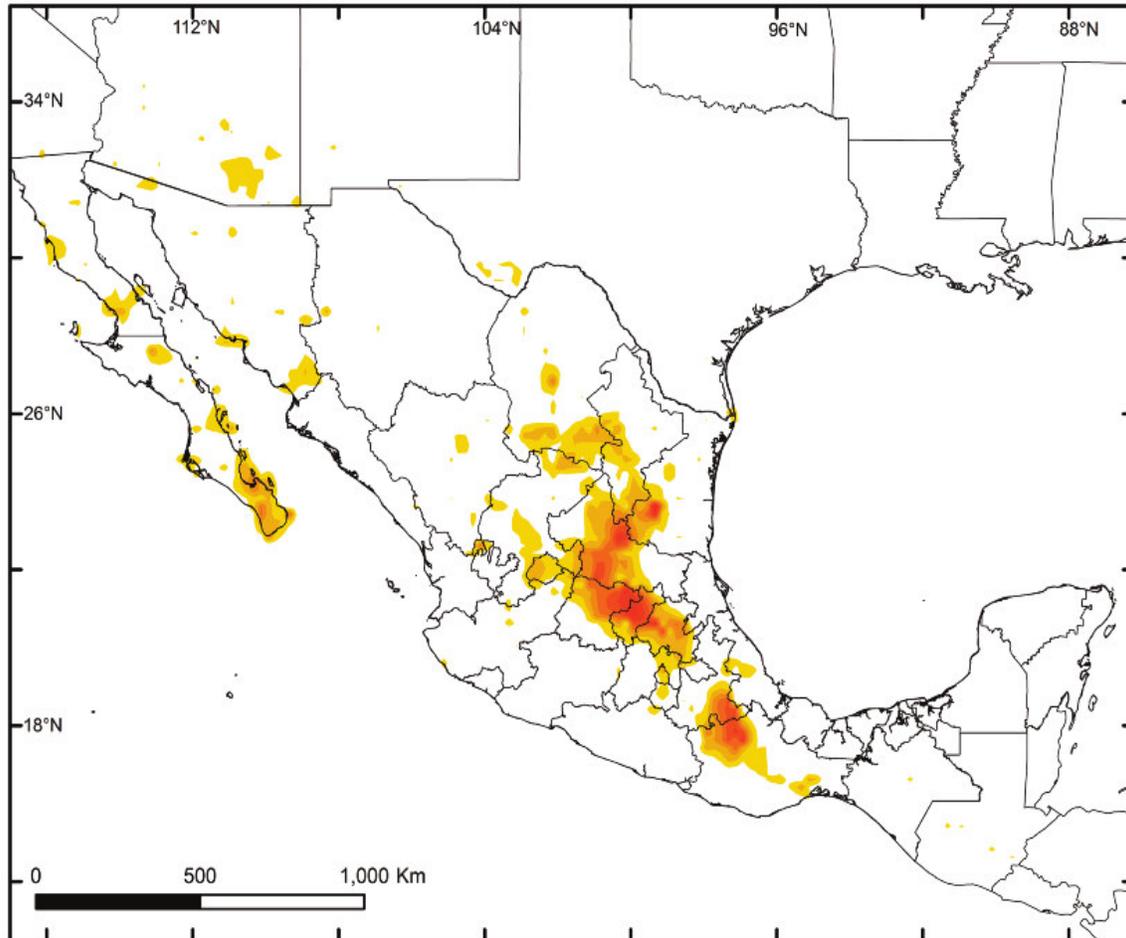


Figura 2. Patrón general de riqueza de especies del género *Mammillaria*. Las áreas de color rojo intenso indican las áreas de mayor diversidad de especies. Tomado de: Hernández y Gómez-Hinostrosa (2015).

Considerando lo anterior, en la región noreste del estado de Guanajuato se encuentra la mayor diversidad de especies de esta familia y en particular se han encontrado especies endémicas y microendémicas, como es el caso de *Mammillaria albiflora*, la cual está considerada como una especie microendémica al estado, por encontrarse en un rango geográfico extremadamente restringido, entre 5 y 10 km², por lo que se ha clasificado en la categoría de

En Peligro Crítico de Extinción por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), debido a la drástica disminución en el tamaño de su población, aproximadamente el 50% en los últimos 20 años, y una población menor a 5,000 individuos [15].

Se localiza en la región semiárida del Altiplano Central Mexicano, sobre llanuras de Matorral Xerófilo predominadas por pastizales que crecen sobre suelos de tipo litosoles de textura media, rica en materia orgánica y con horizontes petrocálcicos, entre 1950 y 2300 m snm [16]. De clima cálido semi-seco, con un promedio de 70 días con lluvia al año y una precipitación máxima de 87.5 mm³ al día, siendo los meses con mayor precipitación de junio a septiembre, el resto del año no hay precipitación o se presentan lluvias escasas [17]. La temperatura promedio anual máxima es de 38°C y mínima de hasta 7.7°C, también se han registrado temperaturas históricas en la zona de hasta -15°C, siendo los meses más calurosos de abril a junio y los más fríos de diciembre a febrero [17].

La actividad humana en el área de distribución de *M. albiflora* es una de las amenazas más importantes para la especie y de igual manera para otras cactáceas. La agricultura y la ganadería, el uso de herbicidas y otros pesticidas, la minería y la apertura de nuevas áreas para urbanización e infraestructura, han contribuido con la pérdida y fragmentación de su hábitat [18]. Por otra parte, el saqueo de ejemplares de las poblaciones naturales para la comercialización es también uno de los impactos negativos más significativos para la especie, puesto que interfiere en la dinámica natural de las poblaciones y del ecosistema [19]. Por mencionar un ejemplo de especies de cactáceas con importante vulnerabilidad a los impactos antropogénicos tenemos a *Mammillaria gaumerii*, con una distribución restringida a las dunas costeras del norte de Yucatán, considerada especialmente susceptible a las variaciones ambientales (factores abióticos) y a los cambios en el uso de la tierra debido a su estrecho rango geográfico, su alta especificidad de hábitat y su bajo número de poblaciones, aunado a que su estado de conservación, catalogada como en peligro de extinción, es causado principalmente por la urbanización, la construcción de carreteras, el manejo de ranchos ganaderos y la agricultura, los cuales están cambiando la composición de la vegetación y fragmentando su hábitat ya restringido [20, 21].

PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE POBLACIONES.

Los estudios demográficos en hábitats naturales son una herramienta importante para evaluar tanto el grado en que las especies endémicas y en peligro de extinción se ven afectadas por las perturbaciones, como su resiliencia y resistencia demográfica [22–25]. La determinación de los atributos demográficos, como la tasa de crecimiento de la población, la elasticidad y la respuesta de la tabla de vida, entendiendo ésta última como la herramienta más completa para el análisis de la mortalidad de una población en un momento dado (sobrevivir o morir a una edad exacta "x" o entre edades "x" y "x+n"), nos permite conocer la condición general de una población, su vulnerabilidad a lo largo de las diferentes etapas del ciclo de vida, y el grado de afectación por las perturbaciones naturales, estocásticas y humanas [26]. Además de conocer estos aspectos poblacionales antes mencionados, la obtención detallada y precisa de información sobre la distribución de especies se ha convertido en un paso crítico para generar estrategias efectivas de conservación *in situ* y *ex situ* [27, 28].

En ecología, los estudios poblacionales son imprescindibles para conocer la historia de vida y los procesos reproductivos de un organismo, siendo aún desconocidos estos aspectos para las especies de cactáceas, principalmente las que se encuentran en alguna categoría de protección, y sus respectivas poblaciones [29]. Esto se debe a que los estudios de este tipo requieren de periodos largos de observación y son más costosos que el simple registro puntual de la presencia y densidad de organismos en una población [30]. No obstante, el estudio y registro de los procesos reproductivos y fenológicos, además de las variables poblacionales, ayudan a determinar la importancia de los principales procesos demográficos como la permanencia, el crecimiento y la fecundidad, siendo estos indispensables para estimar el impacto de la pérdida de individuos de diferentes tamaños o edades sobre el crecimiento poblacional [25, 31].

Por ejemplo, para *Mammillaria albiflora*, en el año 2015 [32] se estudiaron los parámetros demográficos como densidad y estructura de tamaños en una población, donde se definieron ocho clases diamétricas, una densidad de 2.9 individuos/m² y se concluyó que la población presentó una estructura de tipo decreciente (Figura 3). En comparación con otras especies de cactáceas endémicas y amenazadas, específicamente respecto a la densidad, se ha reportado

para *Mammillaria gaumeri* presenta 0.28 ind/m² [20], *M. napina* presenta 2.39 ind/m² [33], *M. supertexta* presenta 1.42 ind/m² [34], *M. dixanthocentron* presenta 0.10 ind/m², *M. hernandezii* presenta 0.30 ind/m², *M. huitzilopochtli* presenta 0.23 ind/m², *M. kraehenbuehlii* presenta 0.08 ind/m², *M. pectinifera* presenta 0.28 ind/m² y *M. solisioides* presenta 0.61 ind/m² [35].

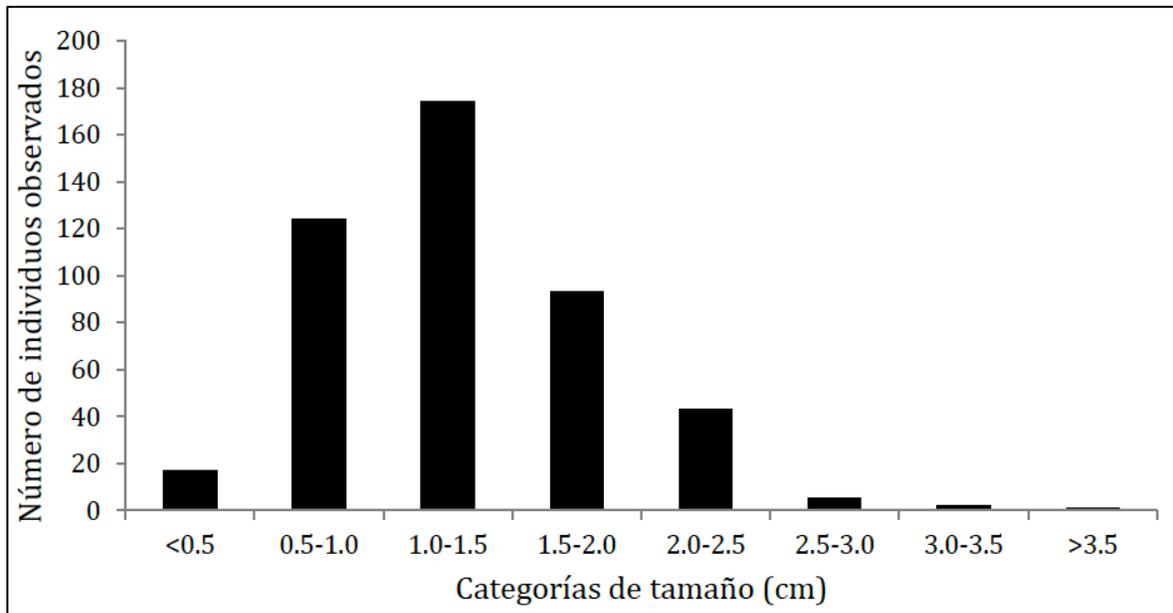


Figura 3. Número de individuos de *Mammillaria albiflora* encontrados para cada una de las categorías de tamaño. Tomada de Cruz Santos A. (2015).

Contar con registros de tamaño y densidad de individuos en una población a través de los años es como se describe la historia de vida de una especie que, en particular para las cactáceas, toma muchos años de seguimiento debido a su lento crecimiento. El generar nuevo conocimiento sobre la dinámica poblacional de especies de cactáceas en riesgo de extinción, proveen un soporte robusto para la toma de decisiones de su protección, dejando de lado la subjetividad y planteando rutas interdisciplinarias para su manejo y conservación.

MICROBIOMA.

El microbioma comprende la colección completa de microorganismos en un nicho específico, por ejemplo, la rizosfera [36]. La riqueza y abundancia de bacterias en el microbioma es variable respecto del nicho, debido probablemente a las interacciones con otros

microorganismos como nemátodos, arqueas y hongos no micorrízicos [36]. Las plantas albergan muchos microorganismos que tienen funciones cruciales en su desarrollo, adaptabilidad y diversidad [37], por ello la relevancia de su estudio y conocimiento.

Las especies de plantas de ambientes áridos crecen bajo presiones de selección extremas, lo que ha generado conjuntos microbianos de la rizosfera con capacidades para promover su crecimiento y supervivencia, además, se le atribuyen al microbioma de la rizosfera funciones como el controlar la producción de biomasa, la adquisición de nutrientes, la resistencia al estrés biótico y abiótico, el control de fitopatógenos y la modulación de las hormonas vegetales [38–40] (Figura 4). Comprender las estructuras de estas comunidades y sus mecanismos de interacción puede conducir a promover fenotipos de interés como la resistencia a la sequía [40]. Así mismo, estudiar dicha composición microbiana es fundamental para dilucidar los procesos ecológicos y las necesidades de las plantas asociadas.

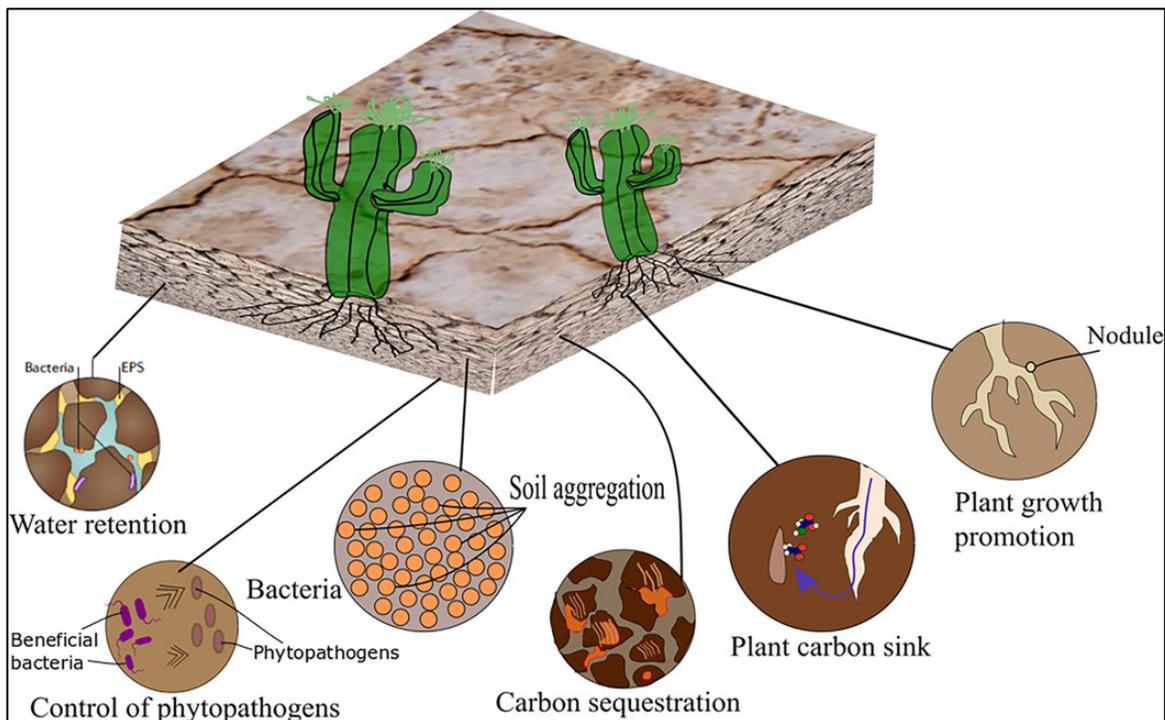


Figura 4. El papel de los organismos promotores del crecimiento de las plantas en la mejora de la salud del suelo y la mitigación del estrés abiótico y los efectos negativos del cambio climático. Figura obtenida de Segun Ayangbenro, A., & Oluranti Babalola O., 2021.

En cactáceas ha sido poco estudiada la diversidad de microorganismos asociados, sin embargo, algunos estudios con especies de esta familia han revelado que tanto las bacterias como los hongos son capaces de colonizar densamente la rizosfera, como se identificó para *Pachycereus springlei*, *Stenocereus thurbei* y *Opuntia cholla* [41]. Derivado del conocimiento de las comunidades bacterianas en cactáceas, se han logrado aislar y caracterizar algunas cepas de los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Enterobacter*, responsables de la erosión de las rocas y que promueven el crecimiento en cactus que crecen en acantilados rocosos, sobre grandes rocas o en antiguos flujos de lava [42–44]. Otro estudio, que combinó métodos dependientes e independientes de cultivo, mostró que Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria eran los filos más representados asociados con la rizosfera de *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, siendo Actinobacteria, Proteobacteria y miembros de Firmicutes, los recuperados con mayor frecuencia mediante técnicas de aislamiento [45]. En el caso de los hongos, hasta el momento no han sido identificados los grupos formadores de micorrizas específicos para cactáceas, pero se conoce que son capaces de mejorar la absorción de P y Zn en *Ferocactus acanthodes*, y la absorción de CO₂ tanto en *F. acanthodes* como en *Opuntia ficus-indica* [46, 47].

Es por lo anterior, que los ecólogos microbianos utilizan herramientas moleculares que faciliten el análisis de las muestras provenientes del microbioma, su caracterización a mayor resolución y con ello comprender las complejas interacciones entre los organismos que son capaces de dictar en algunos casos la morfología, fisiología y el comportamiento, abordando la biogeografía funcional y no sólo a las entidades taxonómicas [48].

PROPAGACIÓN POR INJERTO.

El injerto es un método de propagación vegetativa en las plantas, históricamente implementado en especies leñosas de uso comercial como frutales y ornamentales, su base técnica es la unión de una sección de una planta, en la que al realizar un corte se aprecie su anillo vascular (haz vascular), la cual aporta un sistema radicular establecido, llamado portainjerto o patrón, con otra planta que también exponga su sistema vascular, denominada

vástago o injerto, las cuales subsecuentemente crecerán y se desarrollarán como una planta compuesta [49–51] (Figura 5).

La histología del proceso de desarrollo en un injerto exitoso de plantas incluye: la adhesión inicial del vástago y el portainjerto, la formación del callo de la herida tanto en el portainjerto como en el vástago, y la diferenciación del tejido vascular para formar una unidad funcional entre el vástago y el portainjerto [52]. Varios factores, como la compatibilidad entre injerto y portainjerto, especies de plantas, tipo de injerto, condiciones ambientales y reguladores del crecimiento de las plantas, pueden influir en el éxito de la unión del injerto [50].

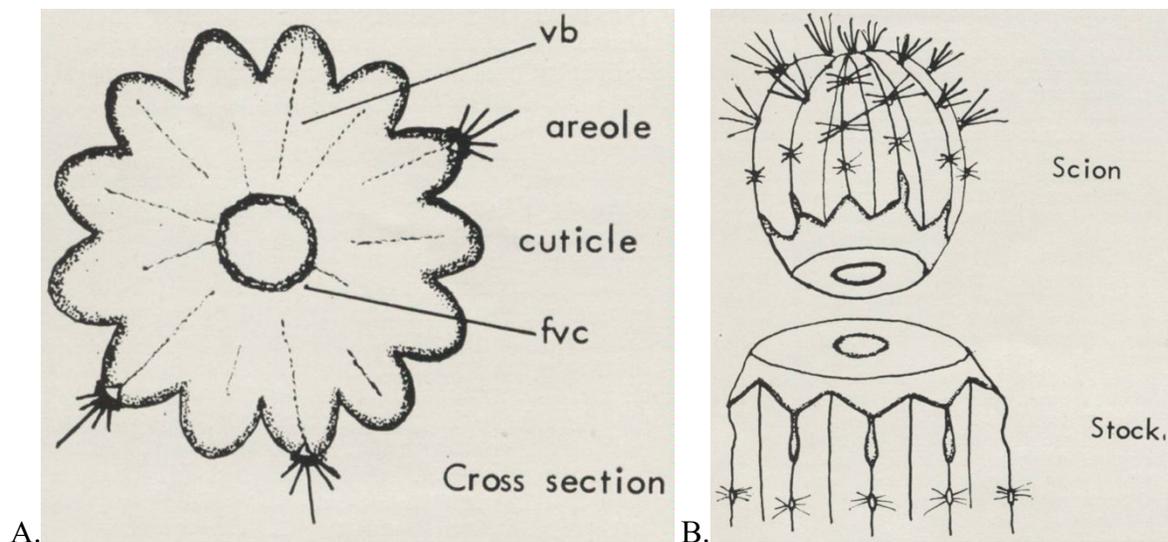


Figura 5. Corte transversal de una Cactácea. A. Se aprecian el haz central de tejido fibrovascular (fvc), haces vasculares (vb), las areolas y cutícula. B. Esquema del vástago (scion) y portainjerto o patrón (stock), donde en ambos se aprecia su haz central fibrovascular. Figura obtenida de McMillan A. J. S. (1966).

La horticultura y el paisajismo consideran hoy en día a los cactus injertados como una de las plantas ornamentales más apreciadas en todo el mundo y se han convertido en un método comercial de propagación con la finalidad de acelerar la tasa de crecimiento de especies de lento desarrollo, asegurar la supervivencia de las plantas con un sistema radicular deficiente, mantener las formas crestadas o monstruosas, pero también ha proporcionado una herramienta útil a los conservacionistas, para salvar especies que se encuentran en una categoría de riesgo o en peligro de extinción [53].

La propagación por injerto tiene un papel importante en la supervivencia de algunas especies pertenecientes a la familia Cactaceae, puesto que estas plantas tienen la capacidad de propagarse tanto por semillas o esquejes, como por esta técnica y más recientemente también por la propagación *in vitro* o la combinación de micro-injertos *in vitro* [54]. Los injertos han sido implementados para rescatar plantas severamente podridas o enfermas, asegurando un mejor crecimiento y recuperación, igualmente, para la estimulación de la floración, desarrollo de esquejes o hijuelos y la obtención de semillas de ejemplares de cactáceas de importancia, por su rareza o categoría de protección, en un tiempo más corto que de manera natural [49, 55, 56].

Se ha estudiado la respuesta a la injertación de plantulas de *Opuntia robusta* var. CP-Tepemor con la finalidad de mantener variedades de interés comercial. Estas se injertaron en patrones de la misma especie en dos tipos de injerto, cara plana y perforación, resultando un 30% y 73% de prendimiento de las plántulas al patrón, respectivamente. Se registró también la sobrevivencia de plántulas de color rosa, una variedad de esta especie que normalmente tiene un tiempo de vida de cinco días, hasta 25 días en injerto de perforación, lo que representa un avance importante para el mantenimiento de este fenotipo de interés [57].

Otro ejemplo del uso de injerto para favorecer el desarrollo de cactáceas con problemas de lento crecimiento y escaso sistema radical es el trabajo realizado por Flores Pérez S. [58], donde estableció dos experimentos utilizando como portainjerto de *Hylocereus trigonus* e *Hylocereus undatus*; y *Lobivia sylvestrii* forma aurea, *Notocactus leninghausii* y *Copiapoa tenuissima* forma cristata como injertos, adicionando distintas soluciones nutritivas a cada tratamiento (Solución de Steiner, 2:2:4 de NPK y La Molina aplicadas al 25%) y evaluando la velocidad de crecimiento. Sus resultados mostraron que la aplicación de soluciones nutritivas favorece el desarrollo del injerto, así como su incremento en diámetro y altura, la aparición de raíces y la floración. Las variables medidas fueron diámetro y altura en 42, 57, 72, 87 y 102 días, así como la aparición de brotes, flores o raíces. Concluye con una aportación a la técnica, mencionando la importancia de la similitud anatómica del injerto y del portainjerto, la nutrición que se les proporcione, la sanidad de las plantas, el manejo de

los materiales al injertar (riegos de contaminación por fitopatógenos), las condiciones de temperatura, humedad relativa, oxigenación, tipo de injerto utilizado y del manejo de este, para que los resultados sean exitosos.

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

La micropropagación es una de las técnicas de propagación de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* aplicadas a las cactáceas, la cual se puede definir como un método vegetativo de propagación realizado en condiciones asépticas *in vitro* utilizando pequeñas porciones de la planta, también llamadas explantes, como segmentos de tallo, cotiledones, hojas, yemas axilares y apicales, semillas maduras e inmaduras y embriones [59] (Figura 6). Las prácticas convencionales de propagación en cactáceas han resultado insuficientes tanto para satisfacer la demanda comercial de estas plantas como para cumplir con objetivos de conservación de especies con bajas tasas de germinación de semillas, de lento crecimiento y escasa o nula ramificación lateral (esquejes o clones), por lo anterior, la propagación *in vitro* ha resultado una alternativa prometedora implementada con fines de rescate, reintroducción y restauración *ex situ* de estas plantas [60–62]. Por ejemplo, se han logrado buenos e importantes resultados en propagación *in vitro* con especies mexicanas de cactáceas amenazadas de los géneros *Turbinicarpus*, *Pelecyphora*, *Ariocarpus* y *Mammillaria* [63–66].

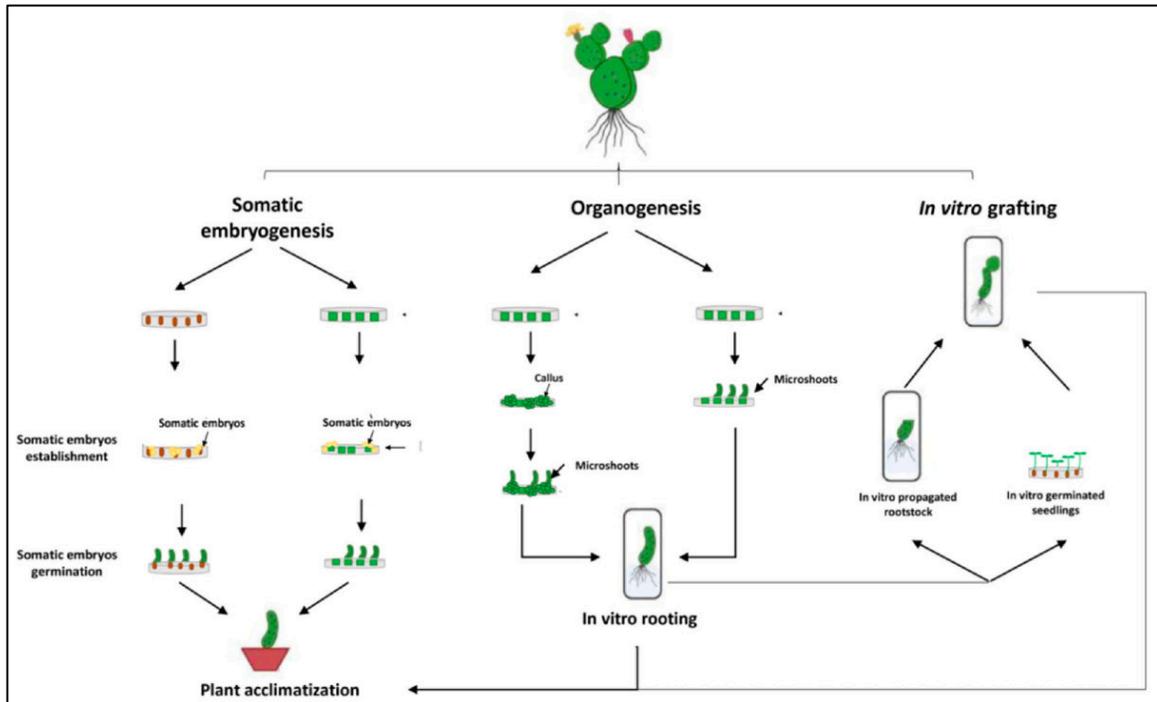


Figura 6. Visión general de las diferentes técnicas de micropropagación *in vitro* aplicadas en especies de cactus. Figura obtenida de Bouzroud, S., *et al.*, 2022.

Considerando que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta muy útil para acelerar los procesos de producción de plantas, su factibilidad dependerá del manejo de los factores que favorecen este proceso, como el medio de cultivo utilizado donde la concentración de nutrientes, hormonas, horas de luz, temperatura, pH, humedad relativa, suministro de oxígeno, entre otros, influyen en el desarrollo de las plantas; por lo que la respuesta morfológica del explante dependerá de la estandarización del protocolo de micropropagación [67]. Derivado de esta estandarización de condiciones, las especies y subespecies de cactus responden de manera diferente en el cultivo, por lo que es relevante conocer sus diversas respuestas y desarrollar sistemas de propagación *in vitro* particulares para cada taxón [60].

En las últimas tres décadas, la propagación *in vitro* en cactáceas ha resultado una alternativa que ha ofrecido estrategias no sólo para recuperar especies en alguna categoría de protección y conservación sino también para brindar oportunidades para la comercialización de especies raras, inclusive en peligro de extinción, para mantener y aumentar la diversidad genética en las poblaciones silvestres y favorecer su rescate o recuperación en sus hábitats naturales.

ANTECEDENTES.

Cruz Santos A. [32] en su tesis de licenciatura, realizó una evaluación de la diversidad genética poblacional de *M. albiflora*, considerada como especie endémica del Estado de Guanajuato. Analizó 179 cuadros de 1m², para obtener su densidad poblacional, así como la estructura de tamaños de las plantas que se obtuvo a partir del diámetro de los individuos. Para el análisis genético se utilizaron 8 microsatélites diseñados para *Mammillaria crucigera* en 83 muestras. Se calculó la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada, la diversidad y la riqueza alélica, así como el coeficiente de endogamia. *M. albiflora* tiene una densidad poblacional promedio de 2.9 individuos/m². Encontró que el diámetro promedio de los individuos fue de 1.28 cm, con un intervalo de 0.09 a 3.66 cm. A partir de los diámetros se obtuvieron 8 categorías diamétricas de tamaño (Figura 3). Los resultados indican que *M. albiflora* tiene una diversidad genética menor a la de otras especies del género *Mammillaria*. Además, la deriva génica podría estar perjudicando gravemente a la población. Por lo que, para evitar una mayor pérdida de variabilidad genética se sugiere implementar programas de conservación que eviten el saqueo de los organismos y que incluyan el cultivo y reintroducción de nuevos individuos en sus diferentes poblaciones. Se sugiere también, incluir a *M. albiflora* en el Apéndice I de la CITES, así como someterla al Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER) para poder incluirla en alguna categoría de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT.

En el año 2016, Solórzano S. y colaboradores [68], estudiaron en *M. albiflora* si la diversidad genética intraespecífica se puede aplicar para identificar prioridades de conservación. Se desarrolló la investigación en una población con ~1000 individuos distribuidos en cuatro parches cercanos que cubren 4.3 km². Se genotipificó un total de 96 individuos con 10 loci microsatélites para describir la subestructura genética y la diversidad. Sus resultados sugieren que existe una subestructura poblacional significativa: la diversidad genética se distribuye en tres vecinos genéticos y varía entre los parches, los genotipos no se distribuyen aleatoriamente y tres barreras genéticas restringen el flujo genético. Además, indican que el tamaño actual de la población es 15 veces menor que en el pasado. Concluyen que para

conservar la diversidad genética de esta especie, al menos dos de los cuatro parches de la población se protejan legalmente o bajo algún criterio de área natural protegida, así como desarrollar un programa de propagación legal que pueda ayudar a disminuir la cosecha en las poblaciones naturales. Finalmente, incluir a *M. albiflora* en la Lista Roja de Especies de México en la categoría de riesgo de extinción o en su equivalente de las Normas Oficiales Mexicanas de protección de especies silvestres.

Solorzarno S. y colaboradores [69], desarrollaron el Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de Plantas en México para *M. albiflora*. Esta evaluación consiste en conocer aspectos biológicos y ecológicos de una planta bajo los siguientes criterios: características de la distribución geográfica, características del hábitat, vulnerabilidad biológica intrínseca e impacto de la actividad humana. Por mencionar alguno, en su distribución geográfica se debe contemplar la extensión de la distribución como porcentaje de la extensión territorial de los biomas en el país y su área de ocupación; es decir, el área dentro de su extensión de presencia que es ocupada por el taxón, ya que esta última puede contener hábitats no adecuados. Se asigna una numeración para cada característica y con el resultado obtenido se clasifica la especie dentro de alguna categoría de riesgo oficiales consideradas en la NOM-059-SEMARNAT-2010, como Sujeta a Protección Especial (Pr), Amenazada (A) y En Peligro de Extinción (P). Desafortunadamente no fue publicado este estudio y el esfuerzo de realizarlo e incluir a la especie en la norma oficial no se concluyó.

Fonseca García Citlali y colaboradores [70], analizaron la composición, la diversidad y los factores que influyen en las comunidades de bacterias, arqueas y hongos superficiales y subterráneos asociados con dos especies de cactus nativas y simpátricas en el Estado de Guanajuato: *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta*. El resultado del perfil filogenético mostró que la composición y el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas con los cactus estaban influenciados principalmente por el compartimento de la planta y que la diferencia de especies, el lugar o la estación del año desempeñaron sólo un papel menor. Sorprendentemente, la diversidad de bacterias y arqueas fue mayor en la filósfera que en la rizósfera de los cactus, mientras que ocurrió lo contrario en el caso de los hongos. Los suelos semiáridos exhibieron los niveles más altos de diversidad microbiana,

mientras que la endosfera del tallo, la más baja. A pesar de su distancia taxonómica, *M. geometrizzans* y *O. robusta* compartieron la mayoría de los taxones microbianos en todos los compartimentos analizados. Estos resultados sugieren que los hongos establecen interacciones específicas con su planta huésped dentro del tallo, mientras que las comunidades microbianas en los otros compartimentos de la planta pueden desempeñar funciones similares en estas dos especies. La caracterización bioquímica y molecular de las bacterias transmitidas por las semillas de los cactus respalda la idea de que estos simbioses microbianos pueden heredarse verticalmente y podrían promover el crecimiento de las plantas y la tolerancia a la sequía para la aptitud del holobionte de los cactus.

Coleman-Derr Devin y colaboradores [71], se plantearon la hipótesis de que las plantas del desierto sobreviven al estrés ambiental inherente a estas regiones en parte gracias a las simbiosis con microorganismos. Así mismo, realizaron la primera investigación exhaustiva de las comunidades microbianas asociadas con especies del género *Agave*, que son nativas de regiones semiáridas y áridas de América Central y del Norte. Examinaron las comunidades procariotas y fúngicas en la rizósfera, filosfera, endosfera de hojas y raíces, así como en muestras de suelo proximal y distal de agaves cultivados y nativos, en tres zonas de los estados de Guanajuato, Jalisco y California (EE. UU.), a través de la secuenciación por síntesis. En el perfil filogenético se reveló que la composición de las comunidades procariotas estaba determinada principalmente por el compartimento de la planta, mientras que la composición de las comunidades fúngicas estaba influenciada principalmente por la biogeografía de la especie huésped. Por último, *Agave tequilana* cultivado exhibió niveles más bajos de diversidad procariota en comparación con los agaves nativos (*Agave salmiana* y *A. deserti*), aunque no se encontraron diferencias en la diversidad microbiana en la endosfera, y de manera general los taxones procariotas y fúngicos encontrados se conoce que promueven el crecimiento de las plantas y confieren tolerancia al estrés abiótico, lo que sugiere principios comunes que sustentan las interacciones entre agave y microorganismos.

Ramírez Malagón R. y Salazar Solís E. [72], desarrollaron protocolos para la propagación *in vitro* de siete especies de cactus presentes en municipios del noreste del estado de Guanajuato: *Mammillaria geminispina*, *M. magnimamm*, *M. marcosii*, *M. mercadensi*, *M.*

petterssonii, *Coryphanta radians* y *Ferocactus latispinus*. En sus resultados observaron que la presencia en el medio de cultivo de la citocinina cinetina es esencial para la multiplicación de las especies, ya que las máximas respuestas se presentaron en las mayores concentraciones de citocinina, 6 mg/l y 10 mg/l, siendo notorio que tres especies, *M. geminispina*, *M. magnimamma* y *M. marcosii* indujeron sus respuestas en las máximas concentraciones de los dos reguladores de crecimiento empleados, ácido indolacético (AIA) = 4 mg/l y cinetina 10 mg/l con promedios de 6.0, 6.0 y 9.2 brotes por explante para estas tres especies, respectivamente. Sin embargo, se presentó una excepción, y ésta fue la respuesta de *F. latispinus*, la cual en presencia de AIA = 4 mg/l y en ausencia de cinetina indujo 4.8 brotes por explante, mostrando la variabilidad en respuestas a los reguladores de crecimiento más baja reportada en diferentes especies de la familia Cactaceae.

Aquino David y colaboradores [10], contribuyen al incremento en la riqueza de especies del género *Mammillaria* y en la importancia de la región del noreste del estado de Guanajuato al describir una nueva especie endémica al bajío mexicano: *Mammillaria ariasii*. Esta nueva especie se distingue por el número de espinas radiales, la longitud de la espina central inferior y el color de los tépalos internos del perianto, diferenciándose de *Mammillaria hahniana*, la especie más cercana en distribución geográfica y con la cual se identificaba como la misma. Habita en suelos poco arcillosos y rocosos, sobre relieves volcánicos evitando las faldas de montaña o pie de monte, en un área de ocupación aproximada de 28 km² y de extensión de ocurrencia de 345 km². Se encuentra en bosques de *Quercus* y tropical caducifolio, en un rango de altitud de 920 a 2000 m s. n. m. De acuerdo con sus resultados, además de incrementar el listado de especies de plantas y cactáceas para Guanajuato, consideran se incluya en la Norma Oficial Mexicana de protección a las especies (NOM-059-SEMARNAT-2010) bajo la categoría de En Peligro de Extinción.

JUSTIFICACIÓN.

Mammillaria albiflora es una cactácea microendémica del estado de Guanajuato, su distribución extremadamente restringida, el alto grado de endemismo, su bajo reclutamiento, la pérdida y fragmentación de su hábitat hacen de ésta, una especie en vías de desaparición. Estudiar la dinámica demográfica de sus poblaciones nos aproximará a comprender su ciclo de vida, estadios, depredación, polinizadores y disturbios. Además, la identificación de la diversidad del microbioma asociado a las raíces de *M. albiflora* proporcionará información sobre sus interacciones ecológicas, adaptación, supervivencia y respuesta ante factores ambientales extremos de su ecosistema.

Tanto la propagación por cultivo de tejidos vegetales (*in vitro*) como por injerto, representan alternativas viables en casos de cactáceas en riesgo de extinción. Además, permiten la producción masiva de nuevos individuos en periodos de tiempo más cortos en comparación con los métodos convencionales de propagación desde semilla, siendo ambas técnicas desarrolladas por primera vez para *M. albiflora* y complementarias como acciones de conservación de la especie.

HIPÓTESIS.

- 1.- Los valores de densidad poblacional bajos y parámetros diamétricos uniformes indican un declive en las poblaciones de *M. albiflora*, lo que se suma a los factores de extinción.
- 2.- La comunidad microbiana asociada al rizoma de *M. albiflora* se constituye de diversidad y riqueza propios para la especie y es distinto entre poblaciones y respecto a otras especies.
- 3.- La propagación por injerto específico para *M. albiflora*, favorece su crecimiento, y la generación de nuevos individuos viables en un menor tiempo.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la diversidad del microbioma de *M. albiflora*, analizar los rasgos ecológicos de la población y proponer protocolos de propagación como herramientas para la conservación de esta especie en peligro de extinción y microendémica de Guanajuato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar los parámetros demográficos de dos poblaciones de *M. albiflora*.
2. Identificar la comunidad microbiana asociada a la rizósfera mediante metagenómica.
3. Implementar la técnica de propagación por injerto bajo condiciones en invernadero.
4. Elaborar un protocolo de propagación *in vitro* con revisión de literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS.

ÁREA DE ESTUDIO.

El estado de Guanajuato forma parte de la región meridional del gran desierto Chihuahuense, denominada como la zona árida Queretana-Hidalguesa y constituida por varias depresiones y valles secos aislados [73, 74]. Esta región posee una riqueza importante de especies de cactáceas [6–9] y en particular el noreste del Estado ha sido reconocido como el área de mayor diversidad a nivel nacional, para el género *Mammillaria* [14]. La población conocida de *M. albiflora* se localiza al sur del municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato [15, 32, 68] (Figura 7), establecida en las llanuras de matorral xerófilo compuesto por una comunidad vegetal predominada por pastizales, herbáceas y elementos florísticos de los géneros *Prosopis*, *Acacia*, *Yucca*, *Cylindropuntia*, *Opuntia*, *Agave*, *Mammillaria*, *Coryphantha*, entre otros [13] (Figura 8). En el municipio de San Luis de la Paz, Gto., se presenta un clima cálido semi-seco, con una precipitación promedio anual de 490 mm, lluvias en verano y temperaturas máxima de 32°C y mínima de -5.5°C, con promedio anual de 14.9°C, a una altitud entre los 1950 y 2300 m snm [16, 17].

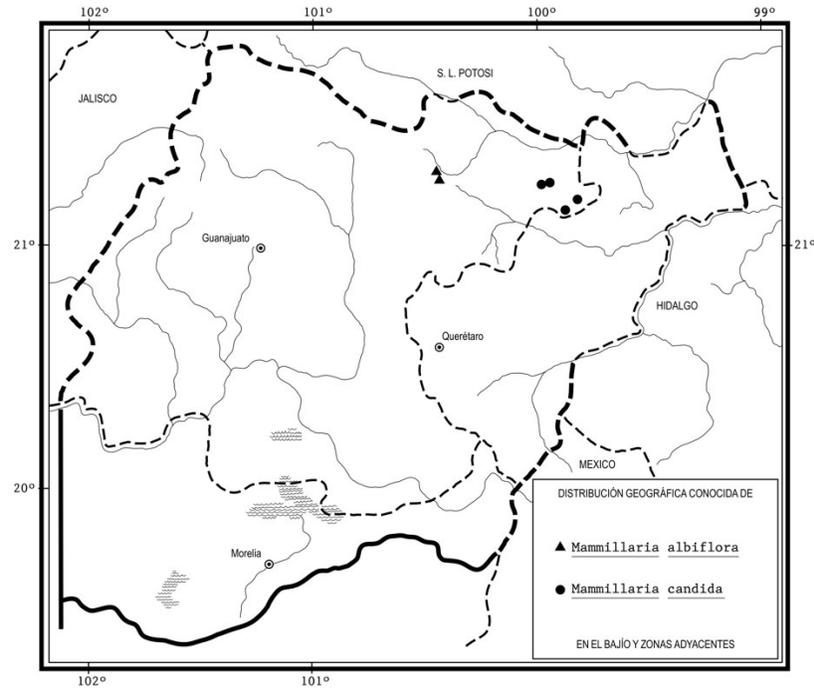


Figura 7. Distribución geográfica conocida de *M. albiflora*. Tomada de Arias S. y Aquino D. (2019).



Figura 8. Vista del hábitat donde se distribuye *M. albiflora*.

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.

M. albiflora (Werdern.) Backeb. [75], de nombre común “biznaga bola de hilo de flor blanca”, es una cactácea pequeña con raíces engrosadas, tallo de hasta 2.5 cm de alto, por 2 cm de ancho, globoso a cilíndrico y corto, con una porción subterránea, látex de consistencia acuosa, tubérculos de 0.3 a 0.5 cm de largo, por 0.2 a 0.3 cm de ancho, sus axilas desnudas, aréolas circulares, espinas radiales de 60 a 80, de hasta 0.35 cm de largo, aciculares, blancas, espinas centrales ausentes; flor de 3 a 4 cm de largo, por 2.4 a 3.5 cm de ancho, el tubo receptacular evidente; tépalos externos de hasta 0.95 cm de largo, lanceolados, agudos, recurvados, de color castaño con el margen blanco y ligero tono verde; tépalos internos de hasta 1.8 cm de largo, lanceolados, acuminados, recurvados, de color blanco; estilo blanco, estigma con 4 a 5 lóbulos, de color verde; fruto de 1 a 2 cm de largo, de color verde pálido con ligero tono rosado, globoso, retenido parcialmente entre las espinas y los tubérculos donde se desintegra, no conserva los restos secos del perianto; semillas de 1.4 mm de largo, de color castaño oscuro y ovaladas [18, 76] (Figura 9).





Figura 9. Individuos de *Mammillaria albiflora*. Esquina superior izquierda se aprecia el detalle de la especie en floración con su característica particular de tamaño y color.

ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN.

El análisis se enfocó en conocer la dinámica demográfica de poblaciones de *M. albiflora*, registrando los diferentes estadios del ciclo de vida de esta cactácea, es decir, individuos adultos, individuos juveniles, hijuelos, fecundidad (cuántas flores producen, número de frutos, número de hijuelos o clones), supervivencia y crecimiento.

Primeramente, se describieron las poblaciones o sitios donde se llevó a cabo el muestreo, para ello se definieron dos poligonales para delimitar la superficie, una por cada población. Se delimitó el primer polígono correspondiente a la población 1 con una superficie de 3.45 hectáreas y se denominó como población con disturbio, puesto que está impactada por una excavación de gran tamaño para extracción de materiales pétreos justo en la mitad del área delimitada, donde se encuentra la población desde el año 2016 (Figura 10). Para la población 2 se definió un polígono de muestreo de 1.93 hectáreas y se denominó como población semi-conservada, debido a que se detectó poca actividad de ganado vacuno pastando en la zona y no se apreciaban impactos negativos significativos al ecosistema (Figura 11). Las poblaciones se encuentran separadas entre sí a una distancia aproximada de 3 km (Figura 12).

Para describir la estructura poblacional y estimar su densidad se utilizaron cuadrantes de 1m², dirigidos a las áreas ocupadas por individuos de *M. albiflora*. Los cuadrantes fueron elaborados con tubo de Policloruro de vinilo clorado (CPVC) de media pulgada (½”) de

diámetro y se ensamblaron con 4 codos de igual medida y material. Para señalar y ubicar el cuadrante en el terreno se colocó una estaca metálica de barilla de acero de ½” de grosor y 20 cm de largo, en la esquina superior izquierda de cada cuadrante con orientación Este y se registraron las coordenadas geográficas de cada cuadrante. En cada cuadrante se cuantificó el número total de individuos durante el tiempo cero (T0) en Julio de 2023, así mismo, a cada individuo se le tomaron medidas de su diámetro (cm) y altura (cm), y se complementó el registro con datos de parámetros ecológicos y ambientales como altitud, velocidad de viento, temperatura, humedad, individuo adulto, joven o clon, presencia de flor y/o fruto, así como observaciones en general para la construcción de la base de datos.

Las categorías de tamaño se establecieron de acuerdo con los registros y observaciones en campo, teniendo en cuenta los intervalos de los diámetros obtenidos y el total de individuos. Se realizó una prueba T-student, para determinar diferencias en diámetros y alturas entre poblaciones, y una regresión lineal y correlación de las mismas variables numéricas utilizando el software R versión 4.3.2 [77].

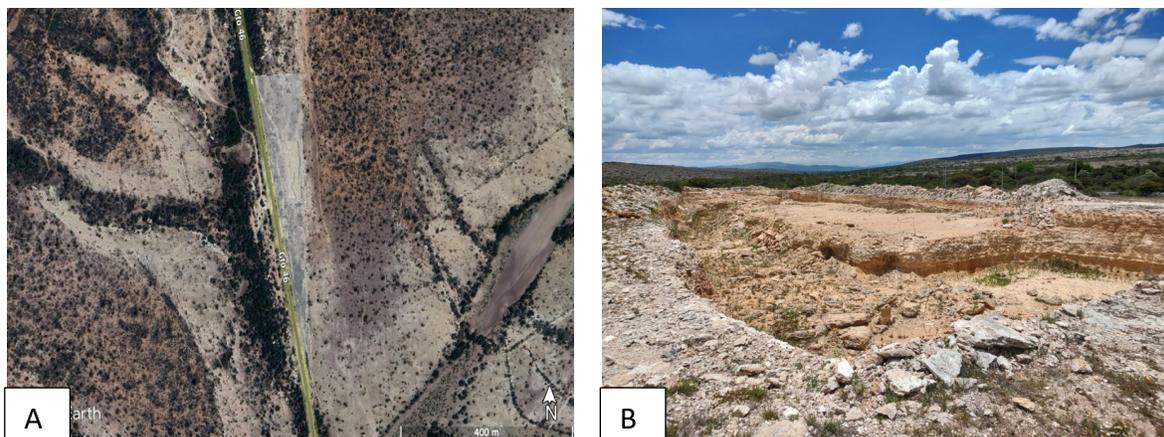


Figura 10. Polígono de la población con disturbio de *M. albiflora*, con una superficie de 3.45 hectáreas. A. Vista satelital del polígono. B. Panorámica del sitio con claro disturbio.

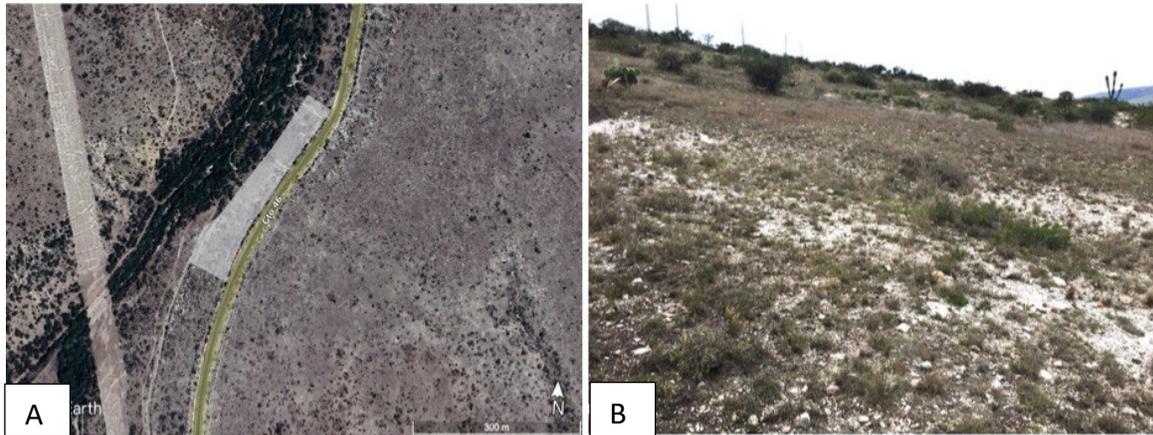


Figura 11. Polígono de la población semi-conservada de *M. albiflora*, con una superficie de 1.93 hectáreas. A. Vista satelital del polígono. B. Panorámica del sitio semi-conservado.



Figura 12. Ubicación de las poblaciones con disturbio y semi-conservada de *M. albiflora* en su área de distribución conocida.

Se llevó a cabo una revisión de supervivencia a los 6 meses de T0 (enero de 2024), en la cual se registraron parámetros fenológicos, ecológicos y ambientales, como individuo vivo o muerto, presencia de flor o fruto, herbivoría, daño mecánico, disturbio, temperatura,

velocidad de viento, altitud, humedad y observaciones generales para la integración de la base de datos.

La toma de datos de la estructura poblacional por individuo en cada cuadrante se continuó a los 12 meses (T1) del T0, es decir, julio de 2023 y julio de 2024. Se registraron nuevamente las variables numéricas de cantidad de individuos por cuadrante, diámetro, altura, así como los datos fenológicos, ambientales y observaciones generales para un ciclo anual completo. También, se reportó la presencia o ausencia tanto de individuos ya registrados como de nuevos individuos, plántulas o brotes.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y COLECTA DE MUESTRA DE LA RIZÓSFERA.

Con el propósito de analizar la comunidad microbiana asociadas a las raíces de *M. albiflora*, se colectó una muestra del rizoma compuesta por submuestras de aproximadamente el 10% de los individuos medidos en los cuadrantes en cada población, con la finalidad de tener representatividad de la población. La colecta se realizó a inicios del periodo de lluvias, a mediados de julio del año 2023. Para ello se eligieron plantas de tamaños medianos a grandes con buen aspecto y una vez seleccionadas se excavó cuidadosamente junto al ejemplar para exponer sus raíces y poder realizar la toma de la muestra (Figura 13). Con la ayuda de unas tijeras y pinzas quirúrgicas, previamente desinfectadas con etanol 96%, se depositó el material colectado en una bolsa nueva con cerrado hermético y se resguardó en una hielera con hielo para su traslado al laboratorio, donde se almacenaron las muestras, previo a su procesamiento a una temperatura de -80°C . Al finalizar la toma de muestra de la rizósfera de cada ejemplar, se enterró nuevamente para evitar una exposición prolongada de las raíces al sol y al aire, por último se regó con agua purificada para compactar la tierra removida por la excavación e hidratar al ejemplar.



Figura 13. Proceso de toma de muestra de rizósfera de *M. albiflora*.

De manera complementaria a la muestra de la rizósfera, se realizó una toma de muestra de suelo del área donde se encuentra la población con la finalidad de conocer las propiedades físicas y químicas del suelo. En ambas poblaciones el suelo es muy rocoso y poco profundo por lo que se hizo una muestra compuesta por varias submuestras, colectadas con una pala pequeña, excavando hasta aproximadamente 20 cm en diferentes puntos dentro del polígono de cada población y con ello completar aproximadamente un kilogramo de suelo. Posteriormente la muestra fue cernida y dejada extendida sobre papel durante cinco días para eliminar la mayor humedad posible, de acuerdo con lo indicado por el Laboratorio de Suelo, Agua y Nutrientes Vegetales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a donde se envió por paquetería la muestra, embalada en bolsas nuevas para su análisis.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Para llevar a cabo la extracción del DNA genómico de las muestras de cada población (con disturbio y semi-conservada) se consideraron dos técnicas, la extracción por solventes orgánicos (Sambrook y Russel) y la extracción con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN).

La extracción de DNA de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001) [78], con modificaciones, se describe a continuación: Se tomaron fragmentos pequeños de las muestras colectadas y se colocaron dentro de un mortero de porcelana (previamente lavado

y esterilizado con calor seco, posteriormente enfriado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se trituró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual se colocó en un tubo Eppendorf que contenía $400\text{ }\mu\text{L}$ de NTES (NaCl $0,1\text{ M}$, Tris pH 8, EDTA $0,001\text{ M}$ y SDS al 1% v/v). El tubo se agitó mediante un agitador tipo vórtex hasta obtener una mezcla uniforme y se colocó en hielo. Se le adicionaron $200\text{ }\mu\text{L}$ de fenol y $200\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo, se agitó mediante un agitador tipo vórtex y se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente, el tubo se centrifugó por 10 min a 2800 xg a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una centrífuga Eppendorf 5417R. Después se recuperaron $350\text{ }\mu\text{L}$ del sobrenadante (fase acuosa) y se adicionó nuevamente fenol-cloroformo como se mencionó anteriormente y nuevamente se recuperó el sobrenadante (fase acuosa), se añadió $5\text{ }\mu\text{L}$ de RNAsa y se incubó durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se precipitó añadiendo $20\text{ }\mu\text{L}$ de NaCl 5 M y $400\text{ }\mu\text{L}$ de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Enseguida se centrifugó por 5 minutos a 2700 xg a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se desechó el sobrenadante. Se adicionó $1000\text{ }\mu\text{L}$ de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Nuevamente se centrifugó por 5 min a 960 xg y se desechó el sobrenadante. Por último, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA obtenido en $100\text{ }\mu\text{L}$ de agua grado HPLC.

El DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN), de acuerdo con lo indicado por el fabricante, comprende un método novedoso y patentado para la purificación rápida y fácil del DNA celular total de células, tejidos y semillas vegetales, además, este kit se puede utilizar para purificar el DNA bacteriano, fúngico y viral de muestras de plantas y raíces. También contiene una tecnología que elimina los inhibidores de la PCR, presentes muy frecuentemente en muestras de plantas por los metabolitos secundarios y otros elementos que estas contienen. Se siguió el protocolo del fabricante con una modificación inicial como se indica en los siguientes pasos: Se tomaron fragmentos pequeños de las muestras colectadas y se colocaron dentro de un mortero de porcelana (previamente lavado y esterilizado con calor seco, posteriormente enfriado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se trituró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se colocó en un tubo de disrupción de tejido de 2 mL , en tres medidas de peso diferentes entre 5 y 100 mg ($16, 25$ y 60 mg , respectivamente) y se agregaron $450\text{ }\mu\text{L}$ de Solución CD1 y $50\text{ }\mu\text{L}$ de Solución PS a cada uno de los tres tubos, se agitó en vórtex durante 5 s. Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente (entre 15° y 25°C) a $12,000\text{ xg}$ durante 2 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de $1,5\text{ mL}$. Se adicionaron $250\text{ }\mu\text{L}$ de

solución CD2 (mantenida en frío entre 2° a 8°C) y se agitó en vórtex durante 5 s. A continuación se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min, se recuperó y transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 mL (se esperan entre 400 y 500 µl) y se añaden 500 µl de buffer APP, se agitó en vórtex durante 5 s. Se cargan 600 µL de lisado anterior en una columna de centrifugación MB y se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min, se desechó el material que se ha filtrado y repitió este paso para asegurarse de que todo el lisado haya pasado por la columna de centrifugación MB. Se colocó la columna en un tubo de recolección limpio de 2 mL, se añadieron 650 µl de buffer AW1 a la columna de centrifugación MB, se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min y se desechó el líquido sobrante, dejando la columna de centrifugación MB nuevamente en el mismo tubo de recolección de 2 mL. Posteriormente se agregaron 650 µL de buffer AW2 a la columna de centrifugación MB, se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min y se desechó el líquido sobrante, conservando la columna de centrifugación MB en el mismo tubo de recolección de 2 mL. El tubo con la columna se centrifugó a 16,000 x g durante 2 min, después se colocó la columna de centrifugación MB en un nuevo tubo de elución de 1.5 mL, se agregaron de 50–100 µL de buffer EB al centro de la membrana de filtro blanca, se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min y se desechó la columna de centrifugación MB. Finalmente el ADN estuvo listo para aplicaciones posteriores.

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN.

La amplificación nos ofrece tener un panorama general de las comunidades de bacterias y hongos presentes en la muestra, para ello se utilizaron como marcadores moleculares del gen DNAr 16S y la región espaciadora de transcripción interna (ITS, siglas en inglés), respectivamente. Para la amplificación del gen DNAr 16S se utilizaron tres pares de oligonucleótidos [79] y para la región espaciadora de transcripción interna (ITS, siglas en inglés), utilizamos un par de oligonucleótidos de acuerdo con Montalva C. y colaboradores [80] (Tabla 1).

La reacción de amplificación para las muestras de ADN se realizó de la siguiente manera: Se preparó la mezcla para la reacción de amplificación en 2 µL de DNA de la muestra, 6 µL de agua grado HPLC, 10 µL de JumpStar DNA taq Polimerasa (Sigma-Aldrich), 0.8 µL de cada

oligonucleótido directo y 0.8 μL de cada oligonucleótido reverso, para obtener un total de aproximadamente 20 μL . Las condiciones de PCR utilizadas fueron una desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos térmicos de desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, 45 segundos de alineamiento a 55 $^{\circ}\text{C}$, una extensión por 2 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$ y una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos.

Las ampliificaciones fueron corroboradas mediante electroforesis en gel de agarosa preparada al 1% (p/v) en 40 mL de regulador TAE y adicionando 1.8 μL de SYBR[®] Safe DNA gel STAIN. La separación de los fragmentos se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 85 V a 400 amperios durante 30 minutos en una cámara de electroforesis con el mismo regulador TAE. El tamaño de las bandas se determinó por comparación con marcadores de tamaño de DNA (GeneRuler[™] DNA Ladders Mix).

La reacción de amplificación para las muestras de ADN extraído con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) se realizó de la siguiente manera:

Se preparó la mezcla para la reacción de amplificación con 2 μL de DNA de la muestra, 11.4 μL de agua grado HPLC, 10 μL de Platinum[™] II Hot-Start Green PCR Master Mix (2X), 0.8 μL de cada oligonucleótido directo y 0.8 μL de cada oligonucleótido reverso, para obtener un total de aproximadamente 25 μL . Las condiciones de PCR utilizadas fueron una desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, seguido por 35 ciclos térmicos de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, 1 minuto de alineamiento a 52 $^{\circ}\text{C}$, una extensión por 1 minutos a 68 $^{\circ}\text{C}$ y una extensión final a 68 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

Las ampliificaciones fueron corroboradas como se mencionó anteriormente.

Tabla 1. Oligonucleótidos implementados para la amplificación del gen DNAr 16S y la región espaciadora de transcripción interna (ITS, siglas en inglés) en las muestras de DNA de la rizosfera de *Mammillaria albiflora*.

Oligonucleótidos	Tamaño de amplificación esperado	Secuencia (5' - 3')	Taxón dominante
63F M1387R	1324 pb	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	Alphaproteobacteria (G+)
		GYCTTGACACWCCGCCC	
27F 1492R	1465 pb	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Betaproteobacteria (G-)
		AAGTCGTAACAAGGTARCCGTA	

27F R1494	1467 pb	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Actinomycetota (G+)
		TACGGCTACCTTGTTACGAC	
ITS-1 ITS-4	580 pb	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Ascomycetes, Zygomycetes, Mastigomycetes, Basidiomycetes
		TCCTCCGCTTATTGATATGC	

CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN INVERNADERO.

El presente experimento se llevó a cabo en un invernadero ubicado en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato, de la Universidad de Guanajuato, a cargo del Laboratorio de Botánica e Invertebrados, entre los años 2023 y 2024. Se recibieron en donación 18 plantas de *M. albiflora* por parte del Sr. Juan Hernández, propietario del predio, donde se ubican las poblaciones estudiadas, previamente informado y en acuerdo con los objetivos y acciones que se llevarían a cabo en su terreno. Se ingresaron al invernadero las plantas donadas y fueron sembradas en macetas de siete pulgadas de plástico negro con sustrato preparado de tierra negra, tepojal o tezontle (material poroso de origen volcánico) y gravilla, en proporción 1:1:1 respectivamente. Con la finalidad de aclimatar los ejemplares a las condiciones de invernadero, se realizó un riego cada semana, bajo un ambiente al interior de entre 22°C a 32°C y 24% a 42% de humedad relativa, durante dos meses (agosto-septiembre) previos al procedimiento de injerto. Se hizo una sola aplicación de fertilizante osmocote (compuesto por gránulos de micronutrientes, nitrógeno, fósforo y potasio, envueltos por una resina de origen vegetal y biodegradable de lenta liberación 14:14:14), para propiciar la adaptación y fortalecimiento de las plantas. Por la condición de riesgo y la escasa información sobre la especie, sólo se trabajó con estos ejemplares y no se consideraron más réplicas del experimento.

MATERIAL BIOLÓGICO PARA INJERTO.

Los portainjertos fueron seleccionados con base en criterios revisados en la literatura con la finalidad de lograr un injerto exitoso [49, 51, 54], es decir, que se fusionara el vástago con el portainjerto, por ello fue importante garantizar la compatibilidad entre estos, tanto fisiológica como estructuralmente, además de la cercanía taxonómica entre especies y la disponibilidad

de adquirir los ejemplares [54]. Los injertos se realizaron a dos niveles, es decir, con dos especies distintas de cactáceas: *Myrtillocactus geometrizans* (garambullos) y *Kroenleinia grusonii* (biznagas barril dorado), se adquirieron en la UMA SEMARNAT-MX/VIV-CO-209-GTO (Jardín Botánico El Charco del Ingenio, San Miguel de Allende, Gto.), con la autorización de aprovechamiento SGPA/DGVS/00690/19. Por la disponibilidad de los ejemplares, se compraron 12 plantas de *M. geometrizans* y 6 plantas de *K. grusonii*. Los portainjertos fueron sembrados en macetas y sustrato de igual tipo y proporción que las plantas de *M. albiflora*, descrito en el apartado anterior, y bajo las mismas condiciones de invernadero y riego durante 2 meses previos al procedimiento de injerto (Figura 14).

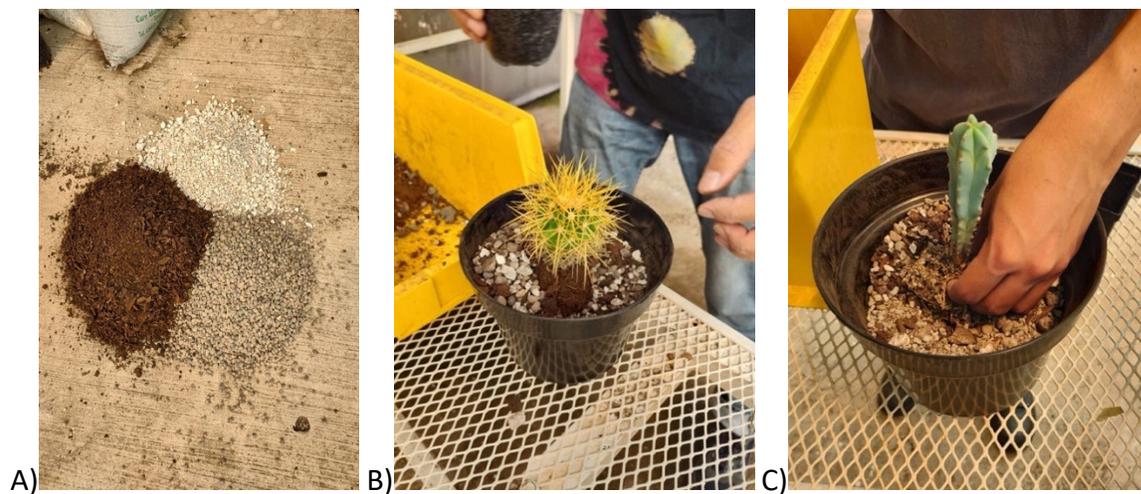


Figura 14. Proceso de sembrado de porta injerto. A) Mezcla de sustrato (tierra negra, tepojal y gravilla; B) Plantación de *K. grusonii*; C) Plantación de *M. geometrizans*.

INJERTO.

El injerto se llevó a cabo en otoño (octubre, 2023) y se midieron las siguientes variables: diámetro y altura, en centímetros, tanto de los portainjertos como de los vástagos. Además, se registraron variables de apariencia como turgencia, deshidratación, color, presencia de raíz en el vástago, desprendimiento o aborto del vástago y supervivencia, tanto del portainjerto como del vástago. La revisión y toma de datos de las variables mencionadas fue cada dos meses, midiendo y registrando cada portainjerto y vástago, además, el mantenimiento de las

plantas se continuó con un riego cada semana, con excepción de la temporada de invierno en la cual se regó cada tres semanas, y una fertilización más a los seis meses.

Previo al día de realización del procedimiento de injerto, fueron regados por dos días consecutivos tanto los portainjertos como las plantas de *M. albiflora*, debido a que el aumento en la humedad del sustrato favorece el flujo de savia desde la superficie cortada del portainjerto al vástago [49]. Se utilizó el método de injerto plano, que es uno de los tipos de injerto más sencillos y efectivos, siguiendo la metodología de Bayat N. y colaboradores [49] con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

- Paso 1. Se eligieron los ejemplares de *K. grusonii* y *M. geometrizzans* rectos en una posición más vertical para facilitar la fijación y evitar desplazamientos del vástago.
- Paso 2. Los vástagos seleccionados fueron las plantas de *M. albiflora*.
- Paso 3. Se realizó un corte transversal a una distancia de entre 0.80 a 1.90 cm de la parte apical de cada vástago seleccionado, utilizando una navaja nueva para cutter, desinfectada con alcohol y fuego. Se mantuvo la sección cortada en el ejemplar para evitar desecación hasta realizar el paso 5.
- Paso 4. Se cortó transversalmente con una navaja nueva para cutter, desinfectada con alcohol y fuego, entre 5.0 a 8.0 cm debajo de la parte apical del portainjerto y se realizaron también los cortes diagonales en las costillas de los bordes para evitar la contracción del tejido al cicatrizar.
- Paso 5. El vástago se colocó en la parte superior del portainjerto de modo que la parte del haz vascular de cada planta estuvieran en contacto.
- Paso 6. El vástago se presionó contra el portainjerto mediante tiras de vitafilm y fijadas con un par de bandas elásticas para mantener unidos el vástago y el portainjerto. La planta injertada se mantuvo dentro del invernadero en condiciones descritas en el apartado de condiciones de invernadero.
- Paso 7. Siete días después de haber realizado el injerto se verificó la unión del vástago y el portainjerto y se retiraron las tiras de vitafilm y las bandas elásticas.
- Paso 9. Se regaron las plantas injertadas hasta los 14 días posteriores al proceso de injerto.

REVISIÓN DE LITERATURA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO*.

Para la revisión de la literatura, se realizó una navegación web en las bases de datos Scopus, ScienceDirect, Google Scholar, Springer, entre otras, ingresando las palabras clave “cactus” o “cacti”, “propagación”, “propagation” e “*in vitro*”. De la búsqueda se recopilaron un total de 40 estudios relevantes para elaborar la propuesta de protocolo de propagación y una vez analizados los documentos se acotó la lista a 8 estudios, los cuáles fueron elegidos con un enfoque específico para el género *Mammillaria* y cactáceas bajo alguna categoría de riesgo, además de considerar el tipo de tejido vegetal de la muestra, fitohormonas utilizadas y las condiciones de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción general de la información seleccionada sobre ocho estudios previos como base de la propuesta de protocolo de propagación *in vitro* de *M. albiflora*.

Espece	Tejido	Medio	Fitohormonas	Descripción	Referencia
<i>Mammillaria mathildae</i>	Semillas	Murashige y Skoog (MS) libre de hormonas.	Para la germinación no se utilizaron hormonas. Para la proliferación celular o callo a partir de explantes se utilizó IAA (ácido indolacético), ABA (ácido abscísico) y BA (bencilaminopurina)	Frascos con 30mL de MS al 0.5. El cultivo se mantuvo a 26±1° C bajo un flujo fotosintético total de 120-130 μmol m ⁻² s ⁻¹ emitido por lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 16 h luz. Medio MS suplementado con 30 g·L ⁻¹ de sacarosa, 0,1 g·L ⁻¹ de mioinositol, 1 mg·L ⁻¹ de clorhidrato de tiamina, 0,5 mg·L ⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg·L ⁻¹ de clorhidrato de piridoxina y 8 g·L ⁻¹ de agar, y con diferentes concentraciones de citoquinina-auxina: 0, 22,19 y 44,39 μM BA, combinadas con 0, 1,43, 2,85 y 5,71 μM AIA.	[81]
<i>Turbincarpus bonatzii</i> , <i>T. jauernigii</i> , <i>T. pseudomacrochele</i> subsp. <i>lausseri</i> , <i>T. pseudomacrochele</i> subsp. <i>pseudomacrochele</i> , <i>T. rioverdensis</i> , <i>T. roseiflorus</i> , <i>T. schmiedickeanus</i>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> y semillas	MS al 50%	BAP (bencilaminopurina), 2iP (6-(γ,γ-dimetilalilamino) purina)	Las semillas fueron lavadas cinco veces con agua corriente con 0,1% Extran (Merck), posteriormente se colocaron por 1min en etanol 70%, y finalmente se desinfectaron por 25 min en blanqueador comercial a base de hipoclorito de sodio 15%. Después de la desinfección, las semillas fueron enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril y se inocularon en condiciones asépticas en frascos de vidrio de 125mL de capacidad con 30ml de medio	[60]

Especie	Tejido	Medio	Fitohormonas	Descripción	Referencia
<i>subsp. dickisoniae</i> , <i>T. schmiedickeanus subsp. gracilis</i> , <i>T. schmiedickeanus subsp. macrochele</i> , <i>T. schmiedickeanus subsp. schwarzii</i> , <i>T. swoboda</i> , <i>T. valdezianus subsp. albiflorus</i> , <i>T. ysabelae</i>				<p>basal. El pH se ajustó a 5,7 y se adicionaron 30g·l⁻¹ de sacarosa y 10g·l⁻¹ de agar (PhytoTechnology®). Los frascos con medio se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15min. Una vez inoculados con la semilla desinfectada, los recipientes de cultivo se sellaron con película autoadherible de PVC (Vitafilm) y se mantuvieron bajo luz continua (lámparas fluorescentes F21T5/4100 K; 54μmol·m⁻²·s⁻¹) a 25 ±2°C.</p> <p>De las plántulas obtenidas se eliminó la porción basal y raíces de las plántulas generadas a partir de semillas, y la porción apical fue inoculada en medio MS pH 5,7 adicionado con 30 g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ agar y 4, 44μM bencilaminopurina (BAP), con el fin de generar brotes a partir del corte.</p> <p>En MS pH 5,7 adicionado con 30g·l⁻¹ sacarosa, 10g·l⁻¹ a gar y cinco diferentes concentraciones de BAP (2,22; 3,33; 4,44; 5,55; 6,66μM) y de 6-(γ,γ-dimetilalilamino) purina (2iP) (4,92; 7,38; 9,84; 14,76 y 19,68μM), ambas citocininas de la marca PhytoTechnology.</p>	
<i>Mammillaria geminispina</i> , <i>M. magnimamma</i> , <i>M. marcosii</i> ,	Fragmentos de tejido de 4 cm ³	MS	Los reguladores de crecimiento empleados fueron ácido indol, 3 acético; a razón	Frascos de 120mL que contenían 20mL de medio (MS), más 1mg/l de AIA, 1mg/l de cinetina con 3% de sacarosa y el pH a 5.7-5.8 antes de la adición de	[72]

Especie	Tejido	Medio	Fitohormonas	Descripción	Referencia
<i>M. mercadensi</i> , <i>M. petterssonii</i> , <i>Coryphanta radians</i> <i>Ferocactus latispinus</i>			de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L y 4 mg/L, en combinación con 0 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L y 10 mg/L de cinetina.	8g/l de agar (Sigma). Los frascos que contenían los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento a 25°C ±2 °C y un fotoperiodo de 16 h, bajo una radiación de 15 μmol m ⁻² s ⁻¹ , proporcionada por lámparas fluorescentes tipo luz de día.	
<i>Echinocereus knippelianus</i> , <i>E. schmollii</i> , <i>Escontria chiotilla</i> , <i>Mammillaria carmenae</i> , <i>M. carmenae</i> fo. <i>rubrisprina</i> , <i>M. herrerae</i> , <i>M. theresae</i> , <i>Melocactus curvispinus</i> , <i>Polaskia chichipe</i> .	Porción apical de plántulas germinadas <i>in vitro</i> a partir de semillas.	MS	BA, 2iP	Tanto los ápices como los segmentos transversales fueron inoculados en medio MS, 3% de sacarosa, adicionado con tres concentraciones de BA (0.5, 1.0 y 2.0 mg L ⁻¹) y tres de 2-isopentiladenina (2iP) (1.0, 3.0 y 5.0 mg L ⁻¹), pH 5.7, 1% de agar. Todos los cultivos fueron incubados bajo luz continua (54 mol m ⁻² s ⁻¹) a 25 ± 2°C.	[82]
<i>Mammillaria albilanata</i> , <i>M. bocasana</i> , <i>M. columbiana</i> , <i>M. rhodantha</i> <i>M. spinosissima</i>	Semillas	MS	No se utilizaron fitohormonas en la germinación de semillas ni en el desarrollo de las plantas. Cabe señalar que el Myo-inositol es una vitamina que ayuda al almacenamiento y	MS al 25%, suplementadas con 0.40 mg.L ⁻¹ de Tiamina, 100 mg.L ⁻¹ de Myo-inositol, 3% de sacarosa, con un pH 5.7±0.1 y 3% de Gelrite Gellan Gum (Sigma®) como agente gelificante. El período de incubación fue de 280 días bajo condiciones de ambiente controlado: 16 horas	[83]

Espece	Tejido	Medio	Fitohormonas	Descripción	Referencia
			transporte de auxinas en la plantas.	luz/8h oscuridad con una intensidad lumínica de 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.	
<i>Mammillaria plumosa</i>	Planta completa	MS	Cinetina (Citocininas)	MS con sacarosa (30 g L-1), mio-inositol (100 mg L-1), tiamina (1 mg L-1) y solidificado con agar-agar (Merck®, 9 g L-1). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y la esterilización se hizo en autoclave vertical a 121 °C y 1.5 kg cm-2 de presión por 20 min. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en fotoperiodo de 16 h e intensidad luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Segmentos de 5-8 cm de longitud de tubérculo con areola se sembraron en frascos de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo básico MS (1962) adicionado con 2,4-D (9, 13.5 y 18 μM) combinadas con cinetina (4.6, 9.3 y 13.9 μM)	[84]
<i>Mammillaria schiedeana</i>	Semillas	MS	6-bencilaminopurina (BA), ácido α -naftalenacético (ANA).	MS con la mitad de la concentración de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa, se adicionó carbón activado 1g L-1, se ajustó el pH a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N y se solidificó con 10 g. L-1 de agar (Bioxon®); se esterilizó en una autoclave a 108 kPa2 y 121° C durante 18 min. Los cultivos	[85]

Especie	Tejido	Medio	Fitohormonas	Descripción	Referencia
				<p>fueron incubados, así como los subsecuentes experimentos, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16/8-h luz/obscuridad e intensidad luminosa de $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.</p> <p>Plántulas germinadas <i>in vitro</i> y brotes procedentes del ciclo preliminar de multiplicación <i>in vitro</i> de 0.3 a 1.3 cm de altura, fueron disectados longitudinalmente (explantes) y se sembraron en medio MS adicionado con 6-bencilaminopurina (BA: 0, 2.2, 4.4 y $8.8 \mu\text{M}$) (0, 0.5, 1 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) en combinación con ácido α-naftalenacético (ANA: 0, $0.53 \mu\text{M}$) (0, 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (medio de inducción). Se sembró un explante por frasco y se utilizaron 17 explantes por tratamiento.</p>	
<i>Mammillaria albicoma</i>	Botones florales	MS	L de NAA y 5 mg/L de BA	<p>MS con 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sacarosa, 0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NAA y 5,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y se solidificaron con 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de Phytigel (Sigma–Aldrich, EE. UU.). Los cultivos se transfirieron a intervalos de 4 a 6 semanas a un medio fresco de la misma composición, momento en el que se subdividieron los grupos de brotes en regeneración. Los cultivos se mantuvieron a 20°C bajo luz continua (PPFD = $55 \text{Imol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) proporcionada por lámparas Fluora.</p>	[86]

ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R Core Team (2023), versión 4.3.2. Para conocer diferencias entre los parámetros de diámetro basal y altura entre las dos poblaciones se analizaron los datos con la prueba paramétrica T de Student. La significancia estadística se estableció con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). La importancia de los parámetros identificados en el suelo y las variables ambientales medidas en las poblaciones durante las mediciones de individuos se determinó con un análisis de componentes principales (PCA).

RESULTADOS.

PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN.

En la población con disturbio se localizaron y midieron 186 individuos de *M. albiflora*, registrados en 53 cuadrantes (1m^2) y con una densidad poblacional estimada igual a 3.4 ind/m^2 . En cuanto a la población semi-conservada, se midieron 180 individuos en 64 cuadrantes registrados y con una densidad poblacional estimada igual a 2.7 ind/m^2 . Ambas poblaciones se constituyen principalmente por parejas o tríos de individuos e individuos solitarios, en densos agregados dentro de los polígonos delimitados (Figura 15).

Se analizaron las variables de altura y diámetro por población y se encontraron diferencias significativas entre la altura de la población con disturbio y la población semi-conservada. En la población con disturbio se determinó una media de 1.21 cm de altura ($\text{min}= 0.3\text{ cm}$ y $\text{max}= 3.2\text{ cm}$) y para la población semi-conservada resultó una altura media de 1.35 cm ($\text{min}= 0.4\text{ cm}$ y $\text{max}= 3.4\text{ cm}$) ($t=-2.4102$, $gl=356.83$, $P<0.05$; Figura 16). Respecto al diámetro, se encontraron también diferencias significativas entre la población con disturbio y la población semi-conservada, con un diámetro de 1.29 cm de media ($\text{min}= 0.4\text{ cm}$ y $\text{max}= 2.8\text{ cm}$) y 1.47 cm ($\text{min}= 0.5\text{ cm}$ y $\text{max}= 3.1\text{ cm}$), respectivamente para cada población ($t=-3.085$, $gl=357.77$, $P<0.05$; Figura 17). Lo anterior sugiere que la población semiconservada presenta los individuos de *M. albiflora* más grandes, siendo congruente con la extracción conocida de ejemplares con diámetros mayores de la población con disturbio para su comercialización.

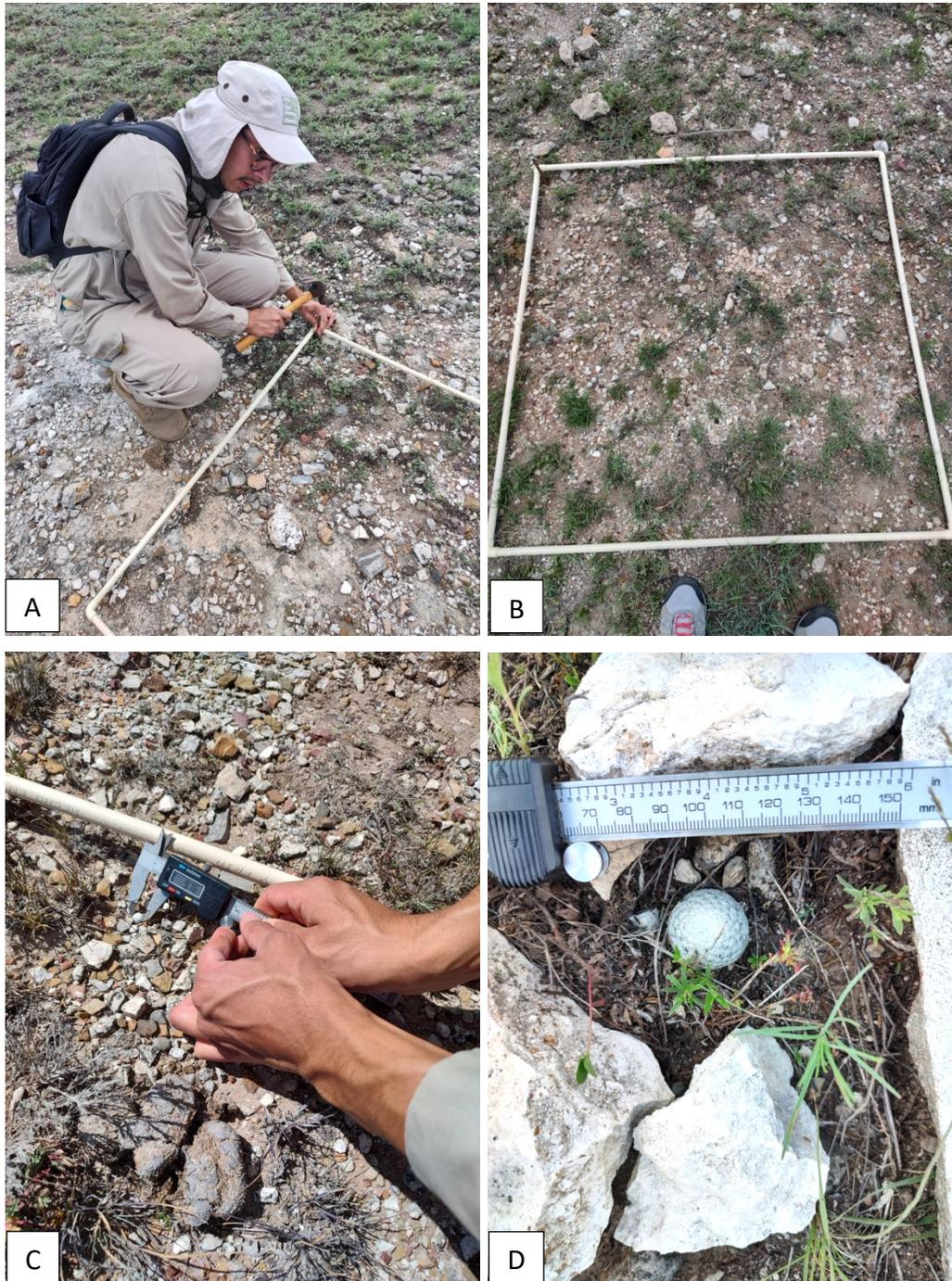


Figura 15. Cuadrantes y medición de ejemplares de *M. albiflora*. A. Colocación de estaca para marcar un vértice del cuadrante. B. Fotografía del cuadrante. C. Medición de diámetro y altura de individuo de *M. albiflora* dentro del cuadrante. D. Fotografía de referencia de un individuo.

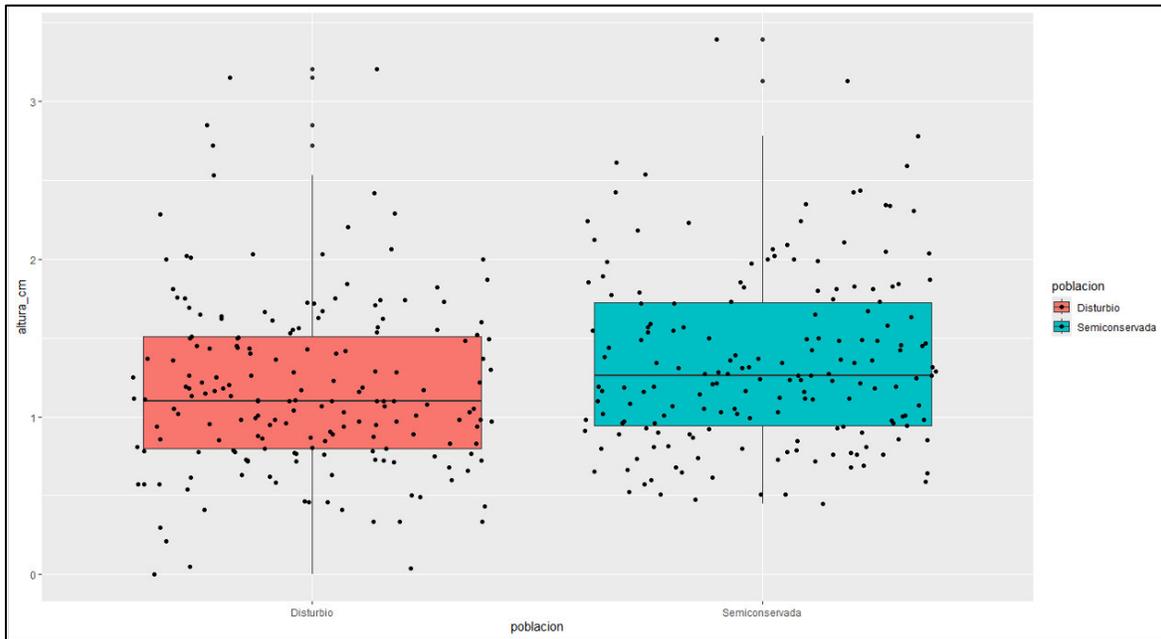


Figura 16. Distribución de la altura del total de individuos medidos por población de *M. albiflora*. ($t=-2.4102$, $gl=356.83$, $P<0.05$).

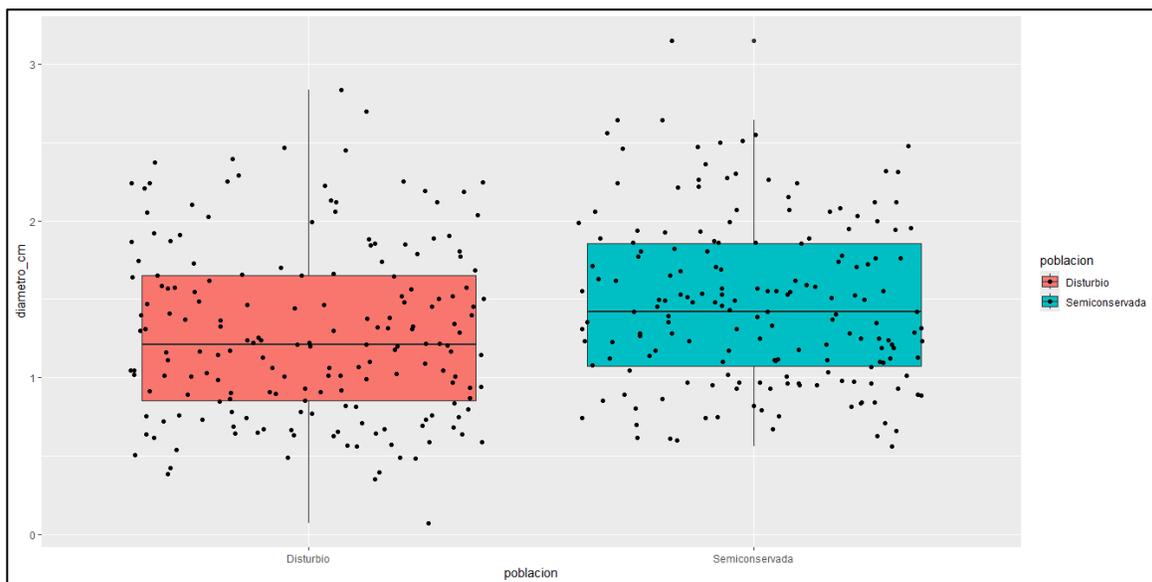


Figura 17. Distribución de diámetro basal del total de individuos medidos por población de *M. albiflora*. ($t=-3.085$, $gl=357.77$, $P<0.05$).

Para aproximarse a conocer las etapas de desarrollo de *M. albiflora* (plántula, juvenil, adulto, etc.) en su hábitat natural, se definieron y agruparon en siete categorías diamétricas todos los

individuos medidos para cada una de las poblaciones: <0.5cm, 0.5-<1.0cm, ± 1.0 -<1.5cm, ± 1.5 -<2.0cm, ± 2.0 -<2.5cm, ± 2.5 -<3.0cm, y ± 3.0 -<3.5cm. Para la población con disturbio la estructura poblacional de tamaños mostró que las plantas pequeñas (<0.5cm) y las plantas grandes (± 2.5 -<3.0cm) son escasas, entre el 4.3% y el 1.08% del total de individuos registrados, mientras que los individuos más abundantes se encuentran entre los tamaños medianos (0.5-<1.0cm, ± 1.0 -<1.5cm y ± 1.5 -<2.0cm) representando poco más del 80% del total de registros con 154 individuos. Por otra parte, en la población semi-conservada no se registraron plantas pequeñas, menores a 0.5cm de diámetro y sólo se observaron siete individuos de tamaño grande (± 2.5 -<3.0cm y ± 3.0 -<3.5cm), equivalente a un 4% del total de registros, en tanto que la mayoría de los individuos medidos se encuentran entre 0.5-<1.0cm, ± 1.0 -<1.5cm y ± 1.5 -<2.0cm, es decir, de tamaño mediano y representando el 83% del total de registros con 149 plantas. Cabe mencionar que ambas poblaciones tuvieron un número de ejemplares muy similar en la categoría de tamaño de diámetro de ± 2.0 -<2.5cm, con 22 y 24 plantas respectivamente. La estructura poblacional de tamaños que presentan ambas poblaciones es de tipo decreciente, donde existe un menor número de nacimientos y bajo reclutamiento, sin diferencia significativa entre poblaciones y un total de 366 individuos de *M. albiflora* registrados ($X^2=0.016362$, $df=1$, $p\text{-value}=0.8982$; Figura 18).

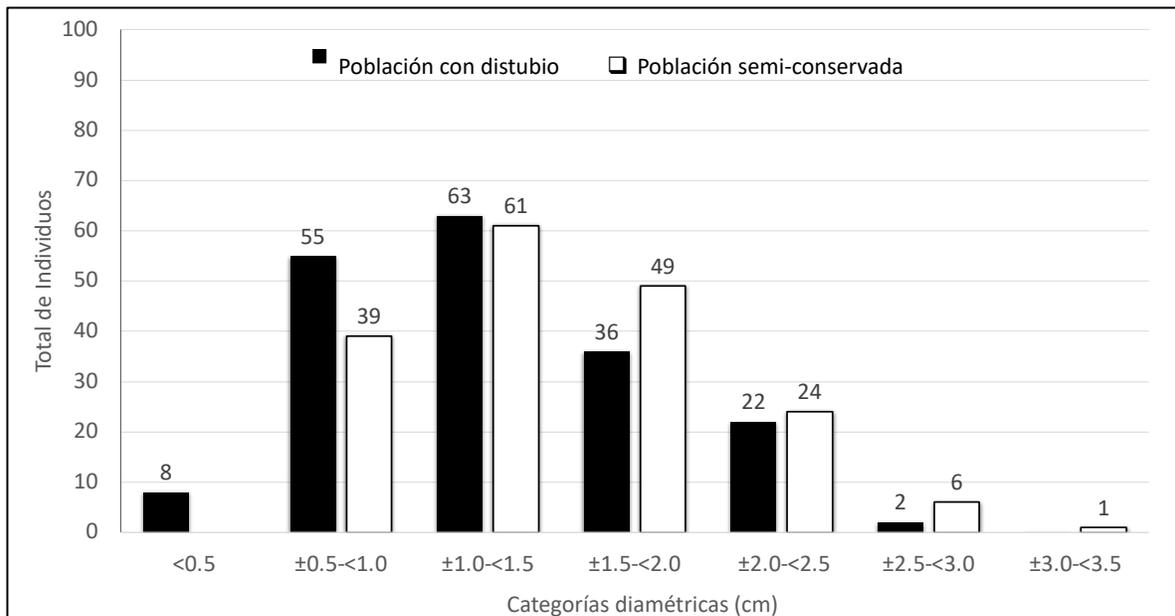


Figura 18. Distribución de individuos registrados para cada categoría diamétrica de poblaciones contrastantes de *M. albiflora*. ($X^2=0.016362$, $df=1$, $p\text{-value}=0.8982$)

El registro de supervivencia se realizó a los seis meses, donde encontramos que el 85.56% de los individuos medidos se encontraba en la población con disturbio, debido a que 13 ejemplares fueron saqueados, una problemática frecuente para la especie en el área, además, se registró un individuo muerto y 11 individuos no fue posible su registro, puesto que no se localizaron, a estos últimos se les dio como perdidos debido a que suelen enterrarse pasando la temporada de lluvias. Al analizar la base de datos con los registros en T0 de los ejemplares que fueron saqueados encontramos que el rango diamétrico de estos fue de 0.72 a 2.83 cm, en promedio 1.79 cm, lo que nos indica que se extraen plantas de tamaños medianos a grandes, que se encuentran posiblemente en su etapa adulta con la posibilidad de desarrollar flores y frutos, lo que sugiere que no se estaría propiciando el reclutamiento de nuevos individuos en la población. De la misma manera para la población semi-conservada se registró un 97.78% de supervivencia, 10% más que en la primera población, en donde no se registraron plantas saqueadas ni muertas y solo para cuatro individuos no fue posible su localización y se dieron por perdidos (Figura 19).

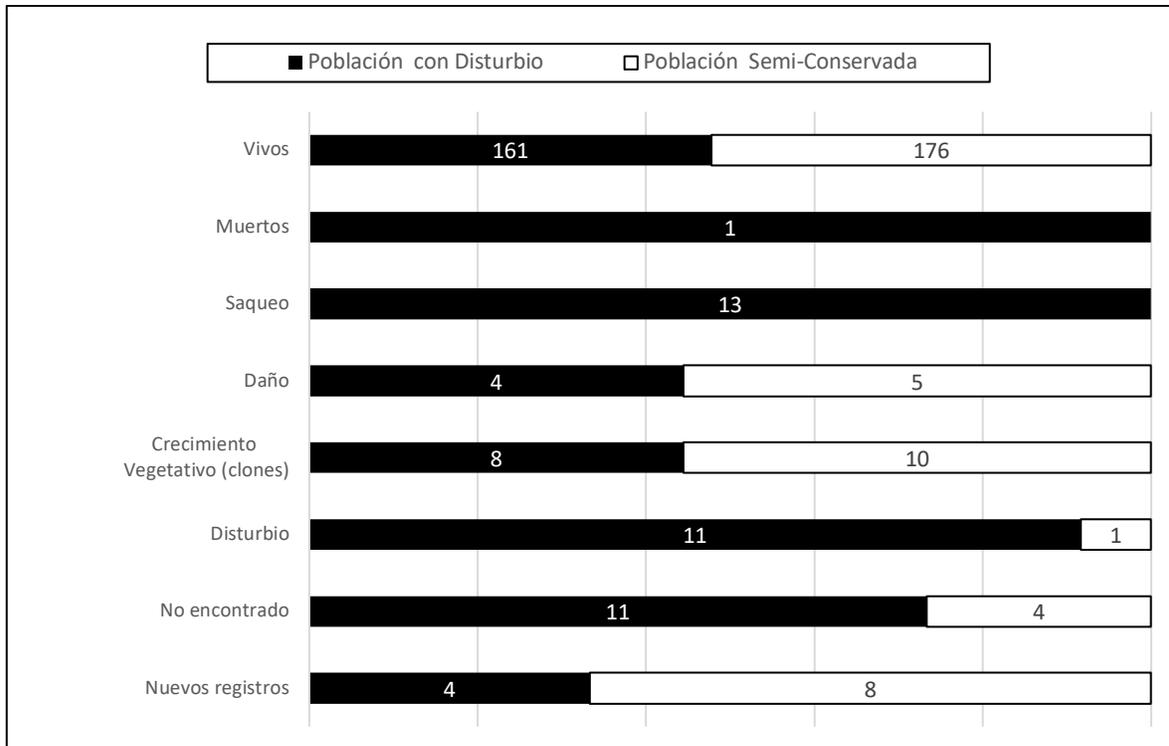


Figura 19. Variables y número de individuos de *M. albiflora* registrados para determinar la supervivencia por cada población a los seis meses del T0.

Se destaca el registro del crecimiento que presentaron algunos individuos por clonación, dicha capacidad totipotencial de las células vegetales para generar nuevos individuos la apreciamos en ocho y diez ejemplares para cada población respectivamente (Figura 19 y 20). Aunado a lo anterior, se observaron nuevos individuos que no habían sido registrados en el muestreo inicial (T0), cuatro y ocho nuevos individuos para cada población, de tamaños menores a 0.5cm de diámetro, que probablemente se encontraban enterrados y al pasar la temporada de lluvias quedaron expuestos. El daño se definió como la acción mecánica que afecta a la planta ocasionándole alguna herida, incluida la herbivoría, y los registros que encontramos fueron por pisadas de animales, incluyendo al humano, y por rodado de vehículo. El disturbio lo atribuimos sólo a que fueron retiradas las estacas metálicas que señalaban la posición del cuadrante, lo cual imposibilitó en la mayoría de los casos poder encontrar a los individuos.

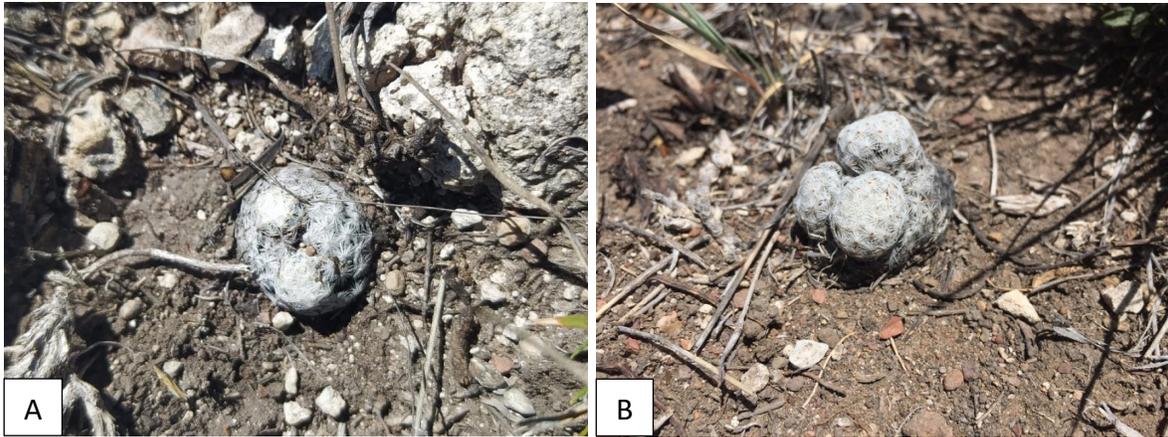


Figura 20. Desarrollo clonal de un individuo en la población con disturbio de *M. albiflora*. A. Fotografía del desarrollo clonal doble en un individuo. B. Fotografía de un individuo con desarrollo clonal triple.

El seguimiento de los registros de diámetro y altura en las poblaciones se hizo a los 12 meses, es decir al tiempo 1 (T1). En la población con disturbio se apreció un cambio favorable en tamaños diamétricos, sin diferencia significativa ($X^2=0.31631$, $df=1$, $p\text{-value}=0.5738$). Se mostró un incremento de la clase menor a 0.5 cm a la clase de 0.5-<1.0 cm, también cambió el número de individuos que pasaron a mayores tamaños entre las clases $\pm 1.0\text{-}<1.5$ cm y $\pm 1.5\text{-}<2.0$ cm. De manera importante, dos individuos se sumaron a la categoría de plantas grandes ($\pm 2.5\text{-}<3.0$ cm), sin embargo, derivado de los impactos antes mencionados y registrados en la medición de supervivencia a los seis meses donde se reportó 1 individuo muerto, 13 saqueados y 11 no encontrados, al tiempo T1 registramos en total 2 individuos muertos y 21 no localizados (Figura 21). Lo anterior probablemente se debió a que la temporada de lluvias se presentó antes que en el T0 y con mayor fuerza, lo que ocasionó arrastre de suelo desde las partes más altas hacia los cuadrantes donde se encontraban los individuos de *M. albiflora*, por ello no se registraron como muertos en espera de que al tiempo T2 y su respectiva revisión de supervivencia se lograra ubicar a estos individuos. En la población semi conservada se presentó una situación desafortunada al acudir a realizar la medición de individuos en el T1, al parecer los usuarios del predio que se dedican a la ganadería, retiraron todas las estacas de ubicación de los cuadrantes, por lo que no fue posible realizar la medición con el rigor necesario para el seguimiento y se descartó esta población para futuras mediciones. Sin embargo, se aprovechó la salida de campo para explorar otra

zona con posibilidad de encontrar una nueva población de la especie, ubicando un predio justo al frente de la población semi-conservada, a una distancia aproximada en línea recta de 200 m, dirección este, cruzando la carretera Gto. 46. En esta nueva población pudimos observar mayormente individuos solitarios y aislados, pocos individuos agrupados entre 2 a 5 y un evento de afloramiento de pequeños ejemplares conformando un grupo denso de más de 20 individuos (Figura 22). De manera general se apreciaban todos los ejemplares en buen estado y el predio es muy similar en sus condiciones de paisaje que la población cercana, con la diferencia que no se apreció rastro de actividad ganadera o evidencia de impacto humano.

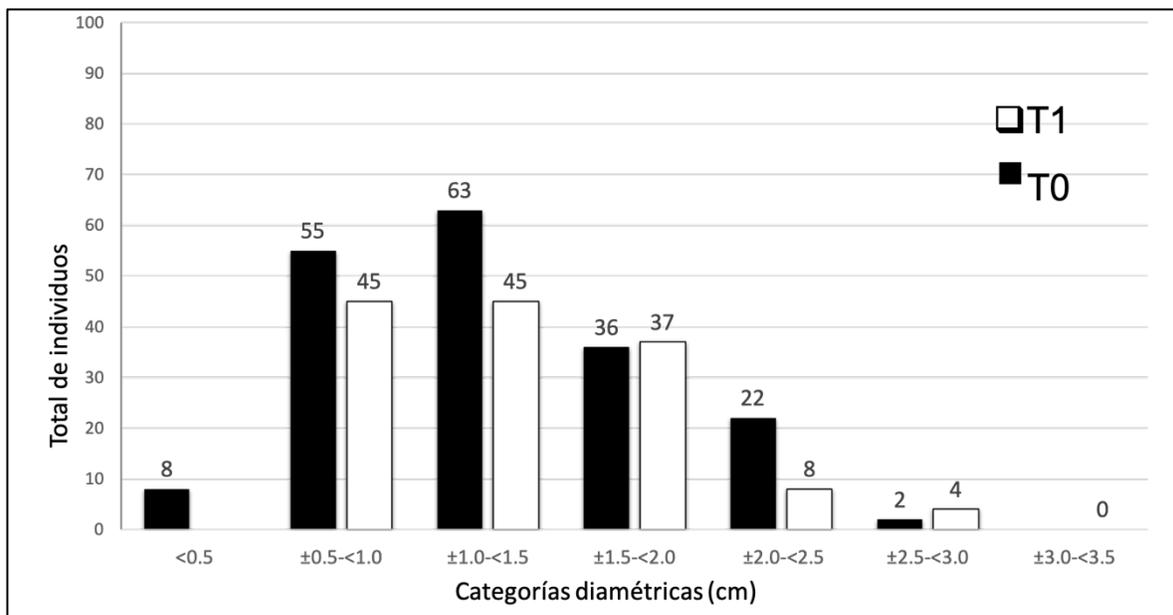


Figura 21. Distribución de individuos registrados en la población con disturbio para el tiempo T0 y T1 por categoría diamétrica de *M. albiflora* ($X^2=0.31631$, $df=1$, $p\text{-value}=0.5738$).



Figura 22. Registros de individuos en una nueva población de *M. albiflora* cercana a la población semi-conservada. A. Grupo de individuos pequeños con distribución muy agregada. B. Individuo solitario adulto. C. Cinco individuos aislados al parecer comparten una sola raíz. D. Registro de tres individuos adultos posiblemente fusionados en una sola raíz y se aprecia en la parte inferior derecha un pequeño individuo reclutado posiblemente de semilla o clon.

El análisis de fertilidad y salinidad del suelo realizado, tanto para la población con disturbio como para la población semi-conservada, consistió en determinar las siguientes variables: Para el análisis de fertilidad del suelo se determinó el % arena, % limo, % arcilla, clase

textural, % saturación, densidad aparente (gr/cm^3), pH (1:2 suelo:agua), % materia orgánica (M.O.), nitrógeno inorgánico total (mg/Kg), fósforo disponible (mg/Kg), potasio intercambiable (mg/Kg), calcio intercambiable (mg/Kg), magnesio intercambiable (mg/Kg), sodio intercambiable (mg/Kg), capacidad de intercambio catiónico (CIC) expresado en centimoles de carga por kilogramo de suelo (Cmol (+) Kg^{-1}), hierro disponible (mg/Kg), manganeso disponible (mg/Kg), zinc disponible (mg/Kg) y cobre disponible (mg/Kg). Para el análisis de salinidad del suelo se determinó el calcio (meq/l), magnesio (meq/l), sodio (meq/l), potasio (meq/l), carbonatos (meq/l), bicarbonatos (meq/l), cloruros (meq/l), sulfatos (meq/l) y la conductividad eléctrica ($\text{CE dS}/\text{m}^{-1}$) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los análisis de fertilidad y salinidad del suelo de las poblaciones con distribubio y semi-conservada de *M. albiflora*.

Análisis de Fertilidad de Suelo		
Determinación	Población con distribubio	Población semi-conservada
% Arena	45.8	38.8
% Limo	22	28
% Arcilla	32.2	33.2
Clase textural	Franco arcillosa	Franco arcillosa
% Saturación	43.6	45
Densidad aparente (gr/cm^3)	1.1	1.1
pH (1:2 suelo:agua)	7.5	7.9
% Materia Orgánica (M.O.)	2.6	4.3
Nitrógeno inorgánico total (mg/Kg)	5	6.5
Fósforo disponible (mg/Kg)	10.2	15.4
Potasio intercambiable (mg/Kg)	131	118
Calcio intercambiable (mg/Kg)	2524.9	2701.9
Magnesio intercambiable (mg/Kg)	75.6	71.8
Sodio intercambiable (mg/Kg)	66.6	36.6
CIC Cmol (+) Kg^{-1}	13.86	14.58
Hierro disponible (mg/Kg)	3.2	3.4
Manganeso disponible (mg/Kg)	10	11
Zinc disponible (mg/Kg)	0.7	1

Cobre disponible (mg/Kg)	0.3	0.4
Análisis de Salinidad de Suelo		
Calcio (meq/l)	6.9	6.4
Magnesio (meq/l)	0.6	0.5
Sodio (meq/l)	2.7	2.5
Potasio (meq/l)	4.4	4.1
Carbonatos (meq/l)	N/D	N/D
Bicarbonatos (meq/l)	7.3	7
Cloruros (meq/l)	4.5	4.3
Sulfatos (meq/l)	2.6	2.6
CE dS/m-1	1.5	1.4

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los resultados de ambos análisis junto con variables ambientales registradas durante las mediciones de individuos por población, como velocidad de viento, temperatura y humedad relativa (Figura 23).

En el PCA se destaca la variable Ca con mayor contribución al modelo, además podemos distinguir 2 grupos principales, el primero compuesto por Mg, Sat y Na, y el segundo por arena y humedad relativa (HR). El Ca es relevante porque las cactáceas en particular acumulan grandes cantidades de este elemento en sus tejidos en forma de cristales de oxalato de calcio, a los cuales recientemente se les ha atribuido su posible participación como fuente de CO₂ extra para la fotosíntesis en ecosistemas xerófilos y bajo estrés hídrico, asociados también a otros mecanismos que actúan en la reducción de la pérdida de agua [87]. El sodio (Na) es relevante por generar estrés en las plantas durante su proceso de crecimiento, afecta a la comunidad bacteriana del suelo disminuyendo la diversidad de bacterias con capacidad de liberar macro y micronutrientes, haciéndolos menos asequibles para las plantas. De igual importancia el sustrato arenoso es característico de áreas desérticas ideal para las cactáceas puesto que permite la infiltración de los escurrimientos y la acumulación o exceso de agua en las temporadas de lluvias por saturación. La humedad relativa, así como otros elementos del clima, es relevante porque definen las áreas de distribución en las plantas y para las cactáceas con distribuciones restringidas resulta ser un factor de importancia para su permanencia.

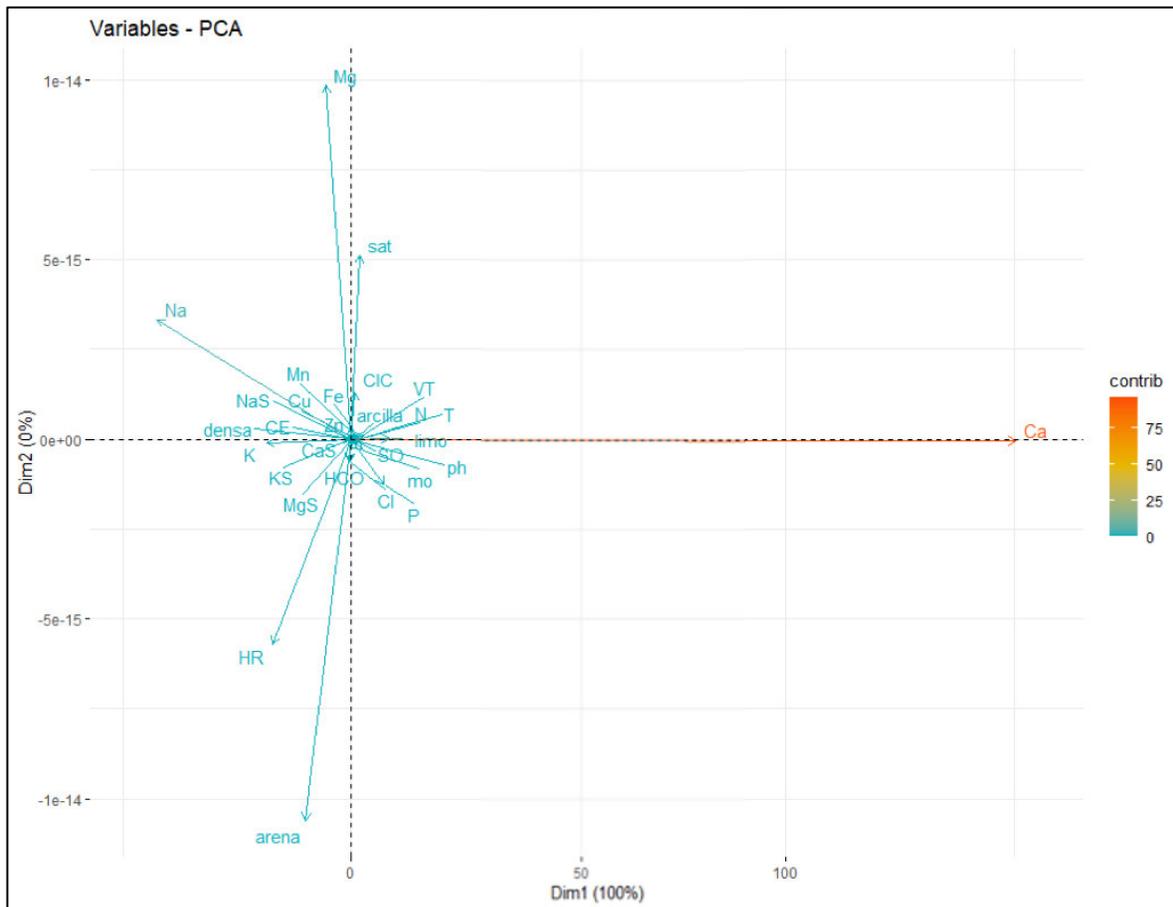


Figura 23. Análisis de componentes principales de las variables determinadas en el análisis de fertilidad, salinidad del suelo y variables ambientales de ambas poblaciones de *M. albiflora*.

COMPOSICIÓN TAXONÓMICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA.

Obtener una visión global de la estructura de la comunidad microbiana asociada a las raíces de *M. albiflora* es el enfoque de los siguientes resultados. Con el método de extracción de DNA genómico por solventes orgánicos (Sambrook y Russel) se obtuvieron concentraciones de DNA para la población con disturbio de 87.7 ng/ μ L y una relación 260/280 de 1.34 y para la población semi-conservada de 33.8 ng/ μ L y una relación 260/280 de 1.30 (Figura 24).

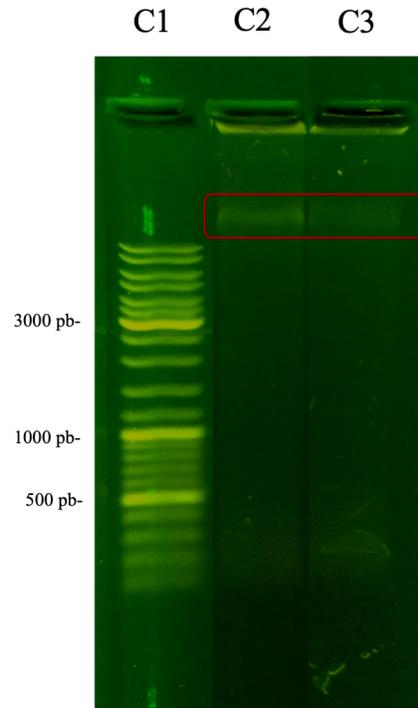


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de las muestras de rizoma de *M. albiflora*. Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2-muestra de la población con disturbio y C3-muestra de la población semi-conservada.

La corroboración de las ampliificaciones fue desfavorable, puesto que no se obtuvo la ampliificación esperada bajo las condiciones mencionadas en la metodología. Se ajustó la mezcla para realizar nuevamente la reacción de ampliificación incrementando de 20 μL a 25 μL totales, aumentando 2 μL de DNA de la muestra, 1 μL de agua grado HPLC y 2 μL de JumpStar DNA taq Polymerase (Sigma-Aldrich), resultando de la siguiente manera: 4 μL de DNA de la muestra, 7 μL de agua grado HPLC, 12.5 μL de JumpStar DNA taq Polymerase (Sigma-Aldrich), 0.8 μL de cada oligonucleótido directo y 0.8 μL de cada oligonucleótido reverso, para obtener un total de aproximadamente 25 μL . Igualmente, se ajustaron las condiciones de PCR respecto a las mencionadas en la metodología, en una desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, seguido por 40 ciclos térmicos de desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos, 1 minuto de alineamiento a 50 $^{\circ}\text{C}$, una extensión por 2 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$ y una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Con los ajustes anteriores obtuvimos ampliificación para la mayoría de los pares de oligonucleótidos utilizados (Figura 25), sin embargo, como se aprecia en la figura 25, los aplicones esperados de las reacciones son tenues y con un

barrido sobre el carril, por lo cual se decidió nuevamente realizar la amplificación para obtener bandas de tamaño esperado más claras y posteriormente hacer su purificación. Para ello, utilizamos las siguientes tres nuevas polimerasas bajo las condiciones indicadas por el fabricante para cada una: Platinum™ High Fidelity PCR SuperMix, Platinum™ II Hot-Start Green PCR Master Mix (2X) y PCR Master Mix (2X). Estas polimerasas proveen alta fidelidad y especificidad, confieren ciclos rápidos y resistencia a inhibidores comunes, un alto rendimiento, así como reducción de contaminación debido a la reducción de pasos de pipeteo para preparar la muestra para PCR, respectivamente. Se realizaron las tres reacciones con las nuevas polimerasas y una más con la polimerasa JumpStar, se corroboraron los PCR por electroforesis y no se tuvo reacción (Figura 26).

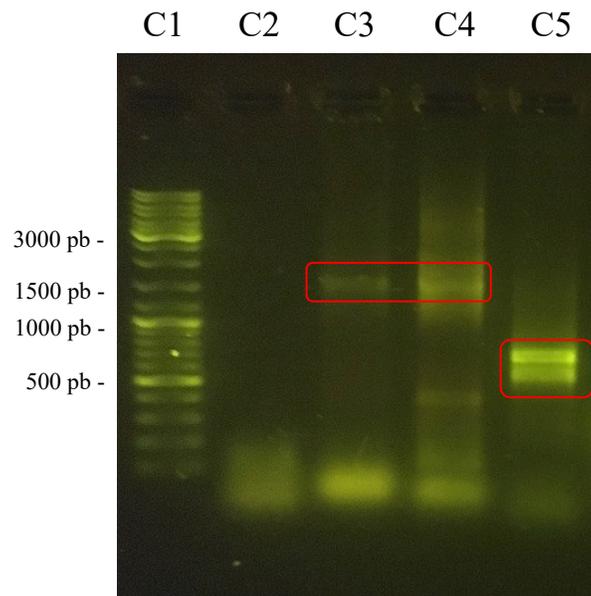


Figura 25. Amplificación de oligonucleótidos para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de *M. albiflora*. Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2-63F y M1387R, C3-27F y 1492R, C4-27F y R1494 y C5-ITS-1 e ITS-4.

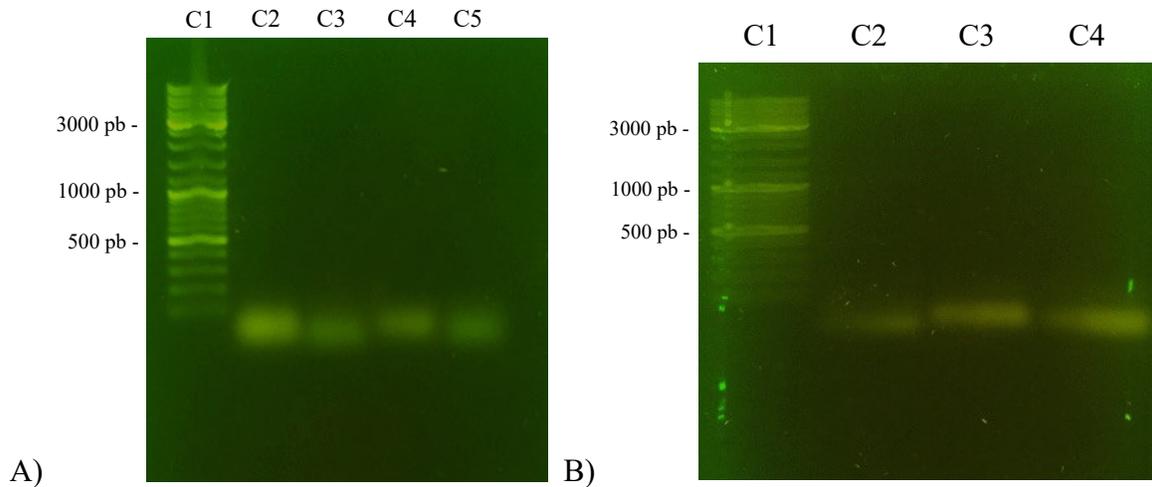


Figura 26. Amplificación para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de *M. albiflora* con las cuatro polimerasas utilizadas. A) JumpStart(TM) Taq DNA Polymerase, Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2-63F y M1387R, C3-27F y 1492R, C4-27F y R1494 y C5-ITS-1 e ITS-4. B) Oligonucleótidos ITS-1 e ITS-4, Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2-Platinum™ High Fidelity PCR SuperMix, C3-Platinum™ II Hot-Start Green PCR Master Mix (2X) y C4-PCR Master Mix (2X).

La extracción con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) resultó en la obtención de DNA, con muestras de tejido de la rizósfera de distinto gramaje, de acuerdo con los parámetros del fabricante, ya que se sugería utilizar entre 10 mg y 100 mg. Se definieron tres gramajes: 16, 25 y 60 mg con la finalidad de comparar el rendimiento del kit de extracción, resultando las siguientes concentraciones: 6.7 ng/μL (16 mg), 17.9 ng/μL (25 mg) y 17.5 ng/μL (60 mg); con una relación 260/280 de 1.43, 1.68 y 1.73, respectivamente (Figura 27).

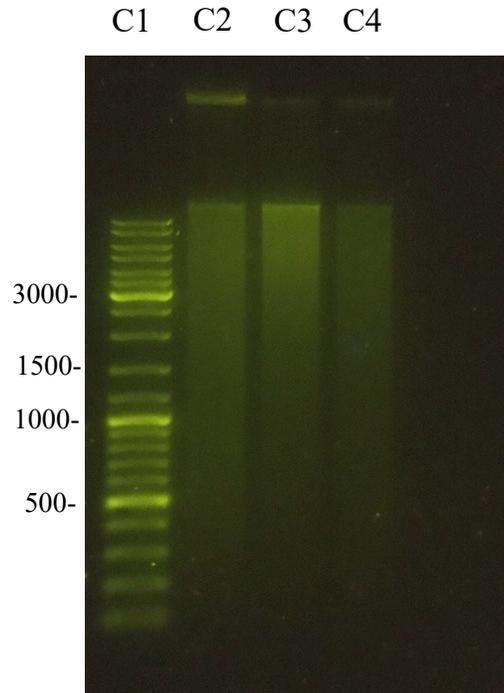


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico extraído con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) de las muestras de rizoma de *M. albiflora* para la población con disturbio. Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2-25 mg de muestra, C3-60 mg de muestra y C4-16 mg de muestra.

Obtuvimos una amplificación con la reacción esperada, solo considerando los oligonucleótidos 27F y 1492R para bacterias, ITS-1 e ITS-4 para hongos, de acuerdo con los parámetros descritos en la metodología utilizando la enzima Platinum™ II Hot-Start Green PCR Master Mix (2X), para las tres muestras con distinto peso de la población con disturbio (Figura 28).

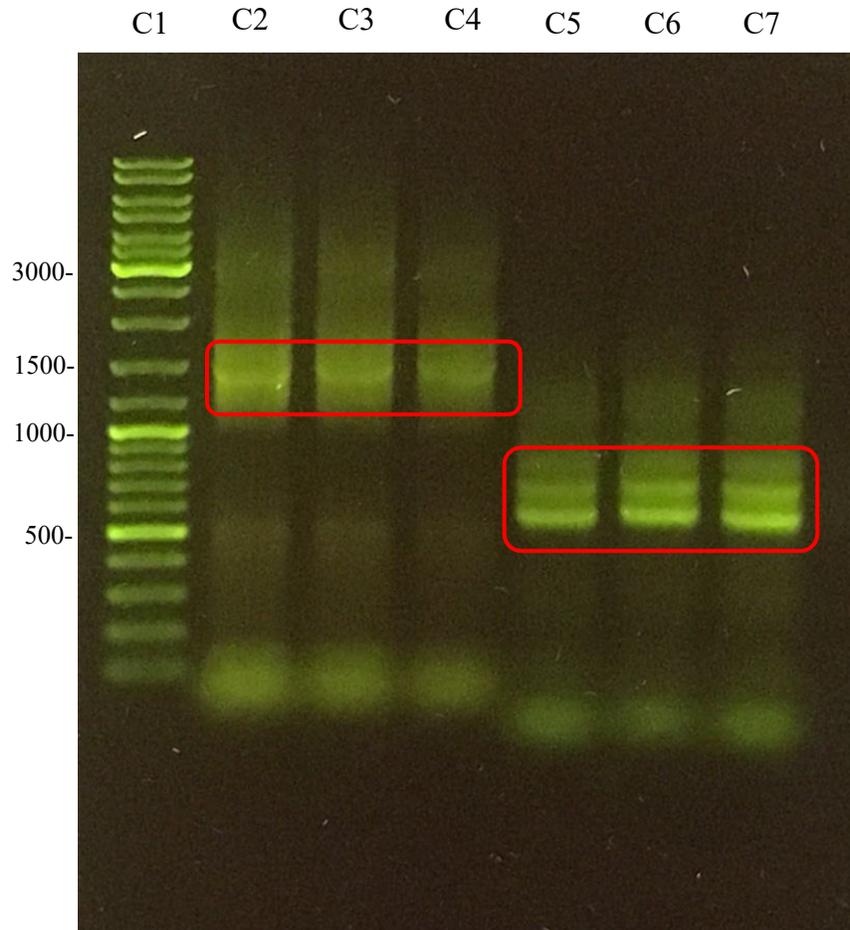


Figura 28. Amplificación para DNAr 16s e ITS en muestras de rizoma de *M. albiflora* con el Kit DNeasy Plant Pro (QIAGEN) para la población con disturbio. Carriles C1-marcador de tamaño molecular, C2 a C4 con oligos 27F y 1492R y C5 a C7 con oligos ITS-1 e ITS-4. En los rectángulos rojos se destacan los tamaños esperados de la reacción de acuerdo a los oligos utilizados.

PROPAGACIÓN POR INJERTO.

Obtuvimos 100% de injertación en nuestros dos tratamientos, usando *K. grusonii* y *M. geometrizzans* como portainjerto. Cabe destacar que, a los cinco días posteriores a realizar el procedimiento de injerto detectamos la aparición de un hongo patógeno que infectó las plantas injertadas (Figura 29). Para controlar la infestación del hongo aplicamos un fungicida sistémico concentrado (propamocarb+fosetyl (BAYER)), en dilución de 3mL por litro, con

una repetición de aplicación fungicida a los 14 días posteriores. Desafortunadamente, tres ejemplares de portainjerto de *M. geometrizzans* no se recuperaron y realizamos nuevamente el proceso de injerto descartando las partes de tejido dañado, tanto en el portainjerto como en el vástago, y con ello asegurar su supervivencia (Figura 30).



Figura 29. Aplicación de fungicida sistémico en plantas infectadas por hongo patógeno. A) Aplicación de fungicida en injerto de *M. geometrizzans*; B) Detalle de infección por hongo patógeno en portainjerto de *K. grusonii*.

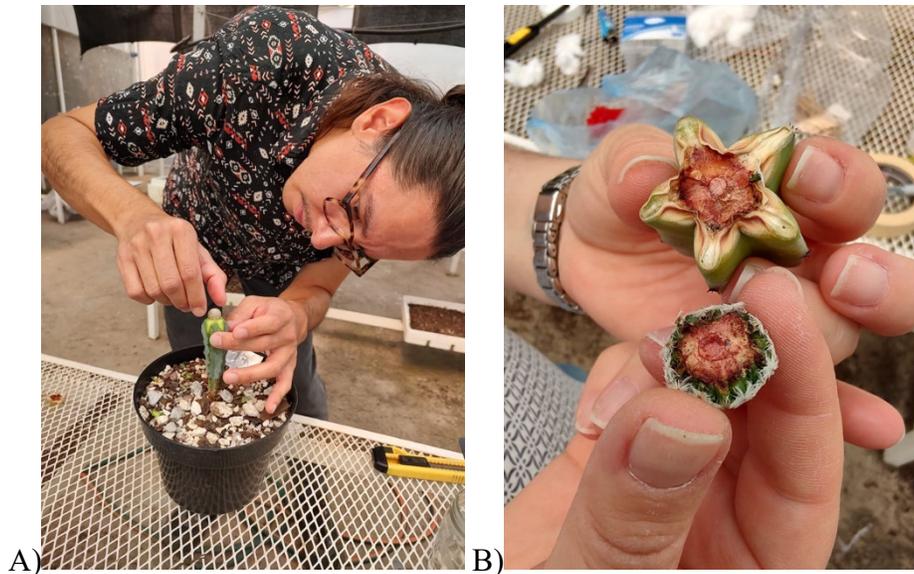


Figura 30. Proceso de reinjertación en plantas infectadas por hongo patógeno. A) Desprendimiento de ejemplar infectado en injerto de *M. geometrizans*; B) Detalle de infección por hongo patógeno en portainjerto y vástago.

En el tratamiento con el portainjerto de la biznaga (*K. grusonii*) se tuvo un 100% de injertación de los 6 ejemplares que se utilizaron. Pasados 8 meses tuvimos dos ejemplares muertos de *M. albiflora* injertados y ninguno presentó mala condición, incluso después del tratamiento con fungicida. Del mismo modo, el tratamiento con garambullo (*M. geometrizans*) tuvo 100% de injertación en los 12 ejemplares, sin embargo, también tuvimos 3 ejemplares que murieron debido a la infección por hongo y 5 que presentaron mala condición, sin llegar a morir.

Se registró el máximo crecimiento en altura del vástago de *M. albiflora* en el portainjerto de *K. grusonii*, con un registro inicial de 1.94 cm (± 0.54 cm) al registro final pasados 12 meses de 5.51 cm (± 2.48 cm). En contraste, con el portainjerto de *M. geometrizans*, el crecimiento en diámetro y altura del vástago se mantuvo en un estado de latencia a partir de los 90 días en los que no se observó incremento o decremento. *M. albiflora* tiene un crecimiento muy lento y en 12 meses sólo incrementó en promedio 0.89 cm de todos los ejemplares y tratamientos y no presentó ninguna etapa fenológica ni desarrollo vegetativo o clones.

Se documento la preferencia de *M. albiflora* para el portainjerto de *K. grusonii*, a pesar de no ser una especie cercana taxonómicamente, pero presentan una morfología similar tanto en sus anillos vasculares como a su forma de crecimiento esférico-globular (Figura 31). De manera relevante registramos por primera vez la respuesta al daño mecánico de *M. albiflora*, bajo condiciones controladas fuera de su hábitat natural, al realizar el corte horizontal para el injerto, la cual posterior a la cicatrización comenzó a generar nuevos brotes de hijuelos o clones, hasta 4 nuevos brotes por ejemplar. Esta capacidad totipotencial de la especie no se había documentado y consideramos esta respuesta al daño como una estrategia relevante a estudiar, para diseñar acciones más efectivas de conservación de la especie (Figura 32).



Figura 31. Crecimiento de los vástagos en los dos tratamientos de portainjerto utilizados. A-C, Desarrollo del injerto en *M. geometrizans* al día 0, 90 y 210; D-F, Desarrollo del injerto en *K. grusonii* al día 0, 90 y 210.

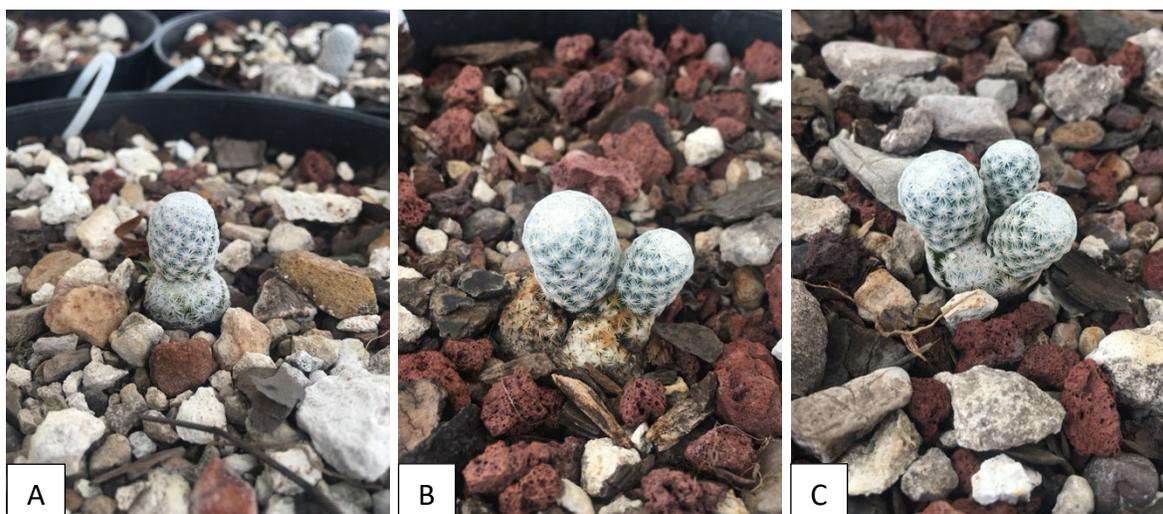


Figura 32. Desarrollo de clones o hijuelos en *M. albiflora* a los 180 días del daño por corte. A. Desarrollo de un clon en ejemplar utilizado para injerto. B. Desarrollo de dos clones en ejemplar utilizado para injerto. C. Desarrollo de tres clones en individuo utilizado para injerto.

TRATAMIENTOS PROPUESTOS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO*.

Derivado de la revisión de los estudios específicos de propagación *in vitro* (Tabla 2), se determinaron tres diferentes tratamientos para llevar a cabo este protocolo de cultivo de tejido vegetal con *M. albiflora*

Tabla 4. Propuesta para propagación *in vitro* específica de *Mammillaria albiflora*.

Especie	Tejido	Medio	Fitohormonas	Condiciones de crecimiento
<i>Mammillaria albiflora</i>	Porción apical de plántulas germinadas <i>in vitro</i> a partir de semillas.	MS	BA (benciladenina), 2iP	1% agar, 3% sacarosa, tres concentraciones de BA (0,5; 1,0 y 2,0 mg L ⁻¹) y tres de 2-isopentiladenina (2iP) (1,0; 3,0 y 5,0 mg L ⁻¹). pH 5,7. Fotoperiodo continuo (54 mol/m ² /1) a 25 ± 2°C.

Planta madura completa sometida a etiolación para obtener explantes.	MS	2iP (2-isopentyladenina)	MS enriquecido, 10 y 20 mg/L de 2iP. Fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. 25 $\mu\text{m}^2/\text{l}$ de irradiación luminosa y temperatura de 23 a 26°C.
Clon por injerto, semilla germinada o explante de plántula <i>in vitro</i> .	MS	Reguladores del crecimiento vegetal (RCV) ANA/BA en cinco concentraciones: 0,0 mg/L, 0,5 mg/L y 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L y 2 mg/L, respectivamente.	Medio MS con 25% de sales inorgánicas, 2 mg/L de Glicina, suplementado con 45 g/L de sacarosa, 20 g/L de D-Sorbitol y 1,0 g/L de carbón activado. El pH se deberá ajustar a 5,7-5,75 con soluciones de NaOH y HCl 0,1 N.

Para cada tratamiento propuesto se sugiere considerar la experiencia de quien se encuentre a cargo del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales donde se realicen los experimentos, así como ampliar en el proceso las condiciones específicas que pueda demandar nuestra especie de estudio, derivado de su excepcional condición de microendemismo y rareza, entendida esta última desde el punto de vista biológico como sinónimo de una abundancia baja y de un área de distribución restringida [88].

DISCUSIÓN.

En el presente estudio se registraron fenómenos que no se habían reportado en la literatura previamente. Primeramente, al realizar la revisión de supervivencia a los seis meses del T0, se anotaron las condiciones en las que el paisaje se modificó derivado del paso de la temporada de lluvias, puesto que 11 ejemplares no se localizaron dentro de los cuadrantes y se apreciaba claramente el movimiento de tierra por arrastre durante las lluvias. De manera relevante, registramos cuatro nuevos ejemplares dentro de los cuadrantes y ocho con crecimiento vegetativo por clones o hijuelos derivado de un daño mecánico.

Respecto a la estructura poblacional de tamaños en el tiempo 0 (T0), observamos que es de tipo decreciente, donde existe un menor número de nacimientos y bajo reclutamiento, sin diferencia significativa entre las poblaciones. Si bien, los individuos de población semiconservada presentan un mayor tamaño, la cercanía entre la composición diamétrica de los individuos de ambas poblaciones la interpretamos como una respuesta al constante impacto, principalmente de tipo antrópico, que afecta al ecosistema.

En la población de *M. albiflora* analizada por Cruz Santos A. [32], que nosotros denominamos con disturbio, se encontró una densidad de 3.4 individuos/m², una densidad mayor que la reportada en dicha investigación (2.9 individuos/m²). Por otra parte, para la población semi-conservada nuestra densidad resultó ligeramente menor, 2.7 individuos/m², en comparación con la población con disturbio. Desafortunadamente, Cruz Santos A. (2015) no reporta ubicación por lo que no podemos hacer una comparación entre poblaciones, pero estos resultados nos indican que en comparación con otras especies de cactáceas, incluso del mismo género *Mammillaria*, son densidades altas. Por mencionar algunas, *M. gaumeri* (0.28 ind/m²) [20], *M. kraehenbuehlii* (0.08 ind/m²), *M. dixanthocentron* (0.10 ind/m²), *M. huitzilopochtli* (0.23 ind/m²), *M. pectinifera* (0.28 ind/m²), *M. hernandezii* (0.30 ind/m²), *M. solisoides* (0.61 ind/m²) [35], *M. supertexta* (1.42 ind/m²) [34] y *M. napina* (2.39 ind/m²) [33],

Estas altas densidades observadas en otras especies se le atribuyen al tipo de distribución [89], que para el caso de *M. albiflora*, y similar a otras especies de cactáceas, muestran un

patrón de distribución agregado. También la alta densidad encontrada puede deberse al nivel de disturbio que presentan sus poblaciones, como ha sido reportado para otras cactáceas como *M. pectinifera* [90, 91]. Esta investigación no realizó una evaluación de indicadores de disturbio, sin embargo, en los recorridos de campo, en las poblaciones se observaron ciertos elementos de disturbio como la presencia de ganado vacuno, brechas y caminos para vehículos, paso de personas y cercanía con desarrollos inmobiliarios e infraestructura, así como extracción de materiales pétreos.

Definimos siete clases diamétricas en esta investigación para ambas poblaciones (<0.5cm, 0.5-<1.0cm, ±1.0-<1.5cm, ±1.5-<2.0cm, ±2.0-<2.5cm, ±2.5-<3.0cm, y ±3.0-<3.5cm). Por el contrario, Cruz Santos A. (2015) [32] para su población de estudio añadió una clase más para tener un total de ocho clases diamétricas, por un único ejemplar que registró mayor a 3.5 cm. Cabe destacar que en nuestras poblaciones de estudio no presentaron ejemplares mayores a 3.5 cm, pero si se observó un comportamiento similar entre nuestras dos poblaciones en base a la estructura de tamaños, todas decrecen en el número de individuos pertenecientes a las primeras y últimas categorías (<0.5cm y 3.0-<3.5cm, respectivamente). Este comportamiento de la población de *M. albiflora* se ha reportado también para las poblaciones de *M. solisioides* [92], *M. zephyranthoides* [93] y *M. supertexta* [34], por lo que es un fenómeno frecuente en las poblaciones estudiadas de cactáceas globosas de lento crecimiento y poca dispersión [29]. Por consiguiente, se ha observado que en lugares con perturbación tanto las plántulas de las cactáceas, así como los individuos adultos se presentan en menor frecuencia [94]. En menor o mayor medida para cada población analizada en este estudio, los individuos de *M. albiflora* han respondido de manera resiliente, pero aún no es posible asegurar su permanencia como especie, debido a los bordes que delimitan a las poblaciones y la falta de acciones encaminadas a su protección, rescate y conservación.

Por otra parte, las investigaciones recientes sobre la comunidad de microorganismos asociados a las plantas en condiciones de aridez reportan en sus hallazgos, principalmente, los siguientes filo bacterianos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes [41, 42, 71, 95–98], y filo fúngicos Ascomycota y Basidiomycota [71, 97, 99]. En el estudio de Fonseca-García C. y colaboradores (2016) [70], encuentran que las comunidades

microbianas de *M. geometrizzans* y *O. robusta*, ambas cactáceas estudiadas en dos regiones del Estado de Guanajuato, presentaron principalmente los mismos fila microbianos antes mencionados en suelo, rizosfera y endósfera de raíz, sin grandes diferencias entre los microhábitats en la composición y abundancia de los taxones fúngicos. Estos resultados, en comparación con otras investigaciones, sugieren que, respecto a las comunidades fúngicas del suelo, en la rizosfera, las plantas xerófitas tienen bajos niveles de selección hacia éstos. A diferencia de la diversidad bacteriana de la rizosfera, donde encontraron mayor diversidad del filum Firmicutes, principalmente el género *Bacillus*, siendo estas especies consideradas como productoras de metabolitos antimicrobianos y promotoras del crecimiento vegetal [36, 38, 39].

M. albiflora es una cactácea microendémica al estado de Guanajuato, por lo que se espera que la diversidad de microorganismos sea específica y difiera de lo encontrado en las investigaciones antes comentadas, debido a que en distribuciones tan limitadas es igualmente alta la especificidad de hábitat, considerándose lo anterior como un criterio de rareza en las especies vegetales [88, 100]. En este sentido, Gaston (1994) [101], define a la rareza en términos de la baja abundancia y/o lo limitado del área de distribución, esta última característica ligada al de endemismo, pero no deben confundirse ambos términos, ya que una especie puede ser endémica a un área particular y aun así tener una abundancia mayor que la de otras especies que se encuentren ahí mismo. Lo que sugiere que pudiera ser el caso de *M. albiflora*, derivado de los resultados obtenidos de densidad de individuos por superficie y que presenta algunas causas que se asocian a la rareza como el tener una capacidad limitada de colonización (dispersión y establecimiento), el tamaño del individuo, que se relaciona con la presencia o ausencia de ciertas estructuras o características reproductivas (fenología, germinación, establecimiento de plántulas); eventos históricos, como especiación o catástrofes y los factores ambientales [88, 101]. Por su parte, Choe H. y colaboradores (2019) [100], añaden a la rareza la especificidad de hábitat, como componente adicional a los factores de abundancia y distribución geográfica. Para el caso de la presente investigación con *M. albiflora*, proponemos que el tipo de suelo y el consorcio de microorganismos asociados a la rizosfera resultarían en esta especificidad de hábitat.

La distribución limitada la asociamos a la escasa producción de flores y frutos, que a su vez tiene un proceso de dispersión poco estudiado y del cual se conoce que los frutos se mantienen resguardados entre las mamilas de *M. albiflora*. Los posibles dispersores son hormigas pequeñas que arrancan el fruto, desgarrándolo, pero las semillas no suelen ser transportadas a grandes distancias, por lo que pueden quedar atrapadas en el cuerpo de la planta madre; además, otro elemento dispersor es el agua durante la temporada de lluvias [76]. Esto no lo hemos corroborado en campo, pero es coincidente con lo reportado para otras especies de cactáceas como *Thelocactus leucacanthus* ssp. *schmollii* [102] y especies del género *Ariocarpus* [103].

Abordamos la propagación de *M. albiflora*, en primer lugar, por la técnica de injerto, seguido de la propuesta de propagación por cultivo de tejido vegetal (*In vitro*). Al ser una especie poco estudiada y que se desconocen sus respuestas ante ambas técnicas de propagación no convencional, es decir, que no se realiza por colecta de fruto, germinación de semillas, esquejes o hijuelos, la técnica por injerto en la presente investigación ha demostrado ser una poderosa e importante herramienta tanto en biotecnología experimental (biología de regeneración y conservación) como para producción hortícola con fines ornamentales, medicinales, entre otros posibles. Con el seguimiento de medición de variables cualitativas y cuantitativas tanto para portainjerto como para los vástagos en los dos tratamientos utilizados, podemos decir que el injerto resultó 100% efectivo. Se consideró la variable de diámetro más importante puesto que coincide con las mediciones de clases diamétricas de la población natural en las que se define el estadio de las plantas, que para el caso de esta técnica se espera que se estimule la producción de flores y frutos al estar injertados los ejemplares, pero al igual que muchas cactáceas .

Los diez ejemplares fusionaron sus haces vasculares, sin embargo, el crecimiento medido fue distinto por tratamiento, incluso un mínimo crecimiento para el tratamiento con *M. geometrizzans*, pues sólo un ejemplar creció significativamente a los 210 días. El éxito de la técnica en *M. albiflora* con el tratamiento de portainjerto de *K. grusonii* lo atribuimos a la morfología similar de tipo globosa y el tamaño del haz vascular en ambas especies.

Bayat N. y colaboradores (2016) [49], encontraron diferencias significativas en la temporalidad del injerto, es decir, realizaron sus experimentos uno en primavera y otro en otoño, teniendo mejores resultados el injerto en primavera, puesto que presentó mayores brotes adventicios el vástago. En nuestro caso, el proceso de injerto se realizó en otoño, en el mes de octubre y no registramos ningún brote o hijuelo, probablemente es la respuesta de la especie al injerto, no obstante, el crecimiento vertical sobre paso nuestras expectativas y en contraste con los resultados revisados en la literatura con otras especies de cactáceas [49–53, 55, 56], no había sido reportado dicho desarrollo. Lo anterior se lo atribuimos a las condiciones de invernadero constantes de temperatura y humedad, así como el riego constante y la fertilización previa, pues las plantas se etilaron e incrementaron su diámetro, pero sólo en el tipo de porta injerto globoso.

Finalmente, como se mencionó en párrafos anteriores, las especies con distribución muy restringida, hábitats degradados, lento crecimiento, escasa floración, baja producción o baja tasa de germinación de semillas y con alta extracción de ejemplares de sus poblaciones naturales, son las indicadas para implementar como estrategia de conservación la propagación mediante cultivo *in vitro*. Tal es el caso de varias especies pertenecientes al género *Turbiniacarpus*, las cuales han representado un verdadero reto en los últimos años para su propagación por esta vía, debido a su lento crecimiento y la pobre capacidad de recuperación de las poblaciones naturales [60]. Por ello, la propuesta de protocolo de propagación que aquí se propone, basado en una exhaustiva revisión de literatura, actualizada y con el tipo de especie con la cual se trabajará más cercana taxonómicamente o bien, con la que se haya obtenido mayor respuesta a las condiciones de cultivo, así como los mejores resultados en el número de explantes. Cabe señalar la relevancia del protocolo propuesto con los tratamientos definidos, con ello se pretende hacer más eficiente el trabajo en el laboratorio de cultivo de tejido vegetal, al igual que gestionar desde ahora los recursos materiales y económicos necesarios para llevarlo a la *praxis*.

CONCLUSIONES.

- La dinámica diamétrica que presentan los individuos de *M. albiflora* al T1 no es uniforme y registramos el cambio de una clase diamétrica de plántula a juvenil en algunos ejemplares, así como de juvenil a adulto.
- En la población con disturbio documentamos el impacto al que están sometidos los individuos de *M. albiflora* por el saqueo y extracción de ejemplares que, principalmente por su tamaño, son los individuos capaces de generar flores, frutos y semillas en un ciclo normal.
- La densidad estimada de individuos por superficie en las poblaciones resultó mayor a la reportada en el año 2015, siendo los dos únicos registros para *M. albiflora*.
- El uso de *K. grusonii* mostró los mejores resultados para injertar a *M. albiflora*, registrando un incremento en altura mayor de los vástagos hasta cuatro veces del tamaño inicial a los 270 días.
- La respuesta de cicatrización de *M. albiflora* al daño por corte durante el proceso de injerto fue documentada por primera vez el desarrollo de clones o hijuelos, hasta 4 nuevos brotes.

PERSPECTIVAS.

- Analizar los resultados de la secuenciación del DNA del rizoma por la técnica de PacBio y determinar la diversidad de microorganismos.
- Continuar con la toma de datos diamétricos y de características ecológicas de los individuos registrados de *M. albiflora* en las dos poblaciones por tres ciclos de vida más (T4).
- Desarrollar el estudio de Riesgo de Extinción de Especies para incluir a *M. albiflora* en la NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Caracterizar la diversidad de microorganismos presentes en la rizósfera de otras cactáceas que coexistan con *M. albiflora* en la misma población, con la finalidad de identificar si los microbiomas son específicos por especie o son generalistas, además de cómo contribuyen a la adaptación de la especie.
- Caracterizar en dos temporadas anuales la diversidad de microorganismos tanto en la rizósfera como en la filósfera y suelo cercano para *M. albiflora* y dos especies más de cactáceas (*Turbiniarpus alonsoi* y *Mammillaria duwei*) en condiciones de microendemismo similar en el Estado de Guanajuato, como método de aproximarse a conocer las interacciones entre los microorganismos y la planta, así como dilucidar si esta relación es fundamental para la rareza de estas especies por su condición de microendemismo.
- Propagar los nuevos brotes o hijuelos de *M. albiflora* derivados de la injertación y desarrollo vegetativo estimulando con hormonas la generación de raíces.
- Llevar a cabo la propagación *in vitro* de *M. albiflora* bajo las condiciones propuestas en el protocolo elaborado en este estudio.
- Promover el desarrollo de un invernadero para la propagación de cactáceas en la población cercana al área de estudio, con el objetivo principal de protección de las especies de cactáceas locales y de la región, además de generar recursos económicos alternativos para los propietarios de los predios donde se encuentran las poblaciones naturales de *M. albiflora* y disminuir su saqueo.

LITERATURA REVISADA.

1. Jussieu AL de. Antonii Laurentii de Jussieu Genera plantarum: secundum ordines naturales disposita, juxta methodum in Horto regio parisiensi exaratam, anno M.DCC.LXXIV. Parisiis: apud viduam Herissant et Theophilum Barrois. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/7125> (1789).
2. Hernández-Ledesma P, Berendsohn WG, Borsch T, Von Mering S, Akhani H, *et al.* A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order Caryophyllales. *Willdenowia* 2015;45:281–383.
3. Villaseñor JL. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Rev Mex Biodivers* 2016;87:559–902.
4. Godínez-Alvarez H, Ortega-Baes P. Mexican cactus diversity: Environmental correlates and conservation priorities. <http://redalyc.uaemex.mx> (2007).
5. Guzmán U, Arias S, Dávila Aranda, Patricia D. Catálogo de cactáceas mexicanas. 1a ed. México, D.F.: UNAM : Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <http://books.google.com/books?id=Hs9gAAAAMAAJ> (2003).
6. Bárcenas RT. Patrones de distribución de cactáceas en el estado de Guanajuato. UNAM; 1999.
7. Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C, Goettsch B. CHECKLIST OF CHIHUAHUAN DESERT CACTACEAE. 2004.
8. Quezada-Guzmán E. Conocimiento de la diversidad de cactáceas en Guanajuato: un ejercicio de compilación de publicaciones especializadas y colecciones biológicas. In: *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado*. 2012.
9. Zamudio S, Galván Villanueva R. La diversidad vegetal del estado de Guanajuato. <https://www.researchgate.net/publication/259800574> (2011).
10. Aquino D, Guzmán U, González-Zamora P, Sánchez D. *Mammillaria ariasii* (Cactaceae, Cactaceae), una nueva especie del Bajío y regiones adyacentes, México. *Acta Bot Mex* 2024;131:1–20.

11. Bárcenas RT, Hernández HM. Patrones de diversidad de cactáceas: retos y oportunidades para su conservación. In: La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. 2012.
12. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales(SEMARNAT). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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.
13. Zamudio RS. La Diversidad Vegetal. In: La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado . 2012.
14. Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C. Mapping the cacti of Mexico. Part II: *Mammillaria*. DH Books. London; 2015.
15. Fitz Maurice BFMWA, SE, GMJ& BLR. *Mammillaria albiflora*. The IUCN Red List of Threatened Species.
16. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Guía para la interpretación de cartografía: edafología: escala 1:250 000: serie III. 2014.
17. Servicio Meteorológico Nacional CN del A (CONAGUA). Información Estadística Climatológica por Estación.
18. Arias S, Aquino D. FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES FAMILIA CACTACEAE I. <http://incolbajio.incol.mx/floradelbajio/> (2019).
19. Lema-Rumińska J, Kulus D. Micropropagation of cacti-A review. *Haseltonia* 2014;46–63.
20. Ferrer-Cervantes ME, Méndez-González ME, Quintana-Ascencio PF, Dorantes A, Dzib G, *et al.* Population dynamics of the cactus *Mammillaria gaumeri*: An integral projection model approach. *Popul Ecol* 2012;54:321–334.
21. Durán Rafael, Trejo-Torres Jorge Carlos, Ibarra-Manríquez Guillermo. Endemic phytotaxa of the Peninsula of Yucatán. <https://www.researchgate.net/publication/285245963> (1998).

22. Vázquez-Morales S. G. Demografía, cambio climático y bioprospección: una aproximación Integral para la conservación de *Magnolia schiedeana* Schltl. Universidad Veracruzana; 2015.
23. Sánchez-Velásquez L. R., Pineda-López M. R., Vázquez-Morales S. G., Avendaño-Yáñez M. L. ECOLOGY AND CONSERVATION OF ENDANGERED SPECIES: THE CASE OF MAGNOLIAS. Nova Science Publishers, Inc.; 2016.
24. Wiehle M, Vornam B, Wesche K, Goenster S, Buerkert A. Population structure and genetic diversity of *Populus laurifolia* in fragmented riparian gallery forests of the Mongolian Altai Mountains. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 2016;224:112–122.
25. Caswell Hal. Matrix population models : construction, analysis, and interpretation. Sinauer Associates; 2002.
26. Li W, Zhang GF. Population structure and spatial pattern of the endemic and endangered subtropical tree *Parrotia subaequalis* (Hamamelidaceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 2015;212:10–18.
27. Menon S, Choudhury BI, Latif Khan M, Townsend Peterson A. Ecological niche modeling and local knowledge predict new populations of *Gymnocladus assamicus* a critically endangered tree species. *Endanger Species Res* 2010;11:175–181.
28. Paredes-García DM, Ramírez-Bautista A, Martínez-Morales MA. Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. *Rev Mex Biodivers* 2011;82:689–700.
29. GODiNEZ-- C, Valverde T, Ortega--baes P. Demographic Trends in the Cactaceae. 2003.
30. Jiménez Sierra C, Matías Palafox ML, Jiménez Sánchez MG. Cactaceas y suculentas mexicanas. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 2007;54:36–47.
31. Jiménez-Sierra C, Mandujano MC, Eguiarte LE. Are populations of the candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus*) in the desert of Tehuacán, Mexico at risk? Population projection matrix and life table response analysis. *Biol Conserv* 2007;135:278–292.

32. Cruz Santos A. Evaluación de la diversidad genética poblacional de *Mammillaria albiflora* (Cactaceae): especie endémica del estado de Guanajuato, México. Los Reyes Iztacala, Estado de México; 2015.
33. Tapia-Salcido H. Análisis de la diversidad y la estructura genética poblacional de dos especies del género *Mammillaria*, endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México.; 2011.
34. Cuevas-Alducin D. Análisis de la diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria supertexta* mart. es pfeieff (Cactaceae), especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. Tesis de licenciatura. Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
35. Peters E, Martorell C. Conocimiento y conservación de las mamilarias endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. D. F., Mexico. ; 2001.
36. Zhang L, Zhou J, George TS, Limpens E, Feng G. Arbuscular mycorrhizal fungi conducting the hyphosphere bacterial orchestra. *Trends in Plant Science* 2022;27:402–411.
37. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18:607–621.
38. Colchado-López J, Rougon-Cardoso A, Vélez P, Rosas U. Meta-analysis of community composition patterns of halophyte and xerophyte rhizosphere associated bacteria. *Rhizosphere*;24. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1016/j.rhisph.2022.100588.
39. Ayangbenro AS, Babalola OO. Reclamation of arid and semi-arid soils: The role of plant growth-promoting archaea and bacteria. *Current Plant Biology*;25. Epub ahead of print 1 January 2021. DOI: 10.1016/j.cpb.2020.100173.
40. Wani F, Ahmad D, Mushtaq A. Role of Microorganisms in Nutrient Mobilization and Soil Health-A Review. <https://www.researchgate.net/publication/282641319> (2015).

41. Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol* 2004;6:629–642.
42. Puente ME, Li CY, Bashan Y. Bacterial growth conditions. *Plant Biol*;6.
43. Puente ME, Li CY, Bashan Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ Exp Bot* 2009;66:389–401.
44. Lopez BR, Bashan Y, Bacilio M. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Arch Microbiol* 2011;193:527–541.
45. Aguirre-Garrido JF, Montiel-Lugo D, Hernández-Rodríguez C, Torres-Cortes G, Millán V, *et al.* Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2012;101:891–904.
46. Puente ME, Li CY, Bashan Y. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ Exp Bot* 2009;66:402–408.
47. Cui M, Nobel PS. Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. 1992.
48. Fonseca García C. El microbioma de las Cactáceas: una comparativa entre dos especies simpátricas. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ; 2016.
49. Bayat N, Naderi R, Maidani AR. Does Grafting Time Affect the Cactus Performance? 2016.
50. Hartmann H, Kester D, Davies F, Geneve R. Principles of Grafting and Budding. In *Plant propagation: principles and practices*. Pearson Education L. Kirby Street, London; 2014.
51. Mcmillan AJS. *GRAFTING CACTI*. 1966.
52. Wang YQ. Plant grafting and its application in biological research. *Chinese Science Bulletin* 2011;56:3511–3517.

53. Perumal R, Prabhu M, Kannan M, Srinivasan S. Taxonomy and Grafting of Ornamental Cacti: A Review. *Agricultural Reviews*. Epub ahead of print 18 January 2021. DOI: 10.18805/ag.r-2053.
54. Pérez-Molphe-Balch E, Santos-Díaz MDS, Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N. Tissue culture of ornamental cacti. *Sci Agric* 2015;72:540–561.
55. Bayat N, Naderi R, Maidani AR. Greenhouse screening of cactus rootstock and scion for the best rootstock scion combination. *Crop Research* 2015; 50: 125–130.
56. Anderson E. F. *The Cactus Family*.
57. Reyes Herrera P. INJERTOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN TRES CACTÁCEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO. Colegio de Postgraduados; 2019.
58. Flores Pérez S. Soluciones Nutritivas en la producción de injertos en cactáceas. Colegio de Postgraduados; 2009.
59. Bouzroud S, El Maaiden E, Sobeh M, Devkota KP, Boukcim H, *et al*. Micropropagation of Opuntia and Other Cacti Species Through Axillary Shoot Proliferation: A Comprehensive Review. *Front Plant Sci*;13. Epub ahead of print 7 July 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.926653.
60. De la Rosa-Carrillo Ma de L, Domínguez-Rosales MS, Pérez-Reyes ME, Pérez-Molphe-Balch E. CULTIVO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE CACTÁCEAS AMENAZADAS DEL GÉNERO *Turbiniacarpus*.
61. Rosas MM, De La Rosa MAM, Goldammer KM, Avila VMC. Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2001;37:400–404.
62. Rublu0 A. .14 Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). 1997.
63. Dávila-Figueroa CA, De La Rosa-Carrillo MDL, Pérez-Molphe-Balch E. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbiniacarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2005;41:540–545.
64. Ramirez-Malagon R, Aguilar-Ramirez I, Borodanenko A, Perez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, *et al*. *In vitro* propagation of ten threatened species of

- Mammillaria* (Cactaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 2007;43:660–665.
65. Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chávez-Avila VM. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 2003;39:388–393.
 66. Pérez-Molphe-Balch E, Dávila-Figueroa CA. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 2002;38:73–78.
 67. Villavicencio-Gutiérrez EE, Arellano-Ostoa G, Carranza-Pérez MA. Estabilidad del explante en la proliferación de brotes axilares *in vitro* de la biznaga. 2022.
 68. Solórzano S, Arias S, Dávila P. Genetics and conservation of plant species of extremely narrow geographic range. Diversity (Basel);8. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.3390/d8040031.
 69. SOLORZANO S., TELLEZ, ARIAS, DÁVILA. ANEXO NORMATIVO II - *M. albiflora*. 2016.
 70. Fonseca-García C, Coleman-Derr D, Garrido E, Visel A, Tringe SG, *et al.* The Cacti Microbiome: Interplay between habitat-filtering and host-specificity. Front Microbiol;7. Epub ahead of print 12 February 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00150.
 71. Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, *et al.* Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. New Phytologist 2016;209:798–811.
 72. Ramírez Malagón R, Salazar Solís E. Propagación y conservación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. Acta Univ 2016;26:78–82.
 73. Hernández H.M., Gómez-Hinostrosa C. Cactus diversity and endemism in the Chihuahuan Desert Region. In: J.L. Cartron, R. Felger, G. Ceballo (editors).

- Biodiversity and Conservation in Northern Mexico . Oxford University Press; 2005. pp. 264–275.
74. Hernández HM, Goettsch B, Gómez-Hinostrosa C, Arita HT. Cactus species turnover and diversity along a latitudinal transect in the Chihuahuan Desert Region. *Biodivers Conserv* 2008;17:703–720.
 75. Backeberg K. *Mammillaria albiflora* Bchbg. *Blatter Kakteenforsch.*
 76. Glass C. Guide to the Identification of Threatened Cacti of México. CONABIO-CANTE; 1998.
 77. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 4.3.1.
 78. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. 2001.
 79. Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén BM. The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. *PLoS One*;8. Epub ahead of print 1 October 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076431.
 80. Montalva C, Collier K, Rocha LFN, Inglis PW, Lopes RB, *et al.* A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. *Fungal Biol* 2016;120:655–665.
 81. GARCÍA RUBIO OR. Protocolo para la Restauración de una Población de *Mammillaria mathildae* en la Provincia de Juriquilla, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro; 2009.
 82. Retes-Pruneda JL, Valadez-Aguilar M de L, Pérez-Reyes ME, Pérez-Molphe-Balch E. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Bot Sci* 2007;9–16.
 83. Ramírez-González G, Rodríguez-De la O JL, Martínez-Solís J, Colinas-León MT, Ramírez-González G, *et al.* Germinación y crecimiento *ex vitro* e *in vitro* de cinco especies de cactáceas del género *Mammillaria*. *Polibotanica* 2019;0:99–110.

84. Téllez-Román M, Cristina Guadalupe M, Luna E, Adolfo A, Mancera Z, *et al.* Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Rev Mex De Cienc Agric* 2017;8:863–876.
85. Soria-Campos D, López-Escamilla AL, Olguín-Santos LP. Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Biodiversity Commons, Plant Biology Commons.
86. Wyka T, Hamerska M, Wroblewska M. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1007/s11240-006-9128-9.
87. Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, *et al.* Reevaluation of the plant ‘gemstones’: Calcium oxalate crystals sustain photosynthesis under drought conditions. *Plant Signal Behav* 2016; 11: e1215793.
88. Esparza Olguín LG. ¿Qué sabemos de la rareza en especies vegetales? Un enfoque genético-demográfico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 2004;17–32.
89. Krebs CJ. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance* 6/E. www.pearsoned.co.uk (2014, accessed 5 August 2024).
90. Martorell C, Peters EM. The measurement of chronic disturbance and its effects on the threatened cactus *Mammillaria pectinifera*. *Biol Conserv* 2005;124:199–207.
91. Peters E, Martorell C. Nurse rocks are more important than nurse plants in determining the distribution and establishment of globose cacti (*Mammillaria*) in the Tehuacán Valley, México. *J Arid Environ* 2008;72:593–601.
92. Macías-Arrastio F. Diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria solisioides* Backeb., Especie endémica de la Mixteca de Oaxaca y Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
93. López-Ortíz N. Diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria zephyranthoides* (Cactaceae): Una especie endémica de México. Universidad Nacional Autónoma de México.; 2013.

94. Arias-Medellín LA, Flores-Palacios A, Martínez-Garza C. Cacti community structure in a tropical Mexican dry forest under chronic disturbance. *Bot Sci* 2014; 92: 405–415.
95. Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gomez MJ, Peña-Cabriaes JJ, Partida-Martinez LP. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *Microbiol Ecol* 2014; 90: 844–857.
96. Docherty KM, Borton HM, Espinosa N, Gebhardt M, Gil-Loaiza J, *et al.* Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. *PLoS One*;10. Epub ahead of print 4 November 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0135352.
97. Makhhalanyane TP, Valverde A, Gunnigle E, Frossard A, Ramond JB, *et al.* Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews* 2015; 39: 203–221.
98. Wang X, Van Nostrand JD, Deng Y, Lü X, Wang C, *et al.* Scale-dependent effects of climate and geographic distance on bacterial diversity patterns across northern China's grasslands. *FEMS Microbiol Ecol*;91. Epub ahead of print 1 December 2015. DOI: 10.1093/femsec/fiv133.
99. Porrás-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO, Lipinski K, Sinsabaugh RL. Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 2011;103:10–21.
100. Choe H, Thorne JH, Hijmans R, Seo | Changwan. Integrating the Rabinowitz rarity framework with a National Plant Inventory in South Korea. *Ecol Evol*;9. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1002/ece3.4851.
101. Gaston KJ. *Rarity*. Springer Netherlands; 1994. Epub ahead of print 1994. DOI: 10.1007/978-94-011-0701-3.
102. Fernández Muñiz TY. Dinámica poblacional y evaluación del estado de conservación de un cactus endémico del desierto Chihuahuense. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; 2017.
103. Aguilar-Morales Gisela, Martínez-Peralta C, Arroyo FPT, Golubov J, Mandujano MC. Distribución geográfica del género *Ariocarpus Scheidweiler* (Cactaceae). <https://www.researchgate.net/publication/285749697> (2011).